

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen
sezernierte Moleküle des humanpathogenen Schimmelpilzes
*Aspergillus fumigatus***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Leonie Heesemann
aus Hamburg

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Frank Ebel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Holzinger

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Gottfried Wilharm

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2010

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Aspergillus
Abb.	Abbildung
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
Ak	Antikörper
ALP	Serinprotease
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Asp f	Allergene von Aspergillus fumigatus
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat Toluidin Salz
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C.	Candida
C.	Cryptococcus
°C	Grad Celsius
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
Coll	Kollagen
dest.	Destilliert
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E.	Escherichia
EDTA	Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme linked Immuno sorbent Assay
et al.	und andere
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanidin-Triphosphat

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hypoxanthin Azaserin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His ₆	rekombinant hergestelltes 6x Histidin gekoppeltes Protein
Hly	Hämolysin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IA	Invasive Aspergillose
Ig	Immunglobulin
IgG	Ig der Klasse G
IgM	Ig der Klasse M
IPA	Invasive pulmonale Aspergillose
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
KCl	Kalium-Chlorid
kDa	Kilodalton
kVh	Kilovolt-Stunden
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	milli-Ampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser desorption ionization-time of flight
MEP	Metalloprotease
MG	molekulares Gewicht
min	Minute
mM	milli-molar
mPa	mega-Pascal
mRNA	Messenger RNA
μm	Mikrometer
N.	Neurospora
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
N-terminal	amino-terminal
OD ₄₅₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm

ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP1	Aspergillopepsin 1
PO	Peroxidase
PP	Probenpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
s	Sekunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS(-T)	Tris gepufferte Salzlösung (+Tween)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ü	Überstand
ÜN	über Nacht
ZU	Ultrazentrifugation
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
x g	vielfache Erdbeschleunigung
YG _F -Medium	filtriertes Hefe-Glukose-Medium
A	anti
Ω	Ohm

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
INHALTSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	12
1.1 Taxonomie von <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.2 Morphologie und Lebenszyklus von <i>A. fumigatus</i>	13
1.3 Aufbau der Zellwand	14
1.4 Die Bedeutung der Proteinsekretion	16
1.5 Klinische Relevanz	17
1.5.1 Ätiologie der Aspergillose	17
1.5.2 Pathogenese und Pathologie	17
1.5.3 Klinisches Bild	17
1.5.3.1 Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose	18
1.5.3.2 Das Aspergillom	19
1.5.3.3 Die Invasive Aspergillose	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit	24
2 METHODEN	26
2.1 Chemikalien	26
2.2 Gerätenachweis	26
2.3 Verwendete <i>Aspergillus</i>-Stämme	28
2.4 Verwendete Zelllinien	28
2.5 Oligonukleotide	28
2.6 Verwendete Antikörper	29
2.6.1 Primäre Antikörper	29

2.6.2	Sekundäre Antikörper	29
2.7	Mikrobiologische Methoden	29
2.7.1	Kultivierung auf festen Nährmedien	29
2.7.2	Ernte der Sporen	30
2.7.3	Bestimmung der Sporenzahl	30
2.7.4	Kultivierung in flüssigen Medien	31
2.7.4.1	Gewinnung von Myzel	32
2.7.4.2	Herstellung angeschwollener bzw. auskeimender Sporen	33
2.8	Proteinchemische Methoden	33
2.8.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	33
2.8.2	Molekulargewichtsstandard	33
2.8.3	Eindimensionale SDS-Page	34
2.8.4	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	36
2.8.5	Nachweis von Proteinen durch Antikörper mittels Western-Blot	37
2.8.5.1	Western-Blot	37
2.8.5.2	Blockieren	38
2.8.5.3	Immunfärbung und Entwicklung der Blots	38
2.8.6	Entfernung von Albumin aus Patientenseren	39
2.8.7	ELISA	39
2.8.7.1	Sandwich-ELISA mit proteinbindenden Platten	40
2.8.7.2	Sandwich-ELISA mit vorbeschichteten Platten	41
2.8.7.3	Vorbehandlung von Seren für die ELISA-Diagnostik	41
2.8.8	Identifizierung und Charakterisierung von Überstandsproteinen	42
2.8.8.1	Gewinnung von Überstandsmedium	42
2.8.8.2	Aufkonzentrierung der Überstandsproteine mittels TCA-Fällung	42
2.8.8.3	Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS	42
2.9	Molekulargenetische Methoden	43
2.9.1	Expression und Reinigung von rekombinanten His ₆ -Proteinen	43
2.9.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.9.1.2	Agarose-Elektrophorese	45
2.9.1.3	Reinigung der PCR-Produkte	46
2.9.1.4	Klonierung eines amplifizierten DNA-Fragmentes in den pQE-30- Expressionsvektor	46
2.9.1.5	Elektroporation	48

2.9.1.6	PCR-Screening transformierter Bakterien zur Überprüfung der Anwesenheit und Orientierung des Inserts im pQE-30-Expressionsvektor	49
2.9.1.7	Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung	50
2.9.1.8	Induktionskulturen	50
2.9.1.9	Expression eines rekombinanten His ₆ -Proteins	51
2.9.1.10	Aufschluss der Bakterien mit Hilfe der French Press	51
2.9.1.11	Reinigung des rekombinanten His ₆ -Proteins mittels Talon-Matrix	52
2.9.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	53
2.9.2.1	Immunisierung der Mäuse	53
2.9.2.2	Fusion	54
2.9.2.3	Durchmusterung der Hybridomzell-Überstände	55
2.9.2.4	Klonierung Antikörper-produzierender Hybridomzellen	56
2.9.2.5	Antikörpertypisierung	57
2.9.2.6	Einfrieren von Hybridom-Zellen	57
2.9.3	Aufreinigung von Antikörpern aus Kulturüberstand	58
2.9.4	Aufkonzentrierung von Antikörperlösungen	58
2.9.5	Konjugation des Antikörperkonzentrates mit Peroxidase	58
2.10	Zytologische Methoden	59
2.10.1	Präparation von Myzel für die Immunfluoreszenz	59
2.10.2	Fluoreszenzfärbetechniken	59
2.10.2.1	Nachweis von Zuckern/Proteinen mithilfe der Immunfluoreszenz	59
2.10.2.2	Calcofluor/Weiß-Färbung	60
2.10.2.3	Färbung von DNA mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Identifizierung von mediumabhängig sezernierten Proteinen	62
3.1.1	Sezernierte Proteine in YG _r -Medium	62
3.1.2	Sezernierte Proteine im Coll-Medium	63
3.1.3	Sezernierte Proteine in Hly-Medium	67
3.1.4	Sezernierte Proteine in 1%-Y-Medium	67
3.2	Aspergillopepsin 1 (PEP1)	68
3.2.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PEP1	69
3.2.2	Testen der PEP1-Antikörper auf einer PEP1-Deletionsmutanten	70
3.2.3	Suche nach PEP1 in andern Kulturüberständen	72

3.2.4	Testung des Anti-PEP1-Antikörpers auf Patientenseren	72
3.2.5	Immunfluoreszenz mit α -PEP1	73
3.3	Hämolysin (Hly)	74
3.3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hämolysin	74
3.3.1.1	Klonierung von Hämolysin in den pQE30-Vektor	74
3.3.1.2	Expression des rekombinanten His ₆ -Hämolysin	76
3.3.1.3	Reinigung des rekombinanten His ₆ -Hämolysins	79
3.3.1.4	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hämolysin	81
3.3.2	Testen von α -Hly-Ak auf Patientenseren	82
3.3.3	Suche nach α -Hly-Antikörpern in Patientenseren	83
3.4	Durchmusterung der Antikörperbank	83
3.4.1	Durchmusterung der Antikörperbank mittels Western-Blot	83
3.4.2	Durchmusterung der Antikörperbank in der Immunfluoreszenz	86
3.4.3	Klonierung der Hybridomzelllinien L-99 und L-10	86
3.4.4	Genauere Charakterisierung der Antikörper L-10-1 und L-99-13	87
3.4.4.1	Verdau von Proteinantigenen der Hyphenoberfläche mit Proteinase K	87
3.4.4.2	Oxidation der Zuckerantigene auf der Hyphenoberfläche mit Natriumperjodat	88
3.4.4.3	Entfernung von Galaktofuranoseresten auf der Hyphenoberfläche durch HCl-Hydrolyse	89
3.4.4.4	Untersuchung des Färbeverhaltens einer Galf-Deletionsmutante	91
3.5	Galaktofuranose (Gal_f)	92
3.5.1	Testen der α -Gal _f -Ak auf Myzel, das in verschiedenen Medien gewachsen war	93
3.5.2	Nachweis von sezernierter Galaktofuranose in Kulturüberständen	94
3.5.3	Untersuchung unterschiedlicher Wachstumsstadien hinsichtlich der Expression von Galaktofuranose in der Immunfluoreszenz	95
3.5.4	Nachweis von Galaktofuranose auf Myzel verschiedener <i>Aspergillus</i> -Gattungen	97
3.5.5	Färbung histologischer Präparate einer IPA mit α -Gal _f -Antikörpern	98
3.5.6	Färbung histologischer Präparate einer invasiven Candidose	100
3.5.7	Aufbau eines Sandwich-ELISAs mit L-10-1	101
3.5.7.1	Platelia-Aspergillus-ELISA mit L-10-1-PO als Detektions-Ak	101
3.5.7.2	Sandwich-ELISA mit L-10-1 als Fänger- und L-10-1-PO als Detektions-Ak	103
3.5.7.3	Vergleich von Platelia Aspergillus EIA mit dem L-10-1-ELISA	104

3.5.8	Aufbau eines Sandwich-ELISAs mit L-99-13 und L-10-1-PO	106
3.5.9	Testen auf Kreuzreaktion der drei ELISA Platelia Aspergillus, L-10-1/L-10-1-PO und L-99-13/L-10-1-PO mit Augmentan, Bifidumbakterien und pflanzlichem Galaktomannan	107
4	DISKUSSION	110
4.1	Anforderungen an einen idealen Test für die Diagnostik der Invasiven Aspergillose	112
4.2	Die Diagnostik der Invasiven Aspergillose anhand Aspergillopepsin 1	114
4.3	Das Toxin Hämolyisin	117
4.4	Galaktofuranose und seine Bedeutung für die Diagnostik der Invasiven Aspergillose	119
5	ZUSAMMENFASSUNG	124
	ANHANG	126
	LITERATURVERZEICHNIS	127
	DANKSAGUNG	133

1 Einleitung

In den vergangen 20 Jahren haben Pilze als opportunistische Krankheitserreger immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dies ist v.a. auf die steigende Zahl immunsupprimierter Patienten zurückzuführen. Bedingt durch den medizinischen Fortschritt der letzten Jahre konnten neue, stärker wirksame Immunsuppressiva hergestellt werden und auch die Zahl von Organ- und Stammzelltransplantationen wuchs stetig. Außerdem trägt die Verbreitung des Immunschwächevirus HIV zu dem drastischen Zuwachs von Patienten bei, bei denen die körpereigene Abwehr deutlich geschwächt ist. Dieses Patientenkollektiv ist empfänglich für die opportunistischen Pilzerreger wie *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*. In den USA konnte zwischen 1979 und 2000 eine Zunahme von Pilzen als Sepsis-Verursacher um 207% verzeichnet werden (Martin et al. 2003). Darunter kommt dem Schimmelpilz *A. fumigatus* aufgrund seiner hohen Letalitätsrate die größte Bedeutung zu. So beträgt die Letalitätsrate der an einer invasiven Aspergillose (IA) erkrankten Patienten über 50% (Perfect et al. 2001). Trotz den deutlichen Fortschritten im diagnostischen und pharmazeutischen Bereich in den vergangenen Jahren konnte die Letalität nicht wesentlich gesenkt werden. Verantwortlich dafür ist vor allem die oft schwierige und zu späte Diagnose von *A. fumigatus* Infektionen, die im Gegensatz zu bakteriellen Infektionen in der Regel nicht einfach über Blutkulturen gestellt werden kann.

Schwierig stellt sich außerdem die Prophylaxe von *A. fumigatus* Infektionen dar, da sich die Pilzsporen v.a. in Lüftungsanlagen, auf feuchter Erde, Wänden und Lebensmitteln befinden und über die Luft ausbreiten. Berechnungen zufolge inhaliert jeder Mensch täglich mehrere hundert der nur wenige Mikrometer großen Sporen (Hospenthal et al. 1998), die bei Immunsupprimierten in der Lunge nicht eliminiert werden, dort auskeimen und so zu Erkrankungen wie der Invasiven pulmonalen Aspergillose führen können. Dies macht die Entwicklung von schnellen, sensitiven Diagnostikverfahren für die Früherkennung von *A. fumigatus* Infektionen umso dringlicher.

1.1 Taxonomie von *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein eukaryonter Krankheitserreger. Das Vorliegen eines Zellkerns - einer Kernmembran, die in Chromosomen organisierte DNA vom Zytosol abgrenzt - bildet den Hauptunterschied zu den Prokaryoten. Von tierischen Zellen unterscheiden sich die Pilze durch das Vorliegen einer Zellwand, die die Zelle zusätzlich zur Zellmembran umhüllt. *Aspergillus fumigatus* gehört zur Gattung *Aspergillus* (=Gießkannenschimmel), der wiederum

aufgrund seiner bis vor kurzem vermuteten asexuellen Fortpflanzung der Klasse der Deuteromyzeten (*fungi imperfecti*) zugeordnet wird. Bei der Klasse der Deuteromyzeten handelt es sich um keine einheitliche phylogenetische Verwandtschaftsgruppe. Vielmehr ist sie eine künstliche Einteilung, zu der alle Pilze gezählt werden, von denen keine sexuellen Fortpflanzungsstadien bekannt sind. Kürzlich konnte jedoch auch für *A. fumigatus* eine sexuelle Vermehrung nachgewiesen werden (O'Gorman et al. 2009). Da die Sporen wie bis kürzlich angenommen durch vegetative Vermehrung entstehen, werden sie auch Konidien genannt. Seinen Namen verdankt der Pilz wahrscheinlich der rauchgrünen Farbe der Sporen (lat.: *fumus* = Rauch), die durch das Pigment Melanin verursacht wird.

1.2 Morphologie und Lebenszyklus von *A. fumigatus*

Als saprophytär lebender Organismus spielt er eine wichtige Rolle im Recycling von Biomasse. Sein ökologisches Habitat ist der Erdboden, wo er aus organischem Abfall seine Nährstoffe bezieht. Aber auch außerhalb vom Erdboden hat *A. fumigatus* zahlreiche Lebensräume gefunden, u.a. Lebensmittel, Kompost und sogar Tapeten. *Aspergillus*-Arten wachsen aerob und sind besonders wärmeliebend. Sie sind in der Lage bei Temperaturen bis zu 55°C zu wachsen und noch bis zu 70°C zu überleben (Raper 1965). Der Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt mit der 2-3 µm großen ruhenden Spore, auch Konidie genannt. In dieser ist neben der DNA- und RNA-Biosynthese auch der Stoffwechsel inaktiv, was der Spore ermöglicht viele Jahre in diesem Zustand zu überleben (Carlile M. 2001). Trifft diese auf eine Umgebung, die geeignete Nährstoffe und Umweltbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, O₂-Gehalt) bietet, so wird die Proteinbiosynthese in Gang gesetzt, die Zellwand umgebaut und die Spore schwillt u.a. durch Wasseraufnahme auf das 3-4 -fache ihrer Größe an. Bereits nach wenigen Stunden kann man die Entstehung erster Keimschläuche erkennen, die durch ein polarisiertes Wachstum gekennzeichnet sind. Diese Keimschläuche wachsen zu langen Hyphen mit einem Durchmesser von 2-4 µm heran, die von Septen unterteilt sind. Die Hyphen verzweigen sich und bilden nach und nach gemeinsam mit anderen Hyphen ein dichtes Myzel. Bei direktem Kontakt mit der Luft kommt es bei manchen Verzweigungen zur Ausbildung einer Konidiophore, an deren Phialiden neue Konidien abgeschnürt und aerogen in der Umwelt verteilt werden.

1.3 Aufbau der Zellwand

Die Zellwand von *A. fumigatus* ist eine komplexe dynamische Struktur, die sich im wesentlichen aus Polysacchariden, Proteinen und Lipiden zusammensetzt. In ihr sind außerdem die meisten Antigene lokalisiert, die während des Wachstums vom Pilz sekretiert werden (Latge et al. 1993). Der komplette Austausch zwischen dem Pilz und seiner Umwelt basiert auf einer funktionsfähigen, permeablen Zellwand. Diese dient dem Stoffaustausch und dem Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen. Andererseits interagiert die Zellwand im Wirt mit dem Abwehrsystem und beeinflusst die Pathogenität.

Der Aufbau der Zellwand verändert sich während den verschiedenen Phasen der Germination. Die Ruhende Spore besitzt eine zweischichtige Zellwand: Eine äußere, dichte, durch das Pigment Melanin grau-grün gefärbte und eine innere, lichtdurchlässige Schicht. Die äußere Schicht ist reich an den Proteinen Hydrophobin A und B, die die sogenannte Rodletstruktur bilden (Paris et al. 2003). Sie ist stark hydrophob und schützt dadurch vor wässrigen Schadstoffen. Über den Aufbau der inneren Schicht ist wenig bekannt.

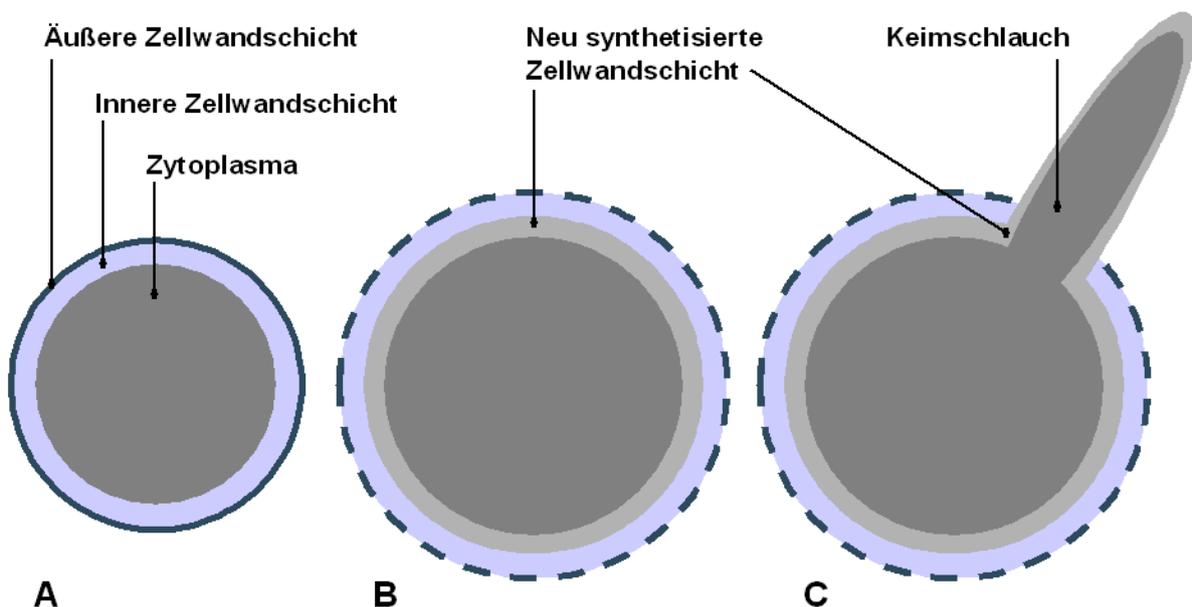


Abb. 1: Aufbau der Zellwand in verschiedenen Germinationsstadien

Die Zellwand der ruhenden Konidie (in **A** dargestellt) setzt sich aus einer äußeren, melaninhaltigen Schicht und einer inneren Schicht zusammen. Während der ersten Phase der Auskeimung, dem Anschwellen (**B**), kommt es zu einem ersten Umbau der alten Zellwand. Gleichzeitig wird eine neue Zellwandschicht synthetisiert. Den Keimschlauch (**C**) umgibt im Folgenden nur noch die neu synthetisierte, einschichtige Zellwand.

Mit dem Beginn der Germination kommt es durch Hydrolyse der Zellwand-Polysaccharide zur "Aufweichung" der Zellwand, was eine Dehnung und Ausdünnung der Rodletstruktur bewirkt. Durch diesen Prozess kommt die innere, glatte Zellwandschicht zum Vorschein (Tronchin et al. 1995). Gleichzeitig beginnt im Inneren die Synthese einer neuen Zellwandschicht, die dann auch den entstehenden Keimschlauch und im Folgenden die gesamte Hyphe umgibt (siehe Abb. 1).

Die einschichtige Zellwand des Myzels besteht im Wesentlichen aus den 3 Polysacchariden $\beta(1,3)$ -Glukan, Chitin und Galaktomannan. Das Kernstück bildet eine verzweigte $\beta(1,3)/(1,6)$ -Glukan-Kette, die $\beta(1,4)$ glykosidisch mit Chitin verbunden ist und 30% der gesamten Zellwand ausmacht (Latge et al. 2005).

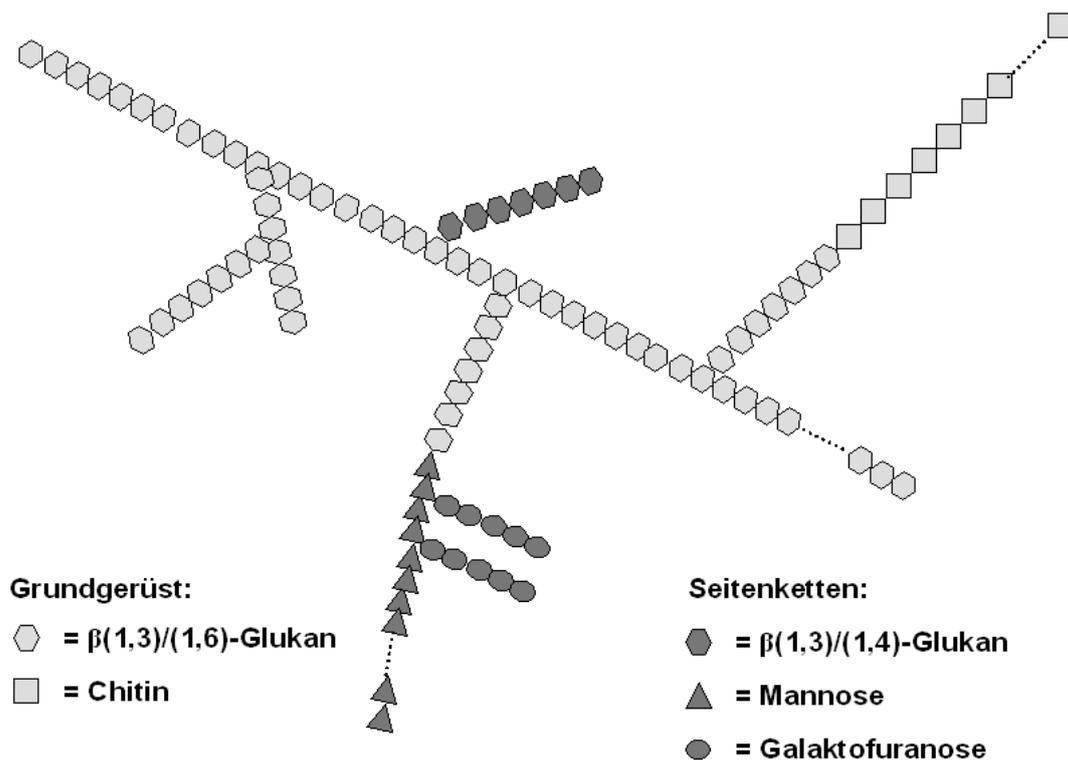


Abb. 2: Polysaccharidgerüst der Zellwand von *A. fumigatus*:

Das Grundgerüst setzt sich aus $\beta(1,3)$ -Glukan und Chitin zusammen. An diesem hängen Seitenketten bestehend aus Galaktomannan und linearem $\beta(1,3)/(1,4)$ -Glukan.

Dieses Grundgerüst findet sich in der Zellwand aller Pilze wieder, jedoch unterscheiden sich die einzelnen Spezies durch die zusätzlichen Modifikationen. Bei *A. fumigatus* bestehen diese aus Galaktomannan- oder $\beta(1,3)/(1,4)$ -Glukanseitenketten (Fontaine et al. 2000). Galaktomannan wiederum setzt sich aus einem linearen α -Mannan-Grundgerüst mit kurzen Seitenketten von $\beta(1,5)$ -Galaktofuranose zusammen (Latge et al. 1994) (siehe Abb. 2). Da diese Polysaccharide nicht im menschlichen Organismus vorkommen, bilden die für die Synthese nötigen Zuckertransferasen einen idealen Angriffspunkt für antimykotische Medikamente.

1.4 Die Bedeutung der Proteinsekretion

Pilze sind heterotrophe Organismen, d.h. dass sie sich von organischem Material aus ihrer Umgebung ernähren. Durch Sekretion von degradierenden Enzymen (u.a. Proteasen, Glykosidasen, Lipasen) werden die Nährstoffe in kleinere, aufnehmbare Fragmente gespalten. Hierzu stellt *A. fumigatus* eine Vielzahl von Hydrolasen bereit, deren Sekretionsmuster stark von der Zusammensetzung des Kulturmediums bzw. des Wirtsgewebes abhängt (Gifford et al. 2002). Von den Hydrolasen scheinen Proteasen unter Infektionsbedingungen die wichtigste Rolle zu spielen. Bisher konnten drei Gruppen in vivo beschrieben werden:

- 1) Metalloproteasen (MEP) (Monod et al. 1993)
- 2) Serinproteasen (ALP) (Kolattukudy et al. 1993)
- 3) Aspartylproteasen (PEP) (Reichard et al. 1995)

Mithilfe dieser Proteasen, die u.a. Kollagen, Elastin und Fibrinogen degradieren können, ist es dem Pilz möglich auch das Gewebe des Wirtes (wie z.B. das Lungenepithel) zu durchdringen.

Daneben werden noch eine Vielzahl anderer Proteasen sekretiert. Aus der Genomsequenz von *A. fumigatus* konnten 52 Gene sekretierter Proteasen vorhergesagt werden (Robson et al. 2005) (siehe Anhang).

Neben den Hydrolasen, die die notwendigen Nährstoffe bereit stellen, sekretiert *A. fumigatus* eine Reihe anderer Proteine, darunter Toxine wie z.B. Ribotoxin oder Hämolyisin und Siderophore (= Eisenchelatoren) wie Ferricrocin oder Triacetylfusarinin C.

Bei *A. fumigatus* ist zum jetzigen Zeitpunkt nur der klassische Weg der Proteinsekretion über

das Endoplasmatisches Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat bekannt. Hierfür benötigen die zur Sekretion bestimmten Proteine eine N-terminale Signalsequenz, um in das ER zu translozieren und danach über Vesikel nach außen geschleust zu werden. In anderen Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* sind bereits eine Reihe extrazellulärer Proteine beschrieben, die kein N-terminales Signalpeptid aufweisen (Nombela et al. 2006) und alternative Sekretionsmechanismen nahe legen. Auch in *A. niger* gibt es bereits erste Hinweise auf alternative Sekretionswege (Punt et al. 2001). Dies ist auch für *A. fumigatus* denkbar und würde eventuell die enorme Vielfalt der sekretierten Proteine dieses Pilzes erklären, wenn auch bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Nachweis eines alternativen Sekretionsapparates erbracht werden konnte.

1.5 Klinische Relevanz

1.5.1 Ätiologie der Aspergillose

A. fumigatus ist mit 90% der häufigste Erreger der Aspergillose (Latge 1999), aber auch *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus* und andere können schwere Erkrankungen verursachen, allerdings vergleichsweise selten.

1.5.2 Pathogenese und Pathologie

Das ubiquitäre Vorkommen des Pilzes führt zum täglichen Einatmen von Sporen, die aber nur selten zu einer Erkrankung führt. Prädisponierend wirken Erkrankungen wie AIDS, Leukämien, chronische Granulomatosen, ein vorgeschädigtes Bronchialsystem (z.B. durch Tuberkulose) oder die Behandlung mit aggressiven Immunsuppressiva. Charakteristisch für die Aspergillusinfektion bei neutropenischen Patienten ist die Invasion der Hyphen in die Blutgefäße mit nachfolgenden Thombosen, Nekrosen und hämorrhagischen Infarkten (Bennett 2005).

1.5.3 Klinisches Bild

Die durch *A. fumigatus* ausgelösten Krankheitsbilder lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. Rein allergische Reaktionen:

- allergisches Asthma bronchiale

- allergische Sinusitis
- exogen allergische Alveolitis

2. Infektion des Wirtes:

a) nicht invasiv

- Allergisch bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)
- Aspergillom (Pilzball)

b) invasiv

- Invasive pulmonale Aspergillose (IPA)
- extrapulmonale Manifestationen (Sinusitis, Otitis, Keratitis etc.)

Da die erste Gruppe durch die Abwesenheit einer Besiedelung durch *A. fumigatus* gekennzeichnet ist, wird in dieser Arbeit nicht näher auf sie eingegangen.

1.5.3.1 Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose

Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose ist eine Hypersensitivitätsreaktion auf *Aspergillus*-Antigene, die durch eine oberflächliche Kolonisierung der Lunge durch den Pilz ausgelöst wird. Es erkranken v.a. Patienten mit Asthma oder Cystischer Fibrose (CF). So beträgt die Prävalenz der an ABPA Erkrankten Schätzungen zufolge 1-2 % aller Asthmatiker (Schwartz und Greenberger 1991) und 7-14% aller CF-Patienten (Mroueh und Spock 1994). Die ABPA manifestiert sich als bronchiales Asthma, das mit transienten pulmonalen Infiltraten einhergeht, die später zu Bronchiektasien oder irreversiblen pulmonalen Fibrosen führen können. Betroffene Patienten fallen durch Asthma, episodisch keuchender Atmung, Thoraxschmerzen und zusätzlich durch bräunlichen Auswurf und Fieber auf.

Offizielle Diagnosekriterien sind u.a. das Vorliegen von Asthma und zentralen Bronchiektasien, eine Serum-IgE-Konzentration >1000 ng/ml und eine Sofortreaktion der Haut auf Aspergillus-Antigen-Extrakt. Diese Kriterien können tatsächlich nur selten bei ABPA-Patienten gefunden werden. Häufig, v.a. bei CF-Patienten, liegt eine „stumme“ ABPA vor, die zu einer Zerstörung des Lungenepithels führt, ohne dass eines der Standarddiagnosekriterien erfüllt ist (Schonheyder et al. 1988). Da die ABPA aber eine durchaus ernstzunehmende Erkrankung ist, die im schlimmsten Fall zu einer Lungenfibrose,

einem Verlust der Elastizität des Atemorgans und damit zum Tod führen kann, ist die Entwicklung neuer, frühzeitiger Diagnostikmethoden wichtig.

1.5.3.2 Das Aspergillom

Das Aspergillom bezeichnet das umschriebene Wachstum des Pilzes in einem Lungenhohlraum und tritt nur in bereits vorbestehenden Kavernen auf, wie sie z.B. durch Tuberkulose (Tbc), Sarkoidose oder anderen bullösen Lungenerkrankungen hervorgerufen werden. In den 50er Jahren, als Erkrankungen wie Tuberkulose noch häufiger waren, nahm das Aspergillom den ersten Platz unter den Aspergillosen ein. Auch heute kann es noch in 10-15% aller höhlenbildenden Lungenerkrankungen beobachtet werden (Addrizzo-Harris et al. 1997).

Das Aspergillom setzt sich aus Hyphen, Entzündungszellen, Fibrin, Schleim und Gewebetrümmern zusammen. Dieser "Pilzball" verbleibt in der Regel in der Kaverne, ohne das umliegende Gewebe zu infiltrieren. Als einziges Symptom weisen die Patienten daher meist nur eine milde Hämoptyse auf, die durch das Ruptuieren eines Blutgefäßes der Kavernenwand zustande kommt. Die Mehrzahl der Betroffenen ist jedoch asymptomatisch, so dass die Diagnose in der Regel nur zufällig durch eine CT- oder Röntgen-Thorax-Aufnahme gestellt wird. Die Kultivierung von Aspergillen aus Sputumproben gelingt nur in 50% der Fälle (McCarthy und Pepys 1973). Als Therapie hat sich die orale Gabe von Itraconazol aufgrund seiner guten Gewebegängigkeit als besonders wirksam herausgestellt (Campbell et al. 1991). In seltenen Fällen, wenn es zu starken Blutverlusten aufgrund rezidivierender Hämoptysen kommt, muss eine chirurgische Entfernung des Aspergilloms in Erwägung gezogen werden, ein Eingriff, der mit Letalitätsraten von 7 bis 23% nicht ungefährlich ist (Chen et al. 1997).

1.5.3.3 Die Invasive Aspergillose

Die Invasive Aspergillose bleibt fast ausschließlich auf immunsupprimierte Patienten beschränkt. In 90% der Fälle liegen zwei der folgenden drei begünstigenden Faktoren vor (Bennett 2005):

- Anhaltende Neutropenie (<500 neutrophile Granulozyten/ μ l im peripheren Blut)
- Therapie mit unphysiologisch hohen Dosen von Gukokortikoiden >3 Wochen

- Vorrausgegangene Therapie mit Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporin

Die hohen Inzidenzzahlen der Invasiven Aspergillose abhängig vom Grundleiden zeigt Tab. 1.

Grunderkrankung	Inzidenz der IA
Leukämie	5-25%
Nach allogener Stammzelltransplantation	5-10%
Nach cytotoxischer Behandlung einer hämatologischen Erkrankung oder autologer Stammzelltransplantation	0,5-5%
Organtransplantation (Herz-Lunge)	19-26%
Chronische Granulomatöse Erkrankung	25-40%
AIDS	1-12%

Tab. 1: Geschätzte Rate der Inzidenz einer Invasiven Aspergillose abhängig von der Grunderkrankung
(Latge 1999)

Die Invasive Aspergillose betrifft primär den unteren Respirationstrakt, die Nase mit ihren Sinus und die Haut, welche die Haupteintrittspforten des Pilzes darstellen. Infektionen des kardiovaskulären Systems, des ZNS und anderen Gewebes sind seltener und in der Regel Folge hämatogener Streuung oder kontinuierlicher Ausbreitung des Pilzes vom Primärherd aus. Da die Lunge den häufigsten und auch lebensbedrohlichsten Infektionsort bildet, beschränkt sich die Charakterisierung im Folgenden auf die Invasive pulmonale Aspergillose. Klinisch präsentieren sich die an einer IPA Erkrankten mit therapierefraktärem Fieber, Husten evtl. mit Auswurf, Dyspnoe, Gewichtsverlust und seltener mit Hämoptysen und Thoraxschmerzen. Da die klinischen Symptome sehr unspezifisch und in ihrer Ausprägung sehr variabel sind, reichen sie nicht aus, um eine sichere Diagnose zu stellen. Hochverdächtig ist jedoch das fehlende Ansprechen auf eine antibiotische Kombinationstherapie bei neutropenischen Patienten mit Zeichen einer pulmonalen Infektion.

1.5.3.3.1 Diagnostische Schwierigkeiten

Den Goldstandard der Diagnostik bildet noch immer die aufwendige histopathologische Untersuchung von Lungengewebe. Dieses kann entweder durch offene Lungenbiopsien, Thorakoskopien oder, je nach Lokalisation, durch perkutane, transtracheale bzw. transbronchiale Nadelaspiration gewonnen werden (Ruhnke et al. 2003). Voraussetzung für diese Untersuchung ist jedoch, dass bereits erste Veränderungen des Lungengewebes und damit biopsietaugliche Regionen mittels CT dokumentiert werden konnten. Typische frühzeitige Veränderungen im CT sind hierbei Parenchymverdichtungen in Form von 0,5-3 cm großen Noduli, Ringen (= Halo-Zeichen) oder in Keilen. Nach 2-3 Wochen kommt es zum Auftreten des Luftsichelzeichens (= air crescent) und zu Kavernenbildung. All diese Zeichen unterliegen einer hohen Variabilität und einem raschen zeitlichen Wechsel, so dass sie leicht übersehen werden können. Außerdem ist eine Differenzierung gegenüber anderen Mykosen und atypischen Pneumonien (z.B. durch *Pneumocystis jirovecii* oder den Cytomegalievirus) durch eine reine CT-Aufnahme nicht möglich (Brodoefel et al. 2005). Aus diesem Grund wird zusätzlich versucht, *A. fumigatus* aus Sputum kulturell oder mikroskopisch nachzuweisen. Diese Methode ist jedoch umstritten, da eine Kontamination durch die sich in der Luft befindlichen Sporen erfolgen kann. Dennoch deutet die Anzucht von *A. fumigatus* aus Sputum oder Bronchialsekret von Risikopatienten stark auf eine IPA hin (Yu et al. 1986).

Den größten Fortschritte in der Diagnostik hat in letzter Zeit der Nachweis von Aspergillus-Antigenen aus Serum, Urin und Bronchialsekret erbracht. Auch die Detektion von spezifischen Aspergillus-Serumantikörpern ist möglich (Weig et al. 2001; Schwiembacher et al. 2005), bei Immunsupprimierten jedoch von untergeordneter Rolle, da bei ihnen die Infektion nicht mit einem Antikörperanstieg korreliert.

Zur Zeit beschränkt sich der Antigennachweis auf ein Polysaccharid der Zellwand von *A. fumigatus*, dem Galaktomannan bzw. seinem Baustein der Galaktofuranose (Aufbau siehe Kapitel 1.3). Galaktomannan kann bereits in der Frühphase der Infektion, Tage bevor klinische Symptome oder Zeichen im CT auftreten, nachgewiesen werden und erlaubt so eine frühzeitige Diagnose (Marr et al. 2004).

Jedoch hat auch diese Methode ihre Unsicherheiten. So kann, aufgrund des Vorkommens von Galaktofuranose in fünf weiteren Nicht-*Aspergillus*-Arten (*Blastomyces dermatitidis*, *Nigrospora oryzae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichothecium roseum*), eine Infektion durch einen anderen Pilz nicht vollständig ausgeschlossen werden, auch wenn diese als sehr unwahrscheinlich anzusehen sind (Cummins et al. 2007). Des

weiteren kann eine vorherige Behandlungen mit Antibiotika wie z.B. Augmentan[®] (= Amoxicillin in Kombination mit Clavulansäure) oder Tazobac[®] (= Piperacillin in Kombination mit Tazobactam) ebenfalls zu einem falsch-positiven Ergebnissen führen (Mattei et al. 2004; Viscoli et al. 2004). Dies liegt an der semisynthetischen Herstellung von Amoxicillin und Piperacillin, die beide durch die Gewinnung aus Pilzen der Gattung *Penicillium* galaktomannankontaminiert sein können. Auch ist von einem gehäuften Vorkommen falsch-positiver Testergebnisse bei Neu- und Frühgeborenen (bis zu 83% im Gegensatz zu 5% bei Erwachsenen (Siemann et al. 1998) berichtet worden. Dies beruht wahrscheinlich auf einer übermäßigen Besiedelung der Darmes mit Bifidobakterien, welche ebenfalls Galaktofuranose in ihrer Zellmembran besitzen. Es wird angenommen, dass die Galaktofuranose bei Neugeborenen über die noch unreife Schleimhaut des Darmes in den Blutkreislauf gelangt und dort noch immer in so hoher Konzentration vorliegt, dass sie durch den Platelia-ELISA detektiert werden kann (Mennink-Kersten et al. 2005).

In der Regel wird zum Galaktomannannachweis ein Sandwich-ELISA (Platelia *Aspergillus* EIA, bioRad) verwendet, dessen monoklonaler Antikörper gegen Galaktofuranose gerichtet ist. Auf dem Markt existiert zusätzlich ein Latexagglutinationstest (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi-Diagnostic, Pasteur) zur Detektion von Galaktomannan. In zahlreichen Studien konnte jedoch seine Unterlegenheit gegenüber dem Sandwich-ELISA belegt werden, die v.a. auf einem niedrigeren positiv prädiktiven Wert* von 67% statt 95% beim ELISA basiert (Haynes und Rogers 1994).

Ein weiteres Polysaccharid, das ebenfalls zu diagnostischen Zwecken verwendet wird, ist das $\beta(1,3)$ -Glukan (als Fungitell-Test, Associates of Cape Cod Inc., auf dem Markt). Da $\beta(1,3)$ -Glukan nicht nur Bestandteil der Zellwand von *Aspergillus*-Spezies, sondern einer Reihe weiterer humanpathogener Pilze wie *Candida albicans*, *Pneumocystis jirovecii* ist, erlaubt dieser Test nur die Aussage über das Vorliegen einer Mykose, ohne die Spezies weiter einzuschränken (Miyazaki et al. 1995).

Unter den im Blut zirkulierenden Antigenen während einer IPA konnten auch einige Proteine entdeckt werden, von denen jedoch nur einige wenige genauer charakterisiert sind. Das am besten charakterisierte Protein ist das 18 kDa große Mitogillin, auch Ribotoxin oder AFPM1 genannt. Es konnte bereits mittels Western-Blot in Patientenseren nachgewiesen werden (Haynes et al. 1990; Latge et al. 1991). In Form eines kommerziellen Tests existiert es

* Der positiv prädiktive Wert gibt den Anteil der richtig als positiv erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als positiv erkannten Ergebnisse an.

jedoch bislang nicht.

Schließlich besteht noch die Möglichkeit mittels PCR DNA-Fragmente von *A. fumigatus* während der Infektion zu detektieren, entweder im Blut, in Urinproben oder BAL. Da DNA jedoch nicht aktiv vom Pilz in die Umgebung abgegeben wird, sondern erst mit Zelluntergang freigesetzt wird, ist die Detektion von DNA in Serum oder Urin erst in späteren Phasen der Infektion wahrscheinlich (Mennink-Kersten et al. 2006). Die PCR ist folglich kein sinnvolles Mittel zur Frühdiagnostik. Hingegen kann eine PCR hilfreich sein, wird sie in Kombination mit einem zweiten, sensitiveren Test wie z.B. dem Galaktomannan-ELISA eingesetzt. Da letzterer aus oben genannten Gründen des öfteren zu falsch positive Ergebnissen führt, kann die Spezifität durch die nachfolgende Durchführung einer PCR in der selben Serumprobe erhöht werden (Botterel et al. 2008). Anders verhält es sich mit der PCR-Diagnostik von Bronchialsekreten. Hier kann bereits frühzeitig DNA detektiert werden, wobei jedoch nicht zwischen einer echten Infektion und einer bloßen Kolonisierung unterschieden werden kann. Außerdem ist eine Kontamination der Proben durch in der Luft befindliche Sporen nicht auszuschließen. So wurden z.B. ca. 25% aller BAL-Proben von gesunden Probanden in der PCR als positiv getestet (Bart-Delabesse et al. 1997). Ein weiteres Problem ist, dass bis heute, anders als beim GM-Nachweis, kein standardisiertes PCR-Verfahren etabliert worden ist. Dies führt zu höchst inhomogenen Untersuchungsergebnissen der einzelnen Labors und macht es schwierig, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen (Tuon 2007).

1.5.3.3.2 Therapie

Eine antifungale Therapie muss sofort mit Auftreten des ersten Verdachts auf eine IPA eingeleitet werden. Als Therapeutikum der ersten Wahl galt lange Zeit das Polyene Amphotericin B. Polyene interagieren mit Ergosterin, einem Hauptbaustein der pilzlichen Zellmembran, und bewirken eine Erhöhung der Membranpermeabilität, die zum Zelluntergang führt. Da jedoch auch eine gewisse Affinität zu den Sterinen der menschlichen Zellmembran besteht, kommt es zu teils starken Nebenwirkungen, darunter Nephrotoxizität, Elektrolytstörungen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen (Bates et al. 2001).

Mittlerweile gilt als Medikament der ersten Wahl das neuere Breitspektrum-Triazol Voriconazol. Zum einen weist es eine höhere Wirksamkeit auf (Herbrecht et al. 2002), zum anderen wird es aufgrund geringerer Nebenwirkungen in der Regel besser vom Patienten toleriert. Sein Wirkmechanismus basiert auf der Blockade der Cytochrom P450-vermittelten Ergosterinsynthese, die schließlich in der Inhibierung des pilzlichen Wachstums mündet. Als Nebenwirkungen werden häufig Halluzinationen und Sehstörungen wie Photophobien

beobachtet. Durch den Metabolismus über das CYP450 muss allerdings beachtet werden, dass Voriconazol zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten wie Marcumar, Cyclosporinen, oder Statinen eingeht, die ebenfalls über CYP450 verstoffwechselt werden (Johnson und Kauffman 2003).

Als Reservemedikament steht seit einigen Jahren das Echinocandin Caspofungin zur Verfügung. Dieses wird entweder bei Nichtansprechen, oder wenn der Patient die anderen Antimykotika nicht verträgt, eingesetzt. Anders als die Azole greift es nicht in die Synthese der Zellmembran sondern der Zellwand durch Inhibierung der $\beta(1,3)$ -Glukan-Synthese ein. Dies hat zum einen den Vorteil, dass menschliche Zellen dadurch weniger beeinträchtigt werden, da diese selbst keine Zellwand besitzen. Zum anderen ist durch den unterschiedlichen Angriffspunkt eine Kombinationstherapie mit einem Azol-Antimykotikum denkbar (Walsh et al. 2008).

Trotz aller Fortschritte im pharmakologischen Bereich bleibt die Letalitätsrate von IPA-Patienten hoch. Daher kommt der Prophylaxe von *A. fumigatus*-Infektionen die größte Bedeutung bei. Vermeiden sollte man u.a. die Unterbringung von Risikopatienten in Krankenhausarealen, in denen zur gleichen Zeit Umbaumaßnahmen erfolgen, oder das Aufstellen von Topfpflanzen, da nachgewiesen ist, dass dies beides Quellen erhöhter Sporenfreisetzung sind (Arnou et al. 1991).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Schlüssel zur Prognoseverbesserung der Invasiven Aspergillose liegt im Wesentlichen in einer frühen Diagnose mit entsprechend rascher Therapieeinleitung (von Eiff et al. 1995). Der Nachweis von *Aspergillus*-Antigenen als diagnostisches Mittel ist vielversprechend und wird bereits seit einigen Jahren u.a. durch Nachweis von Galaktomannan im ELISA eingesetzt. Alle kommerziell erwerblichen Testverfahren haben jedoch einen Nachteil: Sie basieren auf dem Nachweis von Polysacchariden, die auch Bestandteil anderer Pilzspezies sind und ermöglichen dadurch keine *Aspergillus*-spezifische Diagnostik.

Einzelne Proteine als Antigene wären daher vermutlich besser geeignet, da die Proteinmuster der einzelnen Pilzspezies stark variieren und damit charakteristisch für einzelne Gattungen sind. Bisher sind jedoch erst wenige *Aspergillus-fumigatus*-spezifische Antigene bekannt die während der Infektion freigesetzt werden und damit im Patientenserum oder -urin detektierbar wären.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von sezernierte Proteine/Molekülen von *A. fumigatus*

und Überprüfung ihrer Antigenität. Die Proteinsekretion sollte in unterschiedlichen Kulturmedien analysiert und anschließend monoklonale Antikörper gegen dominante Proteine generiert werden. Einige dieser Antikörper sollten daraufhin auf ihre Wirksamkeit im Western-Blot, ELISA oder in der Immunfluoreszenz getestet werden. Abschließend ist der Aufbau einer zweistufigen Diagnostik das Endziel. Zum einen durch die Generierung bzw. Optimierung eines Galaktomannan-Assays, der eine hohe Sensitivität bezüglich *A. fumigatus* aufweist, zum anderen basierend auf dem Nachweis von *A. fumigatus* spezifischen Proteinen, die eine höhere Spezifität ermöglichen.

2 Methoden

2.1 Chemikalien

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

2.2 Gerätenachweis

CO ₂ -Brutschrank	Nunc
Drehrad	Bachofer
Densitometer	GS 800 BioRad
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser II
ELISA Reader	Tecan, Tecan Sunrise Reader
French-Press	SLM-Aminco
Geldokumentationsgerät	Herolab, E.A.S.Y bzw. BioRad
Gelkammer	Biometra
Kühlgerät	Thermo Haake
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001 K
Mikrobiologische Brutschränke	Heraeus, function line
Mikroskope	
Lichtmikroskop	Zeiss, Axiovert 25
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DM LB
Mikrowelle	Privileg
PCR Geräte	Biometra, T Gradient
	Biometra, Personal Cyclor
pH-Messgerät	Mettler, Toledo 320
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultraspec 3000

Pipettierhilfen	Brand, Accu-jet
Rollinkubator	Stuart Scientific SRT1
Schüttler	GFL, 3014
Schüttelinkubator	B.Braun Biotech, Certomat HK
Spannungsquelle	BioRad, Power pac 3000
Sterilbank	Heraeus, Hera safe
Taumler	GFL, 3014
	Heidolph Duomax 1030
Thermomixer	Eppendorf
SpeedVac	Savant, Speed Vac Concentrator
Vortexer	Scientific Instruments
Waagen	
Feinwaage	Mettler AE50
Grobwaage	Vibra Shinko Denski, HG Tuning Fork Scale
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Sigma 1-13, 6K15
	Eppendorf, 5417 C
	Heraeus, Megafuge 1.0R
	Cytospin: Shandon, Cytospin 3

2.3 Verwendete Aspergillus-Stämme

Wildtyp-Stamm	American Typ Culture Collection	Bezugsquelle
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 46645	Prof. A. Brakhage, Hans-Knöll-Institut, Jena
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 737	Stämme wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 826	
<i>Aspergillus giganteus</i>	DSM 1146	
<i>Aspergillus nidulans</i>	DSM 820	
<i>Aspergillus oryzae</i>	DSM 1862	
<i>Aspergillus flavus</i>		Stammsammlung des MvP
Δ PEP1-Mutante <i>Aspergillus fumigatus</i>		Dr. U. Reichardt, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen
Δ Galf-Mutante <i>Aspergillus fumigatus</i>		Dr. F. Routier, Medizinische Hochschule, Hannover

2.4 Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Stammnummer	Bezugsquelle
P3-X63-Ag8.653 (Murine Myelomzelllinie)	ATCC TIB-132	DSMZ Braunschweig

2.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz
Hly 3'	TCA GCG CTT CCT TCC AAC

ad 1000 ml H₂O_{dest}

Autoklaviert

Vor dem Gießen der Agarplatten wurde das Medium durch Autoklavieren sterilisiert (121°C, 3 bar, 20 min). In Zellkulturflaschen (Nunc Brand Products) mit 175 cm³ Kulturfläche wurden je ca. 100 ml des Mediums gefüllt und bis zum Erstarren waagrecht in den Kühlschrank gelegt. Anschließend wurde das Medium mit je 400 µl einer *A. fumigatus*-Sporenstamm suspension (10⁸ Sporen/ml H₂O_{dest}) beimpft und diese mithilfe steriler Glaskügelchen, Ø 4 mm (Sigma), unter Schwenken gleichmäßig über die Agaroberfläche verteilt. Es folgte die Inkubation über 5-7 Tage bei 37°C. Sobald sich ein dichtes, stark sporulierendes Myzel von grau-grüner Farbe gebildet hatte, wurden die Sporen geerntet.

2.7.2 Ernte der Sporen

In jede bewachsene Zellkulturflasche wurden sowohl 10 ml steriles 0,01% Tween 20, als auch ca. 5 sterile Glaskügelchen gefüllt. Durch intensives Schwenken lösten sich die Sporen vom Myzel ab, bis anschließend nur noch ein weißes Myzel übrig blieb. Daraufhin wurde die Sporensuspension durch einen zuvor autoklavierten, mit Miracloth-Filterpapier (Calbiochem) ausgekleideten Trichter gegossen und in 50 ml Falcon-Tubes aufgefangen, um die Sporensuspension von Myzelrückständen und Agarstückchen zu befreien. Als nächstes mussten die Sporen in den Falcon-Tubes bei 6000 x g für 20 min abzentrifugiert und in 15 ml H₂O_{dest} resuspendiert werden. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach konnte die Sporensuspension im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

2.7.3 Bestimmung der Sporenzahl

Die Sporenzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde aus der Sporensuspension eine 1:1000 Verdünnung hergestellt, von der 10 µl in die Zählkammer pipettiert wurden. Nach dem Auszählen von 4 Großquadraten konnte die Sporenkonzentration mit folgender Formel berechnet werden:

Sporen/ml = (Mittelwert aus 4 Großquadraten) x Verdünnungsfaktor (hier: 10³) x 10⁴

2.7.4 Kultivierung in flüssigen Medien

Die Kultivierung von *A. fumigatus* erfolgte in verschiedenen flüssigen Nährmedien:

Hefe-Glukose-Medium_{filtriert}
(YG_f-Medium):

5 g Hefeextrakt
20 g Glukose
ad 100 ml H₂O_{dest},
Autoklaviert

Aus diesen Bestandteilen wird zunächst ein 10-fach Konzentrat hergestellt, welches anschließend in einen Spectra/Por Dialyseschlauch (Spectrum) gefüllt und in einen Behälter mit 900 ml PBS gehängt wird. Es wird über Nacht bei 4°C gegen die Ausschlussporengröße von 6-8 mm filtriert. Am nächsten Tag wird der proteinfreie Überstand entnommen (die Hefe-Proteine verbleiben im Dialyseschlauch) und autoklaviert.

0,2%-Kollagen-Medium:

2 g schwer lösliches Kollagen Typ I aus Rinder-Achillessehnen (Sigma)
oder
2 g Kollagen Typ I aus Kalbshaut (Sigma)
50 ml 0,1 M Essigsäure
500 ml PBS
→ pH auf 6,5 einstellen
ad 1000 ml H₂O_{dest}
Autoklaviert

Um das schwer lösliche Kollagen in Lösung zu bringen, wurde es zuerst in einem Erlenmeyerkolben mit der Essigsäure vermengt, mit Alufolie abgedeckt und auf einem Magnetrührer auf ca. 60°C für 1 h erhitzt. Dann erst wurde das PBS hinzugefügt, der pH-

Wert eingestellt und auf 1000 ml mit H₂O_{dest} aufgefüllt.

Hämolysin-Medium: 35 g Glukose
 10 g Pepton
 8,5 g NaCl
 700 ml H₂O_{dest}
 → pH auf 5,5 einstellen
 ad 1000 ml H₂O_{dest}
 Autoklaviert

1%-Yeast-Medium: 10 g Hefe
 ad 1000 ml H₂O_{dest}
 Autoklaviert

2.7.4.1 Gewinnung von Myzel

Es wurde je 200 ml Medium in einen 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 100 µl der Sporenstamm suspension (1×10^{11} Sporen/ml) angeimpft. Die Inkubationszeit betrug ca. 72 h bei 37°C und ca. 180 UPM. Danach konnte das in Kugelform gewachsene Myzel vom Kulturüberstand separiert werden. Hierzu wurde die Pilzkultur in einen mit Miracloth-Membran (Calbiochem) ausgekleideten Filter gegossen und so die Myzelbällchen vom restlichen Medium abgetrennt. Um das Myzel abzutöten wurde es für 10 min mit 3,7% Formaldehyd inkubiert. Dieses wurde danach durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) vom Myzel abgetrennt und abpipettiert. Nach anschließender zweimaliger Waschung des Myzels mit PBS konnte es bei -20°C aufbewahrt werden.

2.7.4.2 Herstellung angeschwollener bzw. auskeimender Sporen

Um das Auskeimungsverhalten von *A. fumigatus* zu untersuchen, wurde die Inkubation der Sporen in den flüssigen Medien vorzeitig beendet. Für die Anzucht wurden zuerst je 50 ml des jeweiligen Mediums in einen 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben gefüllt, mit 200 µl der Sporenstamm suspension beimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Um angeschwollene Sporen zu erhalten, wurde nach 9 h die erste Probe à 2 ml entnommen. Diese wurde sofort mit 3,7% Formaldehyd für 10 min fixiert, anschließend abzentrifugiert und zweimalig mit PBS gewaschen. 24 h nach Animpfung wurde die zweite Probe à 2 ml entnommen um auskeimende Sporen zu erhalten. Diese wurden wie oben beschrieben fixiert und konnte nun bei -20°C aufbewahrt werden.

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihres spezifischen Molekulargewichtes erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page). Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet optimal an durch Hitze denaturierte Proteine und führt zur Entstehung von SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Die Eigenladungen der Proteine werden überdeckt, so dass eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld durch das netzartige Polyacrylamidgel möglich ist.

2.8.2 Molekulargewichtsstandard

Als Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus Protein Standard All Blue von BioRad verwendet (Abb. 3)

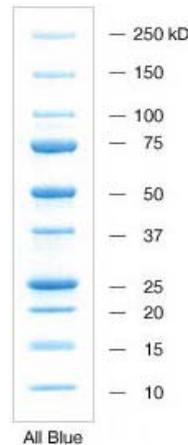


Abb. 3: Precision Plus Protein Standard All Blue (BioRad)

2.8.3 Eindimensionale SDS-Page

Für das Gießen von Gelen für die SDS-Page wurde ein Elektrophoresesystem von Biometra mit dem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli verwendet. Bei diesem System wird über das Trenngel noch ein Sammelgel gegossen. Das obere Sammelgel besitzt einen geringeren pH und durch eine geringere Acrylamidkonzentration auch eine größere Porengröße, als das Trenngel. Die Proteine wandern hier schnell und bleiben ohne Auftrennung als scharfe Bande erhalten, was später im Trenngel eine exaktere Bandenauftrennung begünstigt. Im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Je kleiner das zu detektierende Protein ist, desto feinporiger muss das Trenngel sein. Die Porengröße eines Gels ergibt sich durch die Endkonzentration an Acrylamid. Für die Auftrennung von Proteinen der Größe 10-60 kDa werden 15%ige Gele verwendet, während für größere Proteine 10%ige Gele eingesetzt werden.

Das Trenngel wurde zwischen zwei fixierte Glasplatten gegossen und bis zur Polymerisation mit Wasser überschichtet. Anschließend wurde das Wasser wieder entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm hineingesteckt, der zur Ausbildung von Taschen führte (entweder 10 Taschen à 20 µl oder 2 Taschen mit 10 µl und 200 µl Fassungsvermögen). Sobald auch das Sammelgel polymerisiert war, konnte das Gel in eine mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllte SDS-Page-Gelelektrophoresekammer eingespannt werden.

Um Proteine mittels SDS-Page auftrennen zu können wurde die Probenlösung 1+1 mit 2 x

Probenpuffer, bzw. 7+1 mit 8 x Probenpuffer vermischt und für 10 min bei 94°C und 800 rpm im Thermomixer (Eppendorf) erhitzt. Anschließend wurde der Kamm aus dem Sammelgel vorsichtig entfernt und 10-20 µl Probe in die Geltaschen pipettiert. Bis die Probe das Ende des Sammelgels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese bei 120 V durchgeführt. Danach konnte die Elektrophorese bei 200 V laufen gelassen werden. Sobald der Probenpuffer am unteren Rand des Gels in den Elektrophoresepuffer übertrat, wurde die Elektrophorese beendet.

Trenngel 15%ig:

3,6 ml H₂O_{dest}

3,8 ml 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8

7,5 ml 30% Acrylamid

150 µl 10% SDS

20 µl 25% APS

20 µl TEMED

Sammelgel:

2,9 ml H₂O_{dest}

1,25 ml 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8

0,85 ml 30% Acrylamid

50 µl 10% SDS

10 µl 25% APS

10 µl TEMED ⇒ ausreichende Menge für 3 Gele

2 x Probenpuffer:

10 ml Glycerin

5 ml 10% SDS

10 ml 500 mM Tris-Puffer, pH 6,8

1 ml Beta-Mercaptoethanol

10 mg Bromphenolblau

ad 10 ml H₂O_{dest}

8 x Probenpuffer:

10 ml Glycerin

5 ml 10% SDS

10 ml 500 mM Tris-Puffer, pH 6,8

1 ml Beta-Mercaptoethanol

10 mg Bromphenolblau

ad 10 ml H₂O_{dest}

10x SDS-Elektrophoresepuffer:

10 g SDS

30,3 g Tris

144 g Glycin

ad 1000 ml H₂O_{dest}

2.8.4 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Die Coomassiefärbung eignet sich, um schnell Proteinbanden im Gel darzustellen. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele vorsichtig mittels Skalpell von den Glasplatten abgelöst und in eine Färbeschale gelegt. Als nächstes wurden sie mit Coomassie-Färbelösung überdeckt und 1h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nachdem die Färbelösung abgegossen wurde und das Gel einmalig mit H₂O_{dest} gewaschen wurde, konnte es entfärbt werden. Dies dauerte solange, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren und der Hintergrund nahezu durchsichtig erschien. Schneller und besser gelang dies, wurde die Entfärbelösung mehrmals ausgewechselt.

<u>Coomassie-Brillant-Blau-R250-</u>	1 g Coomassie-Brillant-Blau-R250
<u>Färbelösung:</u>	400 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	500 ml H ₂ O _{dest}
<u>Entfärbelösung:</u>	400 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	500 ml H ₂ O _{dest}

2.8.5 Nachweis von Proteinen durch Antikörper mittels Western-Blot

2.8.5.1 Western-Blot

Beim Western-Blot werden Proteine aus der Polyacrylamid-Matrix eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. In dieser Arbeit wurde nur das Semi-dry-Verfahren mit Nitrozellulosemembran angewandt. Diese bindet die Proteine mittels hydrophober Wechselwirkungen an ihre Oberfläche, wodurch das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt.

Zu Beginn wurden 6 Whatmanpapiere (Schleicher und Schuell) und eine Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman Schleicher und Schuell) in Gelgröße ausgeschnitten und für 5 Minuten in Transferpuffer eingeweicht. Auf die untere Platte der Blotkammer wurden anschließend 3 feuchte Whatmanpapiere übereinander gestapelt und darauf die Nitrozellulosemembran gelegt. Das Gel wurde von den Glasplatten mit Hilfe eines Skalpell gelöst und möglichst luftblasenfrei auf der Membran platziert. Bedeckt wurde dies wiederum mit den drei übrigen Whatmanpapieren. Die Blotkammer wurde nun geschlossen und es konnte für eine Stunde bei 110 mA senkrecht zum Gel nach unten geblottet werden.

<u>Transferpuffer:</u>	3,03 g Tris
	14,4 g Glycin
	200 ml Methanol

umgesetzt und führt zu einer Blaufärbung der jeweiligen Banden. Dieser Prozess konnte durch den Austausch der Entwicklungslösung durch 2%ige Essigsäure gestoppt werden.

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

Entwicklungspuffer: 100 mM Glycin
1 mM ZnCl₂
1 mM MgCl₂
→ pH auf 10 einstellen

2.8.6 Entfernung von Albumin aus Patientenserum

Albumin ist eines der Hauptproteine im menschlichen Serum. Da es in sehr hoher Konzentration vorliegt, kann es die Möglichkeit Serumproteine über die SDS-Page aufzutrennen negativ beeinflussen. Daher wurden die Patientenserumproben mit dem Albumin-Removal-Kit von Pierce vorbehandelt, welches den Proben den Großteil des Albumins entzog.

2.8.7 ELISA

In dieser Arbeit wurde nur die Form des Sandwich-ELISA (ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay) angewendet. Bei diesem wird die ELISA-Platte mit einem „Fänger“-Antikörper beschichtet, der das zu detektierende Antigen an die Platte bindet. Die freien Bindestellen auf der Platte müssen jedoch vor Zugabe der zu testenden Lösung abgesättigt werden (z.B. mit 3% BSA). In einem weiteren Schritt gibt man sowohl die zu untersuchende Lösung als auch einen zweiten Antikörper hinzu, den sogenannten „Detektions“-Antikörper, der ebenfalls direkt an das Antigen bindet (siehe Abb. 4). Nicht gebundene Antigene und auch überschüssige Antikörper werden nach der Inkubationszeit von der ELISA-Platte

gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde zuvor mit einem Enzym markiert. Das in der Entwicklungslösung befindliche Substrat wird von diesem Enzym umgesetzt und kann durch Farbumschlag nachgewiesen werden. Diese Reaktion dient wiederum als indirekter Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Die Signalstärke ist im allgemeinen von der Antigenkonzentration abhängig, so dass ein ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

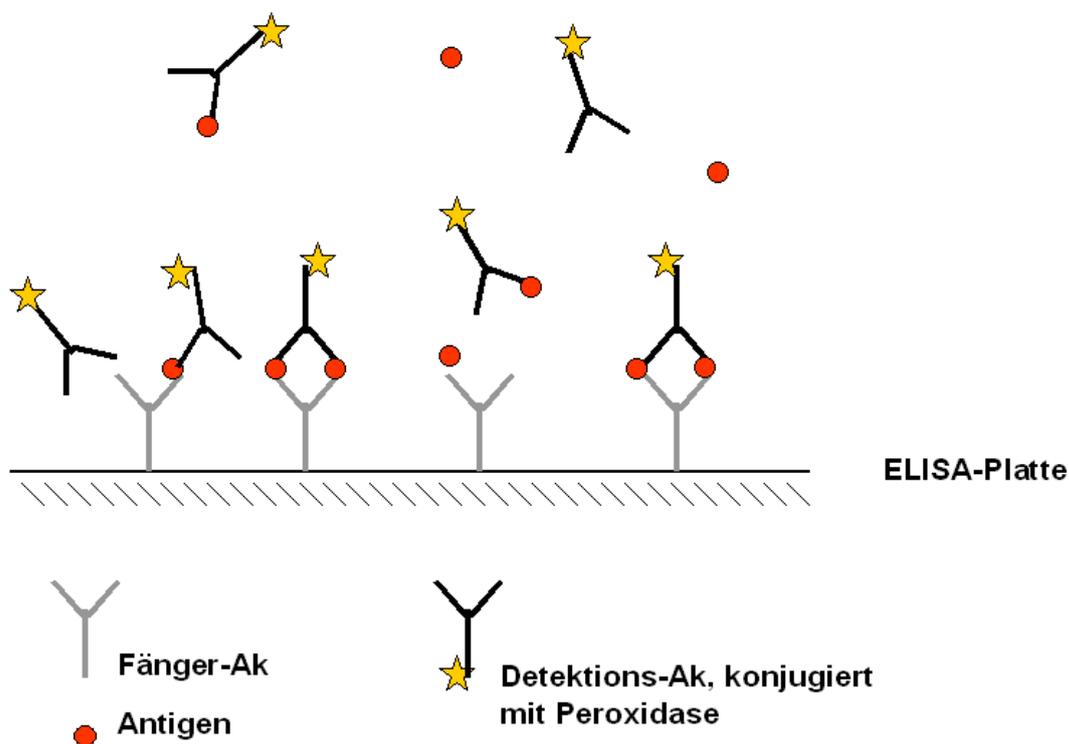


Abb. 4: Schema eines Sandwich-ELISAs

Hier ist in vereinfachter Form das Modell eines Sandwich-ELISAs dargestellt. Um das Antigen an die ELISA-Platte zu binden benötigt man einen sog. Fänger-Antikörper. Um anschließend das gebundene Antigen zu quantifizieren dient ein mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) konjugierter Detektions-Antikörper.

2.8.7.1 Sandwich-ELISA mit proteinbindenden Platten

Um die ELISA-Platten mit einem Antikörper zu beschichten wurden 96-Well MaxiSorp-Platten (Nunc) verwendet. Der Fänger-Ak wurde in der gewünschten Konzentration in dem Beschichtungspuffer verdünnt. Von dieser Lösung wurden in jede Vertiefung der ELISA-Platte 50 µl pipettiert und ÜN bei 4°C inkubiert oder bei 37°C für 2 h. Nachdem die

Beschichtungslösung wieder entnommen wurde, wurde die Platte mit 3% BSA in TBS-T für eine Stunde bei 37°C abgesättigt (200 µl je Well). Anschließend wurde die Blockierlösung entnommen und die Vertiefungen dreimalig mit je 200 µl TBS-T gewaschen. Als nächstes wurden zuerst 50 µl des Detektions-AK (in PBS verdünnt) in jedes Well pipettiert, darauf 50 µl der zu untersuchenden Lösung (z.B. Patientenserum). Nach 90 min Inkubation bei 37° und erneuter Waschung der Wells mit TBS-T konnten je Well 200 µl der Entwicklungslösung aus dem Platelia-Kit dazugegeben werden und für weitere 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert werden. Zum Beenden der Entwicklungsreaktion wurden je Well 100 µl der im Kit enthaltenen Stopplösung dazupipettiert und das Ergebnis daraufhin im Sunrise-Reader bei einer OD von 450/620 nm abgelesen werden.

Beschichtungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, pH 9,8

2.8.7.2 Sandwich-ELISA mit vorbeschichteten Platten

Es wurden Platten aus dem Kit „Platelia Aspergillus“ EIA (BioRad) verwendet. Diese sind bereits mit einem Ratten- α -Galaktomannan-Antikörper (EB-A2) vorbeschichtet. Als Detektions-Antikörper wurden entweder 50 µl der im Kit enthaltenen Antikörperlösung verwendet (EB-A2 konjugiert mit Peroxidase) oder 50 µl eines selbst produzierten monoklonalen Antikörpers, der ebenfalls mit Peroxidase konjugiert war.

Nachdem der Detektions-Antikörper in die Vertiefungen pipettiert worden war, wurde in jede Vertiefung 50 µl der zu untersuchenden Lösung hinzugefügt, z.B. Patientenserum. Die genaue Vorgehensweise richtete sich nach den Herstelleranweisungen des Kits. Abschließend konnte der ELISA mit der beiliegenden Entwicklungslösung inkubiert werden. Nach Zugabe der Stopplösung wurde die Reaktion beendet und der ELISA konnte bei einer OD von 450 nm/620 nm abgelesen werden.

2.8.7.3 Vorbehandlung von Seren für die ELISA-Diagnostik

Alle im ELISA analysierten Patientenserum wurden mit der im Platelia Aspergillus EIA-Kit enthaltenen 4%igen EDTA-Serumbehandlungslösung vorbehandelt. Durch die Hitzebehandlung unter Anwesenheit von EDTA können in den Proben enthaltene Immunkomplexe und Serumproteine gefällt und abzentrifugiert werden, die sonst eventuell

das Testergebnis stören würden.

Es wurden 300 µl Serum mit 100 µl der Serumbehandlungslösung in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt und 3 Minuten bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurden sie bei 10000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand für den ELISA verwendet.

2.8.8 Identifizierung und Charakterisierung von Überstandsproteinen

2.8.8.1 Gewinnung von Überstandsmedium

Um Überstandsproteine von *A. fumigatus* zu gewinnen wurden jeweils 200 ml der verschiedenen Medien (Kollagen-, Hly- und Sabouraud-Medium) mit 100 µl der Sporenstamm suspension (10^{11} Sporen/ml) angeimpft und für 72 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde das gewachsene Myzel vom Nährmedium abgefiltert, zuerst mittels Miracloth-Membran (Calbiochem), dann mittels feinporigerem Faltenfilter (GLW).

2.8.8.2 Aufkonzentrierung der Überstandsproteine mittels TCA-Fällung

Das filtrierte Überstandsmedium wurde auf 50 ml Falcons verteilt (höchstens 45 ml pro Falcon), mit 10% einer 100%igen TCA-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Dann wurden die gefällten Proteine mittels einer hochtourigen Zentrifuge bei 12000 rpm für 30 min vom Überstandsmedium getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in den Falcons bei RT für 1 h getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in je 50-100 µl Tris-Puffer resuspendiert.

2.8.8.3 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS

Nach erfolgreicher SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurden die zu identifizierenden Proteinbanden mit einem sauberen Skalpell vorsichtig aus dem Gel herausgeschnitten und einzeln in Eppendorfgefäße verschlossen. So wurden sie zum Labor für Proteinanalytik im Adolf-Butenandt-Institut, gebracht, wo sie nach einem Trypsinverdau über MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry) analysiert werden konnten. In diesem Verfahren wird das Analysat in eine Matrix eingebettet. Diese wird anschließend mit einem Laserstrahl beschossen, was die Matrix explosionsartig

verdampfen lässt und dazu führt, dass das Analysat in ionisierter Form freigesetzt wird. Die so entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Ankunft am Ende des Feldes detektiert. Anhand der Flugzeit kann die Masse des Ions berechnet und so Rückschlüsse auf das ursprüngliche Analysat gezogen werden.

Als Referenzwerte wurde eine MASCOT-Datenbank (http://www.matrixscience.com/search_form_select.htm) benutzt, in der die tryptischen Fragmentmuster aller im *Aspergillus fumigatus* Genom kodierten Proteine hinterlegt sind.

2.9 Molekulargenetische Methoden

2.9.1 Expression und Reinigung von rekombinanten His₆-Proteinen

2.9.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte verwendet. Hierzu werden kurze Oligonukleotidsequenzen, sogenannte Primer, benötigt, die komplementär an den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens binden. Diese Primer wurde von der Firma Metabion (München) synthetisch hergestellt.

Das PCR-Programm besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing (Primer-Anlagerung) und Elongation, die in 35 Zyklen nacheinander ablaufen. Die Denaturierung, bei der die Reaktionslösung kurzzeitig auf 95°C erhitzt wird, führt zur Auftrennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA in ihre beiden Einzelstränge. Anschließend wird die Lösung rasch auf 54°C abgekühlt, so dass die Primer sich an den jeweiligen komplementären Randbereich des zu amplifizierten Abschnittes des DNA-Einzelstranges anlagern können. Um eine Rehybridisierung der getrennten Template-DNA-Einzelstränge zu verhindern, werden Primer im Überschuss dazugegeben. Während der anschließenden Kettenverlängerung (= Elongation) bei 72°C verlängert die Taq-Polymerase die Primer am 3'-Ende. Da der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation mehrfach hintereinander abläuft und die neu gebildeten DNA-Fragmente in den Folgezyklen wieder als Matrizen dienen können, steigt die Kopienzahl der DNA-Zielsequenz exponentiell an. Innerhalb kurzer Zeit können auf diese Weise sehr viele DNA-Zielsequenzen erhalten werden. Als Template wurde cDNA von *A. fumigatus*-Stamm ATCC 46645 eingesetzt. Bei cDNA handelt es sich um eine auf DNA-Doppelstränge umgeschriebene mRNA. Dadurch enthält sie keine Introns mehr, was wichtig ist, da *E-coli* als Prokaryot nicht in der Lage wäre diese später herauszuspleißen.

Folgende Primer wurden für die PCR eingesetzt:

Name	Sequenz
Hly-3'	5'-TCAGCGCTTCTTTCCAAC-3'
Hly-5'	5'-ATGGCATCGGTCCAAGCT-3'

Tab. 2: In der PCR verwendete Primer

Für einen PCR-Ansatz von 20 µl bzw. 50 µl Gesamtvolumen wurden folgende Komponenten eingesetzt:

	Gesamtvolumen	50 µl	20 µl
Reaktions-Mix für eine Reaktion	Primer A	5 µl	2 µl
	Primer B	5 µl	2 µl
	Template	1 µl	0,5 µl
	Master-Mix	39 µl	15,5 µl
Master-Mix für eine Reaktion	Puffer PE	5 µl	2 µl
	dNTPs (je 2 mM)	5 µl	2 µl
	Taq Polymerase	0,5 µl	0,2 µl
	dd H ₂ O	28,5 µl	11,3 µl

Tab. 3: Komponenten eines PCR-Ansatzes

Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1:	First Delay	95°C, 10 min, 1 Zyklus
Schritt 2:	Primer-Anlagerung	50°C, 45 s, 35 Zyklen
Schritt 3:	Strangverlängerung	72°C, 2 min, 35 Zyklen
Schritt 4:	DNA-Denaturierung	95°C, 30 s, 35 Zyklen

Schritt 5:	Finale Primer-Anlagerung	50°C / 55°C, 45 s, 1 Zyklus
Schritt 6:	Finale Strangverlängerung	72°C, 10 min, 1 Zyklus
Schritt 7:	Lagerung	4°C, unendlich, 1 Zyklus

Heizdeckeltemperatur: 105°C

2.9.1.2 Agarose-Elektrophorese

Zur Auftrennung von linearen DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Agarose ist ein natürliches, lineares Polysaccharid, das als Gel eine Siebfunktion ausübt. Kleine DNA-Fragmente können die Poren des Agarosegels schnell durchdringen, während größere Fragmente nur langsam das Gel durchwandern können.

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1 g Agarose (Serva) mit 100 ml TAE-Puffer in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vermischt und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde aus der Lösung unter Verwendung einer Flachbettgelkammer (Eigenbau Werkstatt) und eines Kammes mit Zähnen ein Agarosegel mit Taschen gegossen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in eine Elektrophoresekammer (Eigenbau Werkstatt) gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. Nach der Entfernung des Kammes konnten die Taschen mit den jeweiligen Proben befüllt werden. In der ersten Tasche wurde stets 10 µl des Größenstandards „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas) aufgetragen, mit dessen Hilfe die Größe des zu identifizierenden DNA-Fragments bestimmt werden konnte. Je 7 µl PCR-Produkt wurde mit 2 µl „6x Loading Dye“ (MBI Fermentas) versetzt und in die anderen Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde für etwas 45 min eine Spannung von 90-130 V angelegt. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die DNA im elektrischen Feld vom Minus- zum Plus-Pol.

Wenn die DNA weit genug gelaufen war, wurden die Banden mithilfe eines DNA-bindenden Farbstoffes sichtbar gemacht. Hierfür wurde der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der sich zwischen die DNA-Basen einlagert und die DNA-Banden dadurch im ultravioletten Licht intensiv fluoreszieren lässt. Das Gel wurde für etwa 20 min in ein Ethidiumbromidbad der Konzentration 1 µg/ml gelegt und danach überschüssiges Ethidiumbromid für etwa 5 min im

Nach der Amplifikation und der Reinigung der DNA-Fragmente wurden diese in einen Expressionsvektor kloniert. Hierfür wurde das „QIAexpress UA Cloning Kit“ (Qiagen) verwendet. Dieses ermöglicht eine direkte Klonierung des Amplifikates in den Vektor pQE-30 UA (Abb. 6) ohne vorherigen Restriktionsverdau.

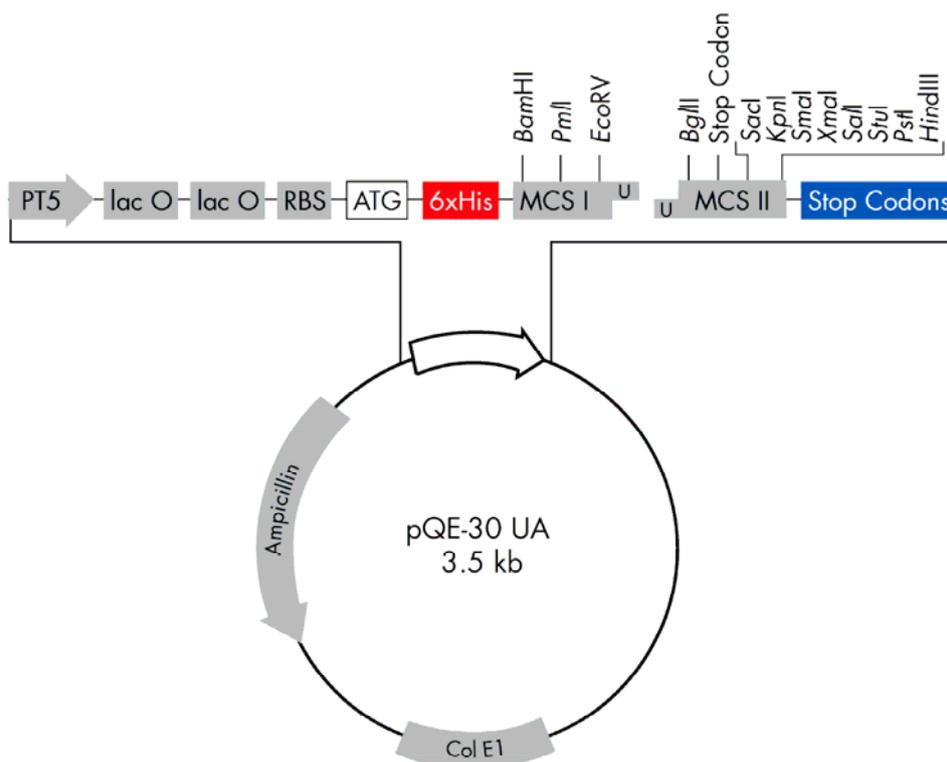


Abb. 6: Vektor pQE-30 UA von Qiagen (Quelle: www.1.qiagen.com/literature/vectors_pqe.aspx)

Der Expressionsvektor liegt bereits linear vor und besitzt an beiden 3'-Enden einen Überhang des Nukleotids Uridin. Das Amplifikat, welches mittels einer Taq-Polymerase hergestellt worden ist, die ohne „Proofreading“-Aktivität arbeitet, besitzt an seinen 3'-Enden einen Adenin-Überhang. Da Adenin und Uridin komplementär zueinander sind, ist eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Produkten und linearisiertem Vektor möglich. Die Orientierung des Inserts im Vektor ist jedoch in diesem Fall nicht zu steuern, da das Insert mit beiden Enden an beiden Uridin-Überständen des Vektors binden kann. Es kann daher sowohl in richtiger Orientierung, als auch in falscher ligieren. Die Orientierung des Inserts kann später anhand eines PCR-Screenings überprüft werden.

Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16°C inkubiert. Entsprechend den Herstellerempfehlungen wurde die Ligase anschließend für 10 min bei 72°C inaktiviert.

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

Der in der Mikrowelle verflüssigten LB-Agar wird bei einer Temperatur von ca. 50°C mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt (100 mg/l) .

2.9.1.6 PCR-Screening transformierter Bakterien zur Überprüfung der Anwesenheit und Orientierung des Inserts im pQE-30-Expressionsvektor

Um herauszufinden ob die transformierten Bakterien den Vektor samt Insert aufgenommen hatten und das Insert auch in der richtigen Orientierung vorlag, wurde ein PCR-Screening durchgeführt. Hierzu wurden der 3'- und 5'-Primer verwendet, mit denen auch die anfängliche PCR zur Amplifikation des DNA-Fragmentes durchgeführt worden war. Zur Überprüfung der Orientierung des Inserts im Expressionsvektor wurden zwei unterschiedliche PCRs angesetzt. In der einen wurde neben dem 5'-Primer, der komplementär zu einem Randbereich des Inserts ist, der pQE-30-5'-Primer verwendet, welcher außerhalb des Inserts komplementär an den Vektor bindet. In der anderen PCR-Reaktion wurde neben dem pQE-30-5'-Primer der 3'-Primer verwendet, der an den anderen Randbereich des Inserts komplementär bindet (siehe Abb. 7).

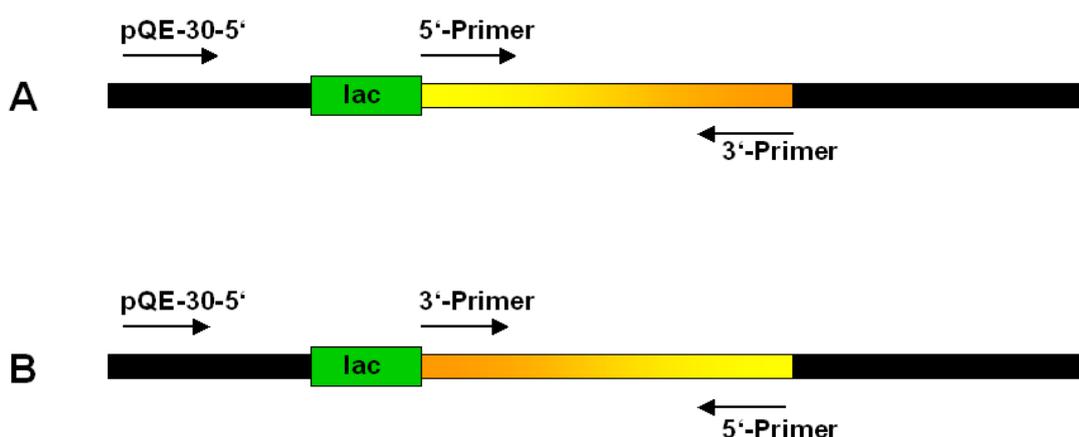


Abb. 7: Expressionsvektor mit Insert

Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE30 mit dem lac-Promoter (grün) und dem dahinter eingebauten Insert (gelb) in richtiger (A) und falscher (B) Orientierung.

Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 13 µl Master-Mix verwendet. Als Matrize diente eine kleine Probe der nach der Transformation über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien, die jeweils einzeln mit steriler Öse gepickt, im Mastermix suspendiert wurden. Es wurde das unter 2.3.1.1 beschriebene PCR-Programm verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert.

2.9.1.7 Isolierung von Plasmiden und DNA-Sequenzierung

Aus den in der PCR als positiv getesteten Bakterienklone wurde eine 50 ml ÜN-Kultur angesetzt. Mit Hilfe des „QIAprep Spin Midi Kit“ (Qiagen) wurde am nächsten Tag aus dieser das pQE-30 Plasmid mit Insert aufgereinigt. 60 µl der Plasmidlösung wurden an die Firma Agowa (Berlin) geschickt, die die Sequenzierung der Plasmid-DNA durchführte.

2.9.1.8 Induktionskulturen

Der pQE30-Expressionvektor verfügt über einen lac-Operator, der zur Initiation der Expression des rekombinanten His₆-Proteins von Bedeutung ist. Dieser lac Operator ist Teil des lac-Operons, der in *E.coli* die Verstoffwechslung von Laktose reguliert. Durch die Bindung eines Repressors an die Operatorstelle unterliegt er einer negativen Kontrolle. Bindet jedoch ein Induktor an den Repressor, verändert sich die Konformation des Repressors und er löst sich vom Operator, so dass die Transkription der dahinter liegenden Gene erfolgen kann. Unter natürlichen Bedingungen dient Allolaktose als Induktor. In vitro verwendet man stattdessen bevorzugt IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosidase), da es im Gegensatz zur Laktose nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt wird und deshalb seine Konzentration während eines Versuchs konstant bleibt.

Zur Induktion wurden von den in der PCR als positiv getesteten Einzelkolonien zunächst 3 ml-Kulturen in LB-Medium mit Carbpenicillin und Kanamycin (je 100 µg/ml) in 15 ml Falcon-Röhrchen angesetzt und ÜN bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 200 ml frisches LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 weiter inkubiert. Durch anschließende Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach 4 h bei 37 °C und 250 rpm den jeweils 500 µl pro Kultur abgenommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 5000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Das so gewonnen Pellet wurde

2.9.1.11 Reinigung des rekombinanten His₆-Proteins mittels Talon-Matrix

Das rekombinante Protein verfügt durch den verwendeten pQE30-Vektor über eine His₆-Sequenz am N-Terminus. Dies ermöglicht die spezifische Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Talonmatrix. Die Talon-Matrix (Clontech) besteht aus Sepharosepolymeren an die positiv geladene Metallionen (Kobalt) gekoppelt sind. Unter physiologischem pH binden die Histidine an diese immobilisierten Metallionen, was eine spezifische Aufreinigung von His₆-gekoppelten Proteinen ermöglicht. Die Aufreinigung von schwer löslichen bzw. unlöslichen Proteinen, die sich nach dem Zellaufschluss im Pellet befinden, erfolgt unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde das in 7 ml Extraktionspuffer suspendierte Pellet 20 min bei 4°C und 3000 xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml denaturierendem Extraktionspuffer resuspendiert. Dazu wurde die Suspension für 1 h auf Eis gerührt. Währenddessen wurde die Talon-Matrix vorbereitet. Hierzu wurden 800 µl der Talon-Matrix mit 5 ml Extraktions-/Waschpuffer in einem 15 ml-Falcon-Tube vermischt und mit 700 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt. Sobald sich die Pellet-Proteine im denaturierenden Extraktionspuffer gelöst hatten, wurden die noch unlöslichen Bestandteile (z.B. Zellwandreste) durch Zentrifugation entfernt. Nun konnte die Pellet-Suspension auf die vorbereitete Talon-Matrix gegeben werden. Zur Bindung der His₆-Proteine an die Matrix wurde das Falcon-Röhrchen verschlossen und für 2-3 h bei 4°C auf einem Rollmixer inkubiert. Hiernach wurde ungebundenes Protein durch dreimaliges Waschen der Talon-Matrix mit je 5 ml denaturierendem Extraktionspuffer entfernt.

Um das gebundene Protein zu eluieren wurde 1,5 ml denaturierender Extraktionspuffer, der 105 mM Imidazol enthält, zur Talon-Matrix gegeben und ÜN bei 4°C auf dem Rollmixer inkubiert. Die Imidazolmoleküle binden kompetitiv an die Talon-Matrix und verdrängen dadurch die rekombinanten His₆-Proteine. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren. Zur möglichst vollständigen Elution wurden weitere 1 ml Elutionspuffer zur Matrix pipettiert und für 1 h bei 4°C auf dem Rollmixer inkubiert. Auch die zweite Elutionslösung wurde anschließend abpipettiert und eingefroren. Aufgrund des hohen Gehalts an Guanidin-Hydrochlorid aus dem Elutionspuffer, welches die Laufeigenschaften im SDS-Gel erschwert, mussten die Proben vor der Analyse mittels Dialyse gegen PBS von diesem befreit werden. Dazu wurden 20 cm eines Spectra/Por Dialyseschlauches (Spectra) mit einer Ausschlussporengröße von 6000-8000 Da

zunächst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ für 30 min equilibriert. Anschließend wurden die Eluate in die Dialyseschläuche gefüllt, verknotet und in ein Becherglas mit ca. 200 ml PBS gegeben. Die Dialyse erfolgte ÜN bei schwachem Rühren. Die Proben wurden im Anschluss über SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. Western Blot analysiert.

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

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

2.9.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die Herstellung von Antikörpern gegen *A. fumigatus*-Überstandsproteine, wurden Überstandsproteinlösungen verwendet, die nach 2.2.6.2 aufbereitet wurden. Für die gezielte Herstellung von spezifische Antikörper wurden die Mäuse mit rekombinant hergestelltem Protein immunisiert.

2.9.2.1 Immunisierung der Mäuse

Zwei Balb/c-Mäuse wurden mit den jeweils vorbereiteten Antigenen nach folgendem Schema immunisiert:

Tag 1: Injektion von 250 μl Antigen (Überstandsproteinlösung), emulgiert mit 250 μl Freund'schem Adjuvans (Sigma)

Tag 14: Injektion wie Tag 1

Tag 28: Injektion von 250 µl Antigenlösung ohne Freund'sches Adjuvans

Tag 32: Entnahme der Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Anschneiden des Organs und anschließendes Durchspülen mit einer Spritze.

Vorab wurde die murine Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 in RPMI 1640-Medium (Invitrogen) expandiert, so dass zum Zeitpunkt der Fusion zehn bis zwölf dicht bewachsene Petrischalen mit Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zur Verfügung standen. Dies entsprach etwa 4×10^8 Zellen. Die Zellen wurden durch kräftiges Resuspendieren von den Schalen abgelöst, in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 950 U/min für 5 min (Heraeus Megafuge 1.0R) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in HEPES-Medium gewaschen und nochmal abzentrifugiert.

HEPES-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) mit 25 mM HEPES-Puffer (Biochrom), pH 7

RPMI 1640-Medium: RPMI 1640-Medium (Invitrogen) wird mit 5 % FKS (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und 10000 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) versetzt

2.9.2.2 Fusion

Für die Fusion wurden die Myelomzellen in HEPES-Medium aufgenommen, auf das Lymphozytensediment gegeben und beide Zelltypen durch Resuspendieren vermengt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 950 U/min (Heraeus Megafuge 1.0R) abzentrifugiert, der Überstand möglichst komplett entfernt und das Zellsediment durch leichte Schwenkbewegungen aufgelockert. Um die Temperatur während des Fusionsvorganges auf 37°C zu halten, wurde das Röhrchen während der nächsten Schritte in ein Wasserbad gehalten. Innerhalb von einer Minute wurde tropfenweise 1 ml PEG 4000 (Polyethylenglykol)-Lösung auf das Sediment gegeben, während das Röhrchen vorsichtig geschwenkt wurde. Nach einer weiteren Minute wurde das PEG langsam durch Zugabe von HEPES-Medium ausverdünnt: 1 ml in 30 Sekunden, 3 ml in 30 Sekunden und schließlich 16 ml innerhalb einer Minute. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert, dann bei 1000 g für 5

min abzentrifugiert, in 200 ml HA (Hypoxanthin/Azaserin)-Selektionsmedium aufgenommen und auf vorbereiteten 24-Well-Platten mit 1 ml pro Well ausplattiert. Für die nächsten 10 bis 14 Tage verblieben sie bei 37°C im CO₂-Brutschrank.

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

Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Selektionsmedium versorgt. Nachdem sich deutlich sichtbare Zellklone entwickelt hatten (ca. nach 8-10 Tagen, wenn Ø=1-3 mm) konnten deren Überstände auf das Vorhandensein monoklonaler Antikörper getestet werden.

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

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

2.9.2.3 Durchmusterung der Hybridomzell-Überstände

Die Durchmusterung der Hybridomüberstände hinsichtlich der Erkennung des gewünschten Antigens erfolgte mittels Western-Blot. Die hierfür benötigten SDS-Gele wurden mit speziellen Kämmen gegossen. Die Form der Kämmen war so gestaltet, dass sich im

Sammelgel nur zwei Taschen ergaben. Die kleine diente zum Auftragen des Markers, die große erstreckte sich über die restliche Breite des Gels und wurde mit dem gewünschten Antigen beladen. Nach dem Blotting wurde die Nitrozellulose-Membran für 1 h mit 3 % BSA in TBS-T abgesättigt und anschließend in einer speziellen Testkammer (Miniblotter, Biometra) eingespannt. Vorteil dieser Testkammer ist, dass bis zu 16 Antikörper-Überstände gleichzeitig getestet werden können. In jeden Schlitz der Kammer wurden 120 µl des jeweiligen Antikörper-Überstandes aufgebracht und nach 1 h Inkubation bei 37 °C wieder abpipettiert. Darauf wurde die Membran entnommen und 3 mal je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die weiteren Schritte wurden wie unter 2.8.5.3 beschrieben durchgeführt.

2.9.2.4 Klonierung Antikörper-produzierender Hybridomzellen

Die Klonierung dient dazu, die unterschiedlichen Zellklone einer Fusion zu vereinzeln. Dies ist wichtig, da sich nach der Fusion in den einzelnen Vertiefungen der 24-Well-Platte meist eine Ansammlung unterschiedlicher Zellklone befinden. Antikörperproduzierende Zellen können dadurch von anderen überwachsen werden und so verloren gehen. Ebenso kann ein als positiv getesteter Überstand auf polyklonalen Antikörpern basieren, da sich u.U. mehrere AK-produzierende Zellklone in einer Vertiefung befinden. Daher müssen die positiv getesteten Hybridomkulturen zunächst auf einer 6-Well-Platte in OPTI-MEM-Medium expandiert werden. Bei ausreichender Zelldichte wurde die Zellkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nun konnte mithilfe einer Verdünnungsreihe in OPTI-MEM jeweils eine 10 ml Zellsuspension mit den Zellkonzentrationen 100 Zellen/ml, 10 Zellen/ml und 1 Zelle/ml hergestellt werden. Indem anschließend pro Zellkonzentration je eine 96-Well-Platte mit je 100 µl Zellsuspension pro Well befüllt wurde, konnte man von einer Zellkonzentration von rechnerisch 10 Zellen/Well, 1 Zelle/Well bzw. 0,1 Zelle/Well ausgehen. Zusätzlich wurde in jedes Well 2 % Hybridoma Cloning Factor (Tebu-bio) hinzupipettiert. Nach ca. 14 Tagen waren deutlich Zellklone zu erkennen und Einzelzellklone anhand ihres Wachstumsmusters deutlich von Mehrzellklonen zu unterscheiden. Die Einzelzellklone konnten nun erneut wie unter 2.9.2.3 beschrieben auf ihre Antikörperproduktion hin durchmustert werden. Positive Klone wurden auf 24-Well-Platten, anschließend auf 6-Well-Platten umgesetzt und expandiert. Bei genügend hoher Zellzahl wurden die Zellen eingefroren.

OPTI-MEM-Medium: OPTI-MEM-Medium (Invitrogen) wurde mit 5 % FKS (Invitrogen), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und 10000 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) versetzt

2.9.2.5 Antikörpertypisierung

Um die Klasse eines Antikörpers zu identifizieren wurden die „Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents“ (Sigma) auf einer MaxiSorp ELISA-Platte verwendet. Dazu wurden die Platten mit den monoklonalen Antikörpern aus dem Kit, 1:1000 in Beschichtungspuffer (siehe 2.8.7.1) gelöst, für 3 h bei 37°C inkubiert (je 100 µl pro Well). Nach einem Waschschrift wurden sie, gemäß Herstelleranweisung, mit dem zu identifizierenden Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaliger Waschung mit je 200 µl TBS-T wurden sie für eine weitere Stunde mit einem α-Maus-AP-Ak bei RT inkubiert, erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und schließlich mit der Entwicklungslösung für 10 min inkubiert. Nun konnte bei einer OD von 450 nm das Ergebnis quantifiziert und damit der Antikörpersubtyp bestimmt werden.

Entwicklungslösung: 1 Sigma 104 Substrat Tablette in 5 ml ELISA-Entwicklungspuffer

Entwicklungspuffer: 9,7 ml Diethanolamin
100 µl 1 M MgCl₂
ad 1000 ml H₂O_{dest.} pH 9,8

2.9.2.6 Einfrieren von Hybridom-Zellen

Sobald die positiven Hybridomzelllinien ausreichend dicht herangewachsen waren, wurden sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in ihren Wells durch sanftes Pipettieren vom Boden gelöst, die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min (Heraeus Megafuge1.OR) abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium resuspendiert und mit je 500 µl pro Einfrier Röhrchen (Kryoröhrchen TPP) verteilt. Diese Röhrchen wurden anschließend in mit Isopropanol befüllten Einfrierdosen (Nalgene) für etwa einen Tag bei -80°C gelagert,

bevor sie in einen Stickstofflagertank überführt und dort langfristig aufbewahrt werden konnten.

Einfrriermedium: Fetales Kälberserum (Invitrogen) mit 8 % DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma)

2.9.3 Aufreinigung von Antikörpern aus Kulturüberstand

Um die Antikörper von den Proteinen der Zellkulturlösungen zu befreien, wurden diese mittels eines „IgM-Purification Kit“ (Thermo) gemäß der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Zuerst werden die Antikörper an einer Matrix gebunden, die ein Mannan bindendes Protein enthält. Überschüssige Proteine wurden herausgewaschen. In einem nächsten Schritt werden die gebundenen Antikörper mit einem im Kit enthaltenen Elutionspuffer wieder von der Matrix gelöst. Abschließend wurden sie in einer Dialyse Kassette (Slide-A-Lyzer von Thermo) ÜN gegen PBS dialysiert, um das im Elutionspuffer enthaltene Tris zu entfernen.

2.9.4 Aufkonzentrierung von Antikörperlösungen

Die nach der Reinigung gewonnene Antikörperlösung wurde mit Zentrifugenröhrchen (Centrifugal filter devices YM-10; Amicon) auf die gewünschte Konzentration gebracht. In den Röhrchen war eine Membran enthalten die nur Proteine bis zu einer Größe von 10 kDa durchlässt. Es wurde jeweils bis zu 2 ml Antikörperlösung in das Röhrchen pipettiert und so lange bei 3800 rpm bei 4°C zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht wurde. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Mithilfe eines Spectrophotometers (Nanodrop; Thermo) konnte nun die erreichte Proteinkonzentration gemessen werden.

2.9.5 Konjugation des Antikörperkonzentrates mit Peroxidase

Hierfür wurde die Antikörperlösung nach Aufreinigung auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ml gebracht und zur Firma Dianova (Hamburg) geschickt, die die Konjugation vornahm.

2.10 Zytologische Methoden

2.10.1 Präparation von Myzel für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzpräparate wurde Myzel verwendet, das nach 2.7.4 gewonnen wurde. Das Myzel wurde aufgetaut und mit einer Kanüle in kleine Fragmente zerteilt. Anschließend wurden je 20 µl der Myzellösung mittels Zentrifuge (Cytospin3, Shandon) auf einen Objektträger zentrifugiert (10 min bei 1000 rpm) und anschließend zum Antrocknen des Hyphenmaterials für 10 min bei 37°C gelagert.

2.10.2 Fluoreszenzfärbetechniken

2.10.2.1 Nachweis von Zuckern/Proteinen mithilfe der Immunfluoreszenz

Die zu färbenden Präparate wurden auf den Objektträgern in eine Färbeschiene (Shandon-Coverplate; Thermo) eingespannt und mit 3 % Ziegen Serum in PBS für 45 min bei 37°C abgesättigt. Anschließend konnten die Präparate mit dem Primär-Antikörper inkubiert werden (45 min bei 37°C). Hierzu wurden verschiedene Kulturüberstände der Hybridomzellen unverdünnt verwendet. Nach dreimaliger Waschung mit je 3 ml PBS wurden die Präparate für weitere 45 min bei 37°C mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Dazu wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierter Ziege- α -Maus-Antikörper in einer Verdünnung 1:200 in PBS verwendet. Es wurde anschließend erneut 3 mal mit PBS gewaschen und das Präparat mit einem Tropfen Fluoprep (bioMérieux) unter dem Deckglas versiegelt. Nach 10 minütiger Trocknung bei 37°C konnten die angefertigten Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.10.2.1.1 Verdau von Proteinantigenen mittels Proteinase-K

Um vor der Immunfluoreszenzfärbung etwaige Antigene in Proteinform zu beseitigen wurden die Myzelpräparate zuerst mit Proteinase-K verdaut. Hierzu wurden 200 µg Proteinase-K (Sigma) in 1 ml PBS gelöst und je 40 µl dieser Lösung auf die Präparate pipettiert und bei 37°C für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden sie drei mal in ein PBS-Bad getaucht, vorsichtig abgeschüttelt und an der Luft trocknen gelassen. Nun konnte die Immunfluoreszenzfärbung, wie unter 2.10.2.1 beschrieben, durchgeführt werden.

2.10.2.1.2 Oxidation von Zuckerantigenen mittels Natriumperjodat

Hierzu wurde eine 1 M Na-meta-Perjodat-Lösung in H₂O_{dest} angesetzt. Je 40 µl dieser Lösung wurden auf die jeweiligen Myzelpräparate pipettiert und für 3 h bei RT inkubiert. NaJO₄ bewirkt eine Ablösung der Zuckerstrukturen von der Hyphenoberfläche. Anschließend wurde die Lösung durch dreimalige Waschung mit PBS entfernt und die Objektträger an der Luft getrocknet.

2.10.2.1.3 Entfernung von Galaktofuranosereste durch HCl-Hydrolyse

Die effektive Entfernung der Galaktofuranose-Seitenketten von Galaktomannan mittels HCl-Hydrolyse wurde bereits bei (Latge et al. 1994) beschrieben. Dazu wurden 3-4 Myzelbällchen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1 ml einer 0,01 M HCl-Lösung hinzu pipettiert. Die Eppendorfgläser wurden in einen Thermomixer gestellt und bei 100°C ÜN inkubiert. Anschließend wurde die HCl-Lösung wieder vorsichtig abpipettiert und das Myzel 3 mal mit PBS gewaschen.

2.10.2.2 Calcofluor/Weiß-Färbung

Calcofluor/Weiß ist ein optischer Aufheller aus der Gruppe der Diaminostilbene, der unter UV-Licht weiß fluoresziert. Durch Interkalation geht Calcofluor starke, nicht-kovalente Bindungen mit β-glykosidisch verknüpften Polysacchariden ein. Diese Glykoside sind in Form von Chitin und Glukanen ein obligater Bestandteil der Zellwand von Pilzen, während sie im Menschen selbst nicht vorkommen. Aus diesem Grund eignen sie sich besonders zum Nachweis von Mykosen im Menschen (Ruchel et al. 2004).

Um Pilzstrukturen in histologischen Präparaten mit Calcofluor/Weiß nachzuweisen, wurden die Präparate für 10 min mit Calcofluor (Sigma) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS inkubiert und anschließend dreimalig mit PBS gewaschen. Nach der Versiegelung der Präparate mit einem Tropfen Fluoprep unter dem Deckglas und einer 10 minütigen Trocknungsphase bei 37°C konnten die Präparate unter dem Mikroskop untersucht werden.

2.10.2.3 Färbung von DNA mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Es lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an. Wird es anschließend mit UV-Licht angeregt, emittiert es ein bläuliches Licht.

Um DNA in den Sporen darzustellen, wurden die Präparate 10 min mit einer DAPI-Lösung in der Verdünnung 1:1000 in TBS-T inkubiert und anschließend drei mal mit PBS gewaschen. Anschließend konnten sie wie unter 2.10.2.1 beschrieben versiegelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von mediumabhängig sezernierten Proteinen

Der opportunistische Krankheitserreger *A. fumigatus* ist ein ubiquitär vorkommender saprophytärer Pilz (Kompost, Blumenerde, Lebensmittel). Um sich der jeweiligen Umwelt anpassen zu können, benötigt er eine Vielfalt unterschiedlichster Enzyme, mit deren Hilfe er die Polymere in seiner Umgebung in niedermolekulare Nährstoffe degradieren kann. Die Auskeimung der Sporen und das Hyphenwachstum ist daher immer mit der Sezernierung eines spezifischen Enzymmusters verbunden. Mithilfe dieser extrazellulären Enzyme ist *A. fumigatus* in der Lage organisches Material wie Kompost wiederzuverwerten. Aber auch unter Infektionsbedingungen im menschlichen Wirt spielen sezernierte Enzyme eine wichtige Rolle. So dienen beispielsweise eine Vielzahl an Kollagenase, Elastinasen und Proteasen der Invasion des Lungenepithels.

Um *in vitro* unterschiedliche Umweltbedingungen zu schaffen, wurden vier verschiedene flüssige Kulturmedien verwendet: Ein aus Hefe und Glukose bestehendes Vollmedium (YG_F), ein rein hefehaltiges Medium (1% Yeast-Medium), ein dem menschlichen Wirt angepasstes 0,2% kollagenhaltiges Medium (Coll, modifiziert nach Tomee et al., 1994) und ein Spezial-Medium (Hämolyisin-Medium), welches neben Glukose noch Pepton und NaCl enthielt (nach Ebina et al., 1985). Alle Flüssigmedien wurden mit der selben Sporenmenge beimpft und unter gleichen Kulturbedingungen inkubiert. Die Kulturüberstände wurden anschließend vom Myzel getrennt und mittels TCA gefällt. Das Pellet wurde in Probenpuffer gelöst und über SDS-Page aufgetrennt. Das nach Coomassie-Färbung sichtbare Proteinbandenmuster war jeweils hochspezifisch für das entsprechende Kulturmedium. Einzelne dominante Banden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels der MALDI-TOF-MS im Zentrallabor für Proteinanalytik unter Abgleich mit der MASCOT-Proteindatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) identifiziert.

3.1.1 Sezernierte Proteine in YG_F-Medium

Die dominierenden im YG_F-Medium sezernierten Proteine waren das Aspergillopepsin 1 (PEP1) (Bezeichnung des Genortes: AFUA_5G13300) mit einer Größe von ca. 37 kDa und

sein Abbauprodukt (ca. 22 kDa) (vgl. Abb. 8). PEP1 wurde bereits als sekretiertes Protein beschrieben (Reichard et al. 1994) und unter Verwendung des Programmes Signal-P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) konnte gezeigt werden, dass PEP1 ein Signalpeptid besitzt.

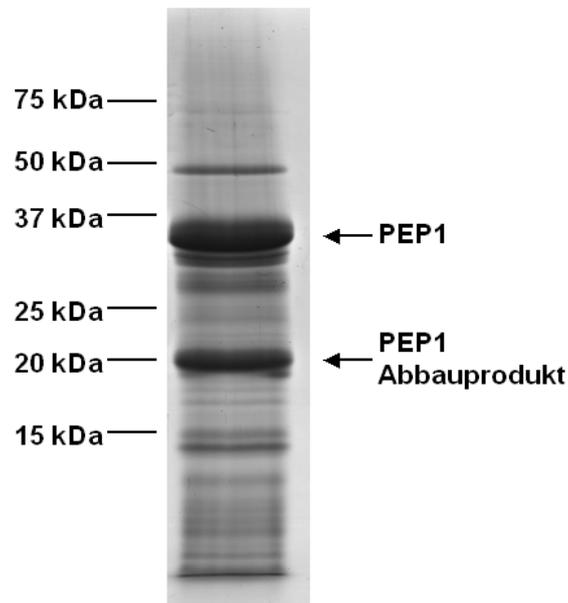


Abb. 8: YG₇-Kulturüberstand von *A. fumigatus* nach TCA-Fällung

Es dominiert ein 37 kDa großes Protein, das durch MALDI-TOF-MS als Aspergillopepsin 1 (PEP1) identifiziert wurde.

3.1.2 Sezernierte Proteine im Coll-Medium

Das Bandenmuster der sezernierten Proteinen im Kollagenmedium konnte durch die Verwendung von unterschiedlichen Kollagenprodukten leicht variiert werden. Neben einem als unlöslich beschriebenen Kollagenprodukt (*insoluble collagen Typ 1 from bovine achilles tendon*; Sigma) wurde auch eine lösliche Kollagenpräparation verwendet (*soluble collagen Typ 1 from calf skin*; Sigma). Es fand sich eine Vielzahl von Banden in den beiden Überständen, die im Wesentlichen jedoch ein ähnliches Muster aufzeigten (vgl. Abb. 9).

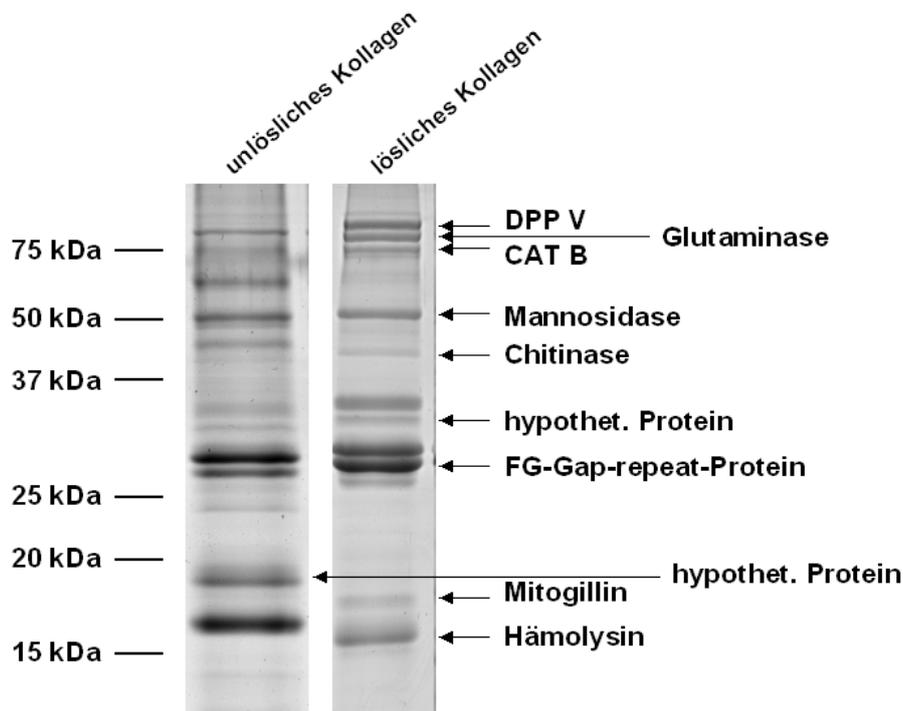


Abb. 9: Kollagenkulturüberstand (Spur 1 aus unlöslichem Kollagen, Spur 2 aus löslichem Kollagen)

Im SDS-Gel fanden sich beim Vergleich der beiden Kulturüberstände leichte Unterschiede in der Proteinseznernierung. Insgesamt konnten 10 Proteine sicher identifiziert werden.

Insgesamt konnten zehn Proteine durch MALDI-Analyse identifiziert werden (siehe Tab. 4). Ein ca. 17 kDa Protein konnte als sogenanntes Hämolysin identifiziert werden, ein 18 kDa Protein wurde als Mitogillin und ein ca. 19 kDa großes hypothetisches Protein als mutmaßliches Zellwandprotein identifiziert. Mit ca. 30 kDa fand sich ein FG-Gap-repeat-Protein, mit ca. 33 kDa ein ebenfalls noch hypothetisches Protein, mit 45 kDa die Chitinase ChiB 1, mit 55 kDa fand sich die Mannosidase 1, mit 75 kDa die Catalase B (CAT B), mit 80 kDa die Glutaminase A und mit 85 kDa die Dipeptidylpeptidase 5 (DPP 5). Die übrigen Banden konnten aufgrund ihrer geringen Ausprägtheit oder ihrer Nähe zu anderen Banden nicht sauber ausgeschnitten und damit auch keinem Protein zugeordnet werden.

Name des Proteins	Laufgröße im SDS-Gel	Größe in AS	Bezeichnung des Genortes	N-terminale Signalsequenz
Hämolysin	17 kDa	139 AS	AFUA_3G00590	Nein
Mitogillin	18 kDa	176 AS	AFUA_5G02330	Ja
Hypothetisches Protein	19 kDa	180 AS	AFUA_3G01130	Ja
FG-Gap-repeat-Protein	30 kDa	307 AS	AFUA_1G04130	Ja
Hypothetisches Protein	33 kDa	265 AS	AFUA_5G02100	Nein
Chitinase B1	45 kDa	433 AS	AFUA_8G01410	Ja
Mannosidase 1	55 kDa	493 AS	AFUA_1G14560	Ja
Catalase B	75 kDa	728 AS	AFUA_3G02270	Ja
Glutaminase A	80 kDa	691 AS	AFUA_3G07030	Ja
Dipeptidylpeptidase V	85 kDa	721 AS	AFUA_2G09030	Ja

Tab. 4: Mittels MALDI-TOF-Analyse identifizierte Proteine aus dem Kollagenkulturüberstand.

Die weitere Analyse der Proteine mittels des Programms Signal-P ergab, dass sowohl Hämolysin (Abb. 10), als auch das 33 kDa große hypothetische Protein keine Signalsequenz besitzen, obwohl es sich um sekretierte Proteine handelt (vgl. Abb. 10 und Abb. 11). Dies deutet daraufhin, dass es für diese beiden Proteine einen alternativen Sekretionsmechanismus geben muss.

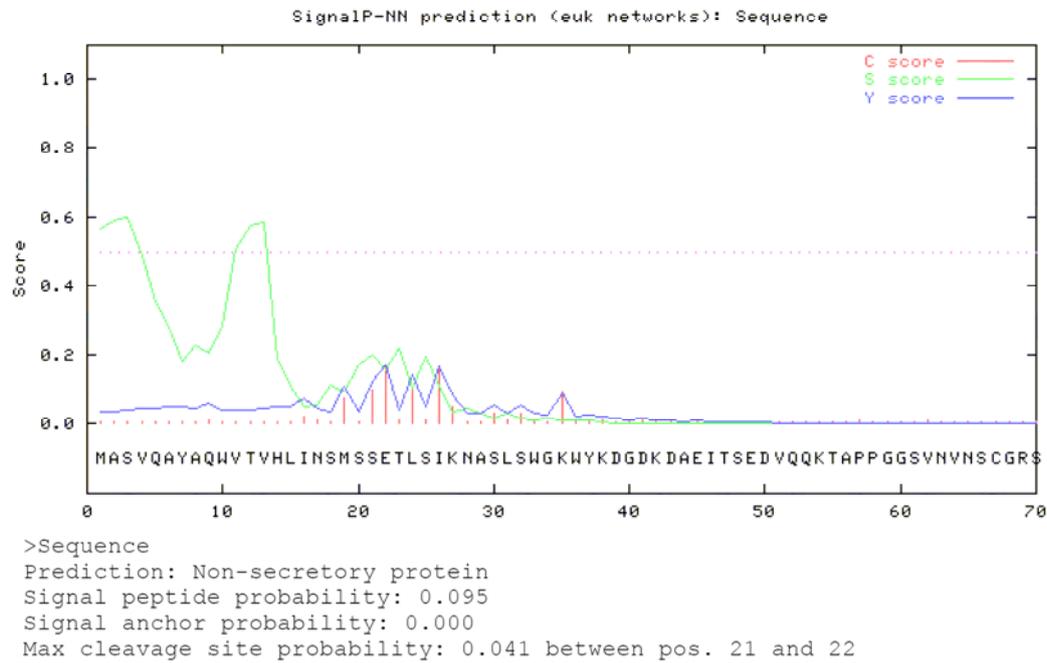


Abb. 10: Signalpeptidvorhersage für das Protein Hämolsin mittels Signal-P:

Das Programm Signal-P konnte kein Signalpeptid im Protein Hämolsin von *Aspergillus fumigatus* finden.

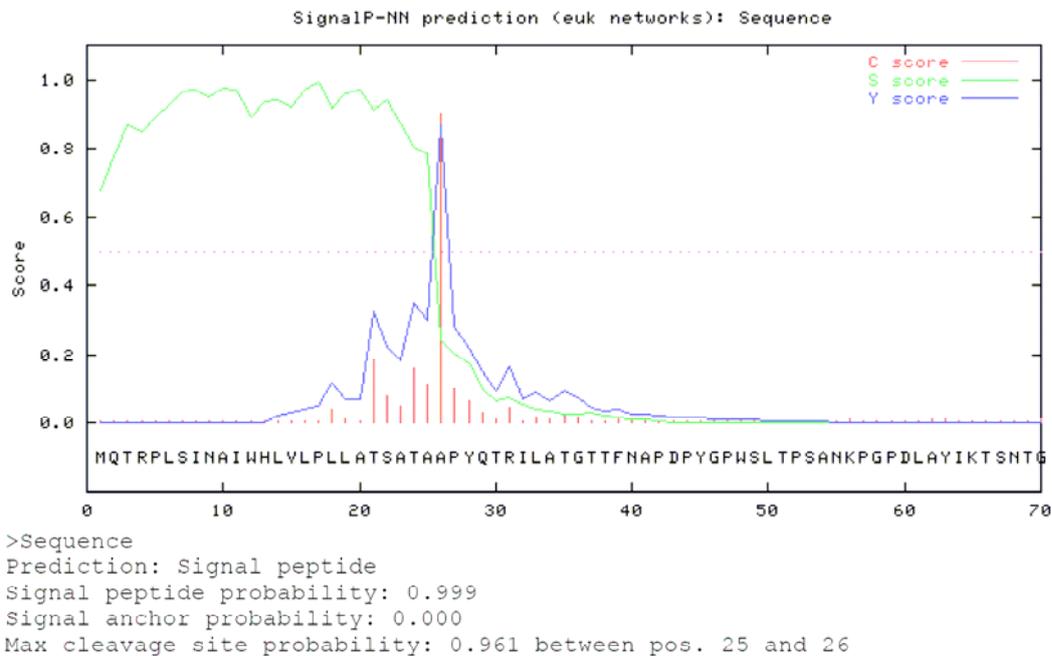


Abb. 11: Signalpeptidvorhersage für das FG-gap-repeat-Protein mittels Signal-P:

Das Programm Signal-P konnte für das FG-Gap-repeat-Protein ein Signalpeptid identifizieren.

3.1.3 Sezernierte Proteine in Hly-Medium

Als Hly-Medium wird ein Medium bezeichnet, dass von Ebina et al (1985) beschrieben wurde. In diesem soll eine nachweisbare Sekretion von Hämolysin ins Medium stattfinden.

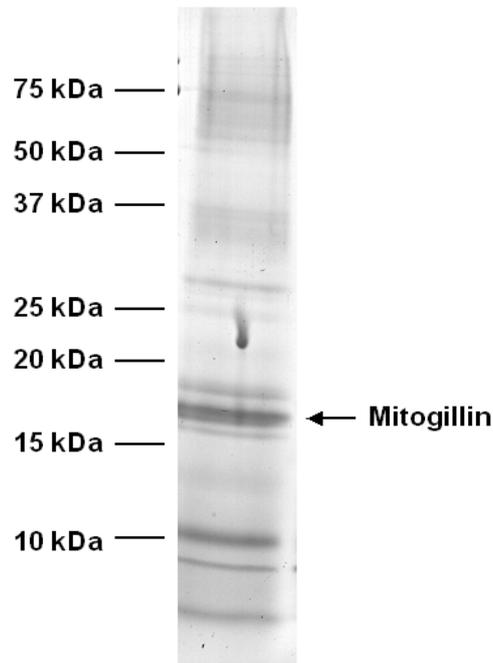


Abb. 12: Hly-Kulturüberstand

Das ca. 18 kDa große Protein konnte mittels MALDI-TOF als Mitogillin identifiziert werden

Im Hly-Kulturüberstand wurde nur eine Bande mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Bei einer Größe von ca. 17 kDa wurde angenommen, dass es sich hierbei um das mutmaßliche Toxin Hämolysin handelt. Die MALDI-TOF-Analyse identifizierten es jedoch eindeutig als das Allergen und Ribotoxin Mitogillin, das auch als Asp f1 bezeichnet wird. eine verstärkte Sekretion von Hämolysin war in diesem Medium nicht nachweisbar.

3.1.4 Sezernierte Proteine in 1%-Y-Medium

Auch hier konnte aufgrund der Bandendichte nur eine Bande sauber ausgeschnitten und analysiert werden. Es fand sich mit einer Größe von ca. 30 kDa ein sogenanntes FG-GAP-repeat-Protein.

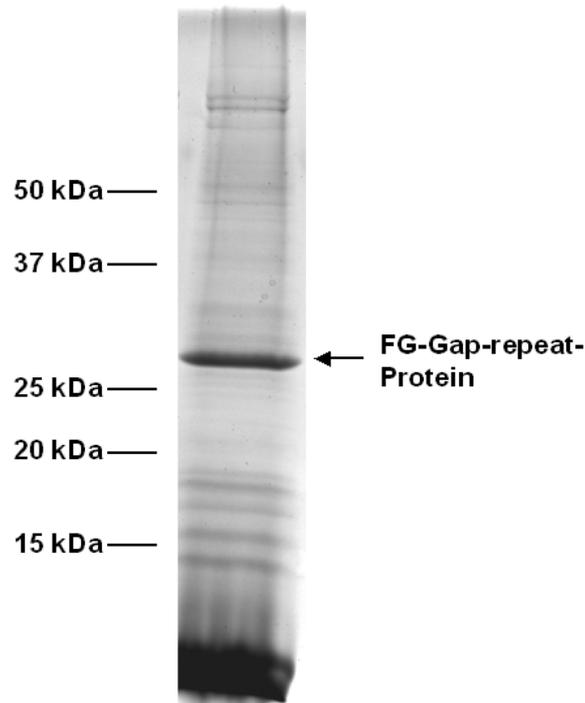


Abb. 13: 1%Y-Kulturüberstand

Es konnte ein ca. 30 kDa großes Protein mittels MALDI-TOF als FG-Gap-repeat-Protein identifiziert werden.

3.2 Aspergillopepsin 1 (PEP1)

Ein YG_r-überstandsspezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa (siehe Abb. 8) wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-MS als Aspergillopepsin 1 (auch PEP1, Aspergillopepsin f oder Asp f 10 genannt) identifiziert. Dieses Enzym gehört zur Gruppe der Aspartylproteasen (PEP). Neben dieser Gruppe besitzt *A. fumigatus* eine Vielzahl weiterer sekretierter Proteasen (siehe Anhang, Tab. 7), u.a. die Serin- (ALP) und Metalloproteasen (MEP). Noch vor einigen Jahren wurde angenommen, dass diese drei Proteasegruppen für die Invasion des Pilzes in angrenzendes Gewebe verantwortlich sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Wildtyp-Stämme mit einer hohen proteolytischen Aktivität auch eine stärkere Pathogenität im Tiermodell aufweisen, als Stämme mit einer niedrigen proteolytischen Aktivität (Kothary et al. 1984). Jedoch führte das Ausschalten des PEP1-Gens, ebenso wie es bei dem Ausschalten des MEP- und ALP-Gens zu beobachten war (Jaton-Ogay et al. 1994), zu keiner Virulenzminderung (Reichard et al. 1997). Dies deutet darauf hin, dass die Proteasen anders als ursprünglich angenommen weniger in der Pathogenität, als im biologischen Abbau von Nährstoffen von Bedeutung sind. Des

weiteren zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Expression von PEP1, anders als bei den Serin- und Metalloproteasen, nicht durch Kollagen induzierbar zu sein scheint, obwohl PEP1 in mit *A. fumigatus* infiziertem Lungengewebe nachgewiesen worden ist und es dort Kollagen, Elastin und Laminin, die 3 wichtigsten Matrix-Proteine der Lunge hydrolysieren kann (Lee und Kolattukudy 1995). So war im Kulturüberstand des Kollagenmediums (siehe Abb. 9) kein PEP1 nachweisbar.

3.2.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen PEP1

Nachdem der YG_F-Kulturüberstand mittels TCA-Fällung aufkonzentriert worden war, konnten zwei BALB/c-Mäuse mit diesem nach dem in 2.9.2.1 beschriebene Schema immunisiert werden. Da PEP1 das dominante Protein des YG_F-Überstandes war, konnte davon ausgegangen werden, dass es auch die stärkste Immunreaktion in den Mäusen auslösen würde. Nach der Fusion der Mäuse-Lymphozyten mit den Myelomzellen und ausreichender Inkubationszeit konnten die Überstände der Hybridomzellen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion durchmustert werden. Dafür wurde TCA-gefällter YG_F-Kulturüberstand in einem zweiseitigen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Daraufhin wurde die Membran, wie in 2.9.2.3 beschrieben, in einer Miniblot-Kammer eingespannt und konnte mit den Zellkulturüberständen inkubiert werden. Abschließend wurden die Blots mit einem Ziege- α -Maus-IgG/IgM-AP-Antikörper inkubiert und mit einem BCIP-Puffer entwickelt. Es fanden sich 4 Kulturen, deren Antikörper das 37 kDa große PEP1 erkannten. Eine von ihnen, Kultur Y-1, wurde zweimal nach Protokoll 2.9.2.4 vereinzelt, auf frischen 96-Well-Platten verteilt und erneut hochgezüchtet, um monoklonale Kulturen und damit monoklonale Antikörper (mAk) zu erhalten. Diese wurden wiederum mittels Western-Blot-Analyse durchmustert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Kultur Y-1-19-24 die gewünschten Antikörper produzierte (vgl. Abb. 14).

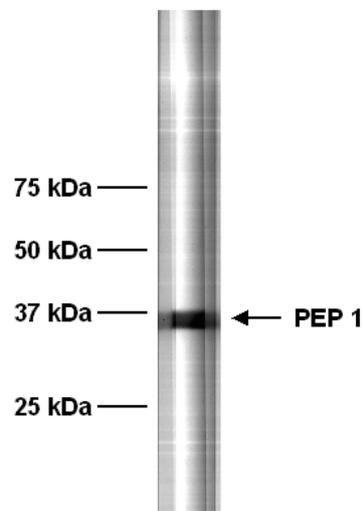


Abb. 14: Ak Y-1-19-24 erkennt PEP1

Blot von YG_r-Kulturüberstand gefärbt mit dem monoklonalen Antikörper Y-1-19-24

3.2.2 Testen der PEP1-Antikörper auf einer PEP1-Deletionsmutanten

Um sicherzugehen, dass die Antikörper der Kultur Y-1-19-24 auch wirklich gegen PEP1 gerichtet sind und nicht gegen ein anderes, ähnlich großes Protein, wurden Sporen des Stammes D141 und seiner PEP1-Mutanten (Δ PEP1) in YG_r-Medium gezüchtet und deren TCA-gefällten Überstände mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abb. 15).

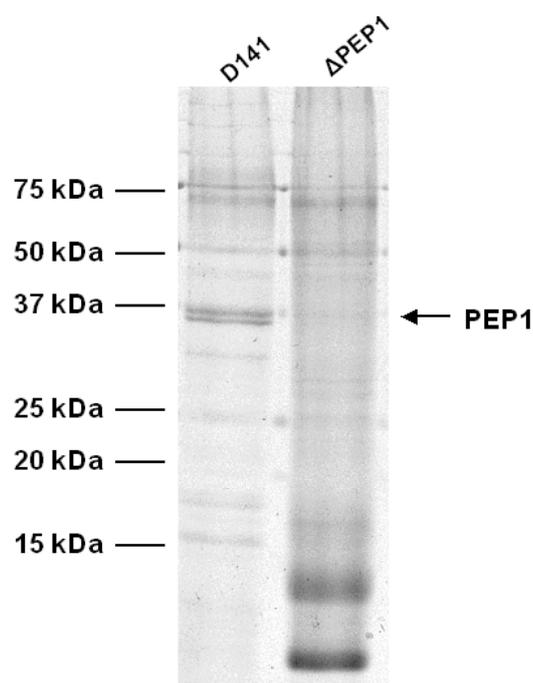


Abb. 15: Überstandsproteine von der PEP1-Mutante (Δ PEP1) im Vergleich zum Ausgangsstamm D141

Im Gegensatz zum Stamm D141 ist bei der Mutante keine dem Aspergillopepsin 1 entsprechende Proteinbande von ca. 37 kDa im YG_r-Kulturüberstand zu erkennen.

Ein parallel hergestelltes Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und nach dem Protokoll 2.8.5.3 inkubiert, wobei als Primärantikörper Kulturüberstand der Hybridomazellen Y-1-19-24 diente. Es konnte gezeigt werden, dass der mAk Y-1-19-24 bei der PEP1-Mutante keine Proteinbande erkennen konnten, während er beim Wildtyp im Bereich von 37 kDa eine Doppelbande färbte (vgl. Abb. 16). Dies bewies, dass der Antikörper spezifisch gegen PEP1 gerichtet war. Die Doppelbande geht vermutlich auf eine proteolytische Verkürzung zurück. Es wurde eine Abspaltung des N-terminalen Signalsequenz (AS 1-29) und eine weitere Aktivierung nach Abspaltung der AS 30-70 durch Sequenzanalyse vermutet (<http://www.uniprot.org/uniprot/P41748>).

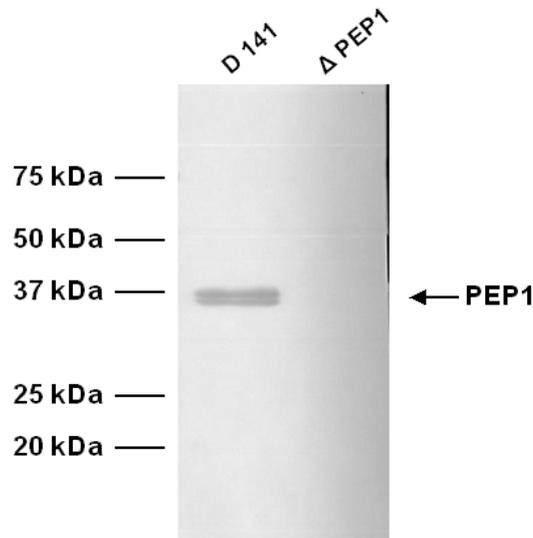


Abb. 16: Erkennung des Aspergillopepsins durch den Antikörper Y-1-19-24

Im YG_r-Kulturüberstand des Stammes D141 erkennt der mAk Y-1-19-24 eine 37 kDa große Bande, während er im Überstand der PEP1-Mangelmutante (Δ PEP1) nichts detektiert.

3.2.3 Suche nach PEP1 in andern Kulturüberständen

Es fiel bereits beim Vergleich der unterschiedlichen Kulturüberstände auf, dass die PEP1-Sekretion scheinbar nicht durch Kollagen induzierbar ist (siehe 3.1.2). Dies sollte im folgenden durch Analyse des Proteinbandenmusters des Kollagenüberstandes bestätigt werden. Dazu wurde der Kollagenkulturüberstand mittels SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anhand von Western-Blot-Analyse wurde versucht PEP1 durch den PEP1-Antikörper Y-1-19-24 nachzuweisen. Es stellte sich heraus, dass es zu keiner sichtbaren Färbung des Blots kam (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass Kollagen zu keiner Induktion der PEP1-Sekretion führt.

3.2.4 Testung des Anti-PEP1-Antikörpers auf Patientenseren

Da angenommen wird, dass PEP1 wie auch die anderen Proteasen von *A. fumigatus* u.a. für die Invasion des Pilzes in Wirtsgewebe zuständig ist und PEP1 bereits während der Infektion im Lungengewebe nachgewiesen worden war, sollte hier getestet werden, ob PEP1 auch in Seren von Patienten mit einer Invasiven Aspergillose detektiert werden kann. Dazu wurden die Patientenseren zuerst weitgehend von Albumin befreit (siehe 2.8.6), bevor sie über SDS-

Page aufgetrennt wurden. Anschließend wurde mittels Western-Blot-Analyse (siehe 2.8.5) versucht PEP1 in den einzelnen Seren zu detektieren. Hierzu wurde als Primärantikörper der mAk Y-1-19-24 verwendet, als sekundärer Ak diente ein α -Maus-AP-Antikörper. Die Entwicklung des Blots zeigte, dass der PEP1-Ak keine Banden im Serum spezifisch erkennen konnte. Stattdessen färbten sich Banden in Höhe von ca. 25 kDa, 45 kDa, 85 kDa und 150 kDa kräftig an. Offensichtlich handelt es sich hierbei lediglich um eine Kreuzreaktion mit Serumproteinen der Patienten.

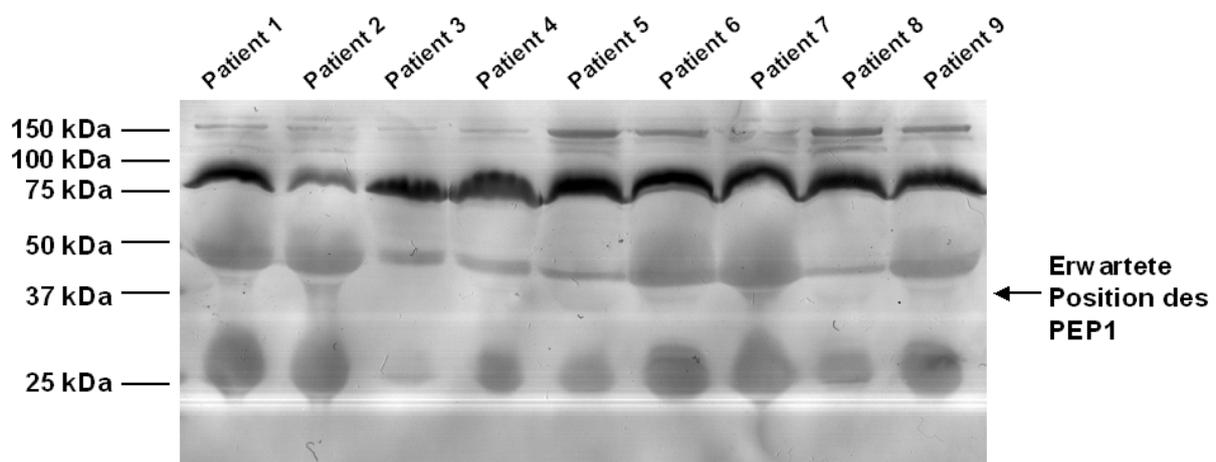


Abb. 17: Blot von Patientenseren gefärbt mit α -PEP1-AK Y1-19-24:

Die Färbung zeigt, dass in keinem der 9 verschiedenen Seren von IA-Patienten das Protein PEP1 detektiert werden kann. Stattdessen zeigt sich eine unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Serumproteinen.

3.2.5 Immunfluoreszenz mit α -PEP1

Um herauszufinden ob PEP1 nicht nur in die Umgebung sezerniert, sondern auch auf Hyphen exprimiert wird, wurde versucht Hyphen von *A. fumigatus* mit dem α -PEP1-mAk direkt zu färben. Hierzu wurde Myzel verwendet, dass 3 Tage in YG_r-Medium gewachsen war und mit 3,7 % Formaldehyd abgetötet wurde. Anschließend wurde es auf Objektträgern fixiert und gefärbt (vgl. 2.10.2.1). Leider konnte unter dem Mikroskop keine Immunfluoreszenz beobachtet werden (ohne Abbildung). Dieses negative Ergebnis kann bedeuten, dass PEP1 nicht auf der Hyphenoberfläche vorkommt. Es kann aber auch daran

liegen, dass dieser monoklonale Ak zwar für den Blot, nicht aber für die Immunfluoreszenz geeignet ist.

3.3 Hämolysin (Hly)

Aus dem SDS-Gel der Kollagenüberstandsproteine wurde eine ca. 17 kDa große Bande ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-MS als Aspergillus-Hämolysin identifiziert. Hämolysin zählt zur Gruppe der Aspergillus-Toxine. Es wurde gezeigt, dass das ca. 14 kDa große Molekül eine hämolytische Aktivität bezüglich der Erythrozyten verschiedener Spezies, darunter besonders humaner, Kaninchen- und Schafserythrozyten besitzt (Sakaguchi et al. 1977). Zusätzlich konnte ein zytotoxischer Effekt auf Makrophagen und Endothelzellen, ebenso wie die Induktion der Zytokinproduktion in beiden Zelltypen *in vitro* nachgewiesen werden (Kumagai et al. 1999; Kumagai et al. 2001). Dadurch wäre es denkbar, dass Hämolysin dazu beiträgt, den Infektionsverlauf einer invasiven Aspergillose zu beschleunigen. Allerdings ist sein bedeutendster Inhibitor das Apo-Lipoprotein B, welches u.a. im Low Density Lipoprotein (LDL), bzw. dem oxidierten LDL (OxLDL) (Kudo et al. 1999) enthalten ist und in hoher Konzentration im menschlichen Serum vorliegt.

3.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hämolysin

In dieser Arbeit sollen monoklonale Antikörper gegen das Asp-Hly produziert werden, um dieses und seine Rolle während der Invasiven Aspergillose genauer charakterisieren zu können.

3.3.1.1 Klonierung von Hämolysin in den pQE30-Vektor

Es befindet sich zwar nachweislich Hämolysin im Kollagenkulturüberstand, jedoch in zu geringer Konzentration, als dass eine Immunisierung mit diesem sicher α Hly-Ak produzierende Lymphozyten ergeben würde. Daher sollte zusätzlich Hly rekombinant hergestellt und für die Immunisierung eingesetzt werden. Das Hly-Gen enthält ein Intron, daher musste das Gen von cDNA amplifiziert werden, um es in *E.coli* exprimieren zu können. Das entsprechende PCR-Produkt hatte eine Größe von 420 bp (vgl. 2.9.1.1). Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel auf seine Größe hin analysiert. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnte eine Bande der Größe 420 bp identifiziert werden (siehe Abb. 18).

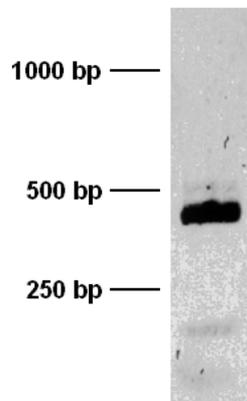


Abb. 18: PCR-Amplifikation des Hly-Gens

Mit einer Größe von ca. 420 bp ist die erfolgreiche Amplifikation des Hly-Gens zu erkennen.

Es folgte ein Reinigungsschritt, der das Amplifikat von allen Verunreinigungen befreit, deren Größe unter 100 bp oder über 10 kbp liegt (vgl. 2.9.1.3). Nun konnte das amplifizierte Hly-Gen in den pQE30-UA-Vektor kloniert werden. Von Vorteil ist, dass dieser Vektor bereits linear vorliegt und an beiden 3'-Enden einen Uridin-Überhang besitzt, welcher komplementär zu den Adenin-Überhängen des Amplifikates der Tag-Polymerase ist. Dadurch entfällt ein vorheriger Verdau von PCR-Produkt und Vektor durch Restriktionsenzyme. Die nach der Ligation gewonnenen Plasmide wurden mittels Elektroporation in elektrokompetente *E.coli* M15 (pRep4) transformiert und auf LB-Platten mit den Selektionsmarkern Kanamycin und Carbpenicillin ausplattiert. Am nächsten Tag konnte man bereits einzelne Kolonien erkennen. Diese wurden mittels PCR-Screening auf das Vorhandensein des Inserts und auf dessen Orientierung überprüft (siehe Abb. 19). Es konnten 5 von 9 Klonen als positiv (=richtige Größe von 420 bp) auf das Vorhandensein des Inserts gewertet werden (Klon 1, 3, 5, 7, 8). Die andere Klone mit kleineren Amplifikaten resultieren vermutlich aus einer unspezifischen Bindung von Oligonukleotiden.



Abb. 19: PCR-Screening der Klone auf das Vorhandensein des Hly-Inserts

Die Klone 1, 3, 5, 7 und 8 scheinen den Vektor mit Inserts (ca. 420 bp groß) integriert zu haben.

3.3.1.2 Expression des rekombinanten His₆-Hämolysin

Von allen 8 Klonen wurde eine Induktionskultur in LB-Medium unter Zugabe von IPTG angesetzt (vgl. 2.9.1.8.), um zu sehen, ob diese auch das rekombinante Hämolysin exprimieren. Das Zelllysate wurde hierfür in einem SDS-Gel aufgetrennt und hinsichtlich des Vorhandenseins einer ca. 18 kDa großen, kräftigen Coomassie-gefärbten Bande analysiert. Die Vergrößerung des zu erwartenden Proteins kommt dadurch zustande, dass dem eigentlich 15,4 kDa großen Protein am N-Terminus noch ein zusätzlicher Anteil von ca. 3 kDa hinzugefügt wird, der u.a. das His₆-Motiv enthält. Es zeigte sich, dass von den fünf PCR-positiven Klonen nur Klon 1, Klon 3 und Klon 7 Hämolysin zu exprimieren scheinen (siehe Abb. 20).

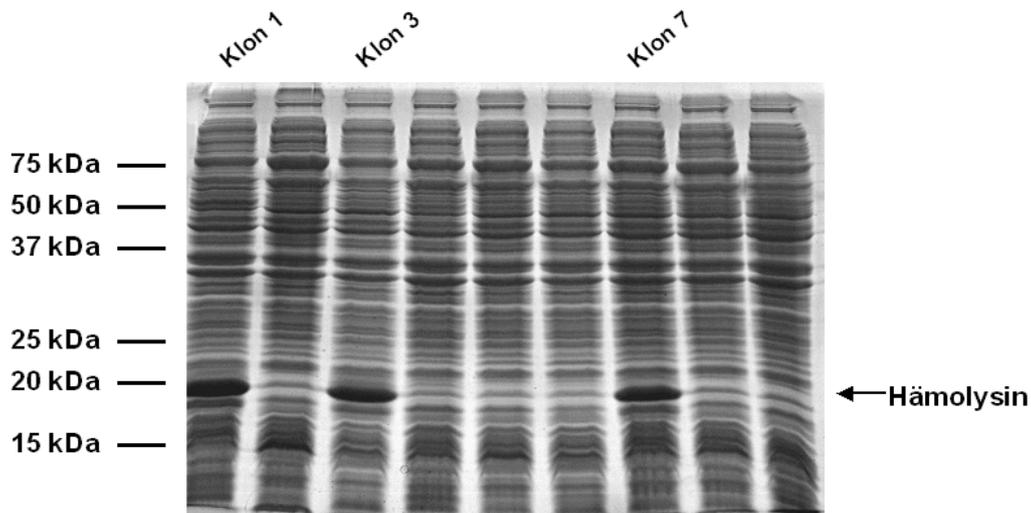


Abb. 20: Induktionskulturen der Klone 1-9

Klon 1, 3 und 7 zeigen eine Expression von Hämolysin unter IPTG-Induktion, die übrigen Klone sind negativ.

Von Klon 1 wurde anschließend ein Midipräp des Plasmids hergestellt und das isolierte Plasmid bzw. das darin klonierte Gen sequenziert (Agowa). Das Ergebnis zeigte, dass die Sequenz des Klones mit der Sequenz der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) bis auf zwei Basen übereinstimmt (siehe Abb. 21). Der Austausch einer Base an Stelle 157 von Cytosin durch Adenin führt zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz von Glutamin (CAG) zu Lysin (AAG). Der zweite Basenaustausch an Stelle 218 von Thymin durch Cytosin führt jedoch zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz (GTC anstatt GTT, beide Codons kodieren für Valin). Es ist davon auszugehen, dass der Austausch von nur einer Aminosäure zu keiner größeren Veränderung in der Struktur des Hämolysins führt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Variation des Proteins in den Stämmen 293 (Genomsequenz) und D141 (diese Arbeit).

ERGEBNISSE

HLY_KLON1	ACTATGAGAGGATCGCATCACCATCTCCATCACGGCGCATC	40
HYL-NCBI	0
Consensus		
HLY_KLON1	CCACGTGATATCCTCAATCGCTTCTATGGCATCGGTCCAA	80
HYL-NCBIATGGCATCGGTCCAA	15
Consensus	atggcatcggtccaa	
HLY_KLON1	GCTTACGCACAGTGGGTTACGGTTCATCTCATCAATAGCA	120
HYL-NCBI	GCTTACGCACAGTGGGTTACGGTTCATCTCATCAATAGCA	55
Consensus	gcttacgcacagtgggttacggttcatctcatcaatagca	
HLY_KLON1	TGTCTCCGAGACCTTGAGTATCAGAATGCTAGTCTCTC	160
HYL-NCBI	TGTCTCCGAGACCTTGAGTATCAGAATGCTAGTCTCTC	95
Consensus	tgtctccgagaccttgagtata gaatgctagtctctc	
HLY_KLON1	CTGGGGCAAGTGGTACAAGGACGGTGACAAGGACGCCGAA	200
HYL-NCBI	CTGGGGCAAGTGGTACAAGGACGGTGACAAGGACGCCGAA	135
Consensus	ctggggcaagtgggtacaaggacggtgacaaggacgccgaa	
HLY_KLON1	ATCACAAGTGAAGATGTCAGCAAAAGACGGCACCCCCAG	240
HYL-NCBI	ATCACAAGTGAAGATGTCAGCAAAAGACGGCACCCCCAG	175
Consensus	atcacaagtgaagatgt cagcaaaagacggcacccccag	
HLY_KLON1	GCGGTTCCGTGAACGTCAACTCTTGCGGTTCGACGACGC	280
HYL-NCBI	GCGGTTCCGTGAACGTCAACTCTTGCGGTTCGACGACGC	215
Consensus	gcggttccgtgaacgtcaactcttgcggttcgacgacgc	
HLY_KLON1	TTCGAGTGGAAACGACGGGAGGTTTTGATTTGTATGACGGC	320
HYL-NCBI	TTCGAGTGGAAACGACGGGAGGTTTTGATTTGTATGACGGC	255
Consensus	ttcgagtggaaacgacgggagggttttgatttgtatgacggc	
HLY_KLON1	AATACCAAGATTGGAAGAGTCCACTGGGACTGTCCATGGG	360
HYL-NCBI	AATACCAAGATTGGAAGAGTCCACTGGGACTGTCCATGGG	295
Consensus	aataccaagattggaagagtccactgggactgtccatggg	
HLY_KLON1	GTTCTAAAACCAACGATTTTCGATGTTGGAGAGAGAAACAA	400
HYL-NCBI	GTTCTAAAACCAACGATTTTCGATGTTGGAGAGAGAAACAA	335
Consensus	gttctaaaaccaacgattttcgatggttgagagagaaacaa	
HLY_KLON1	AAATTACTGGGTCGAAATTGGAACGTGGAACAAGTATGGT	440
HYL-NCBI	AAATTACTGGGTCGAAATTGGAACGTGGAACAAGTATGGT	375
Consensus	aaattactgggtcgaaattggaacgtggaacaagtatggt	
HLY_KLON1	GGTGCCATTGGCACTGTTGACGTTGAAGTTGGAAGGAAGC	480
HYL-NCBI	GGTGCCATTGGCACTGTTGACGTTGAAGTTGGAAGGAAGC	415
Consensus	ggtgccattggcactgttgacgttgaagttggaaggaagc	
HLY_KLON1	GCTGACAAGCGATTGAGGAGATCTG	506
HYL-NCBI	GCTGA.....	420
Consensus	gctga	

Abb. 21: Sequenzierung von Klon 1:

Ein Sequenzabgleich von Hly-Klon 1 mit der NCBI-Datenbank ergab eine fast komplette Übereinstimmung, lediglich zwei Basenaustausche wurden gefunden.

3.3.1.3 Reinigung des rekombinanten His₆-Hämolytins

Um das rekombinante Hämolytins in größerer Menge zu erhalten, wurden zunächst 200 ml LB-Medium mit dem Klon 1 angeimpft und inkubiert. Als eine OD von 0,6 erreicht war, wurde IPTG hinzugefügt um die Proteinexpression zu induzieren. Die Kultur wurde für weitere 3 h inkubiert und die Bakterien nach Abzentrifugation mittels French Press aufgeschlossen. Durch anschließende Zentrifugation konnten die lysierten Zellen in eine lösliche (Überstand) und eine unlösliche (Sediment) Fraktion aufgetrennt und über SDS-Page analysiert werden. Nach Coomassiefärbung zeigte sich, dass das rekombinante Hämolytins stärker in der unlöslichen Fraktion vertreten war (Abb. 22).

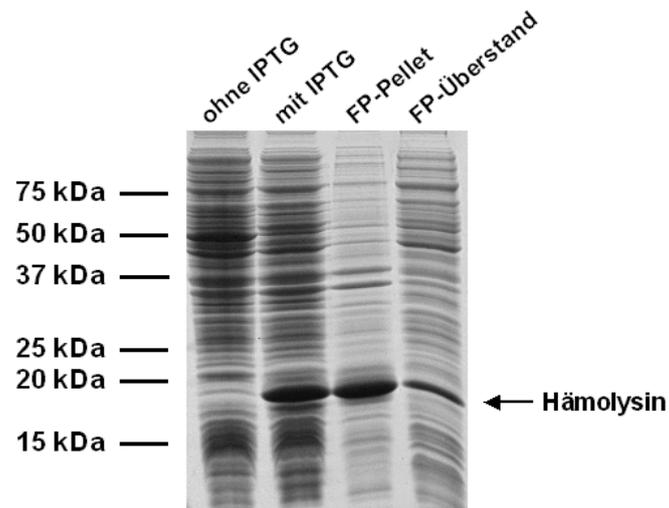


Abb. 22: SDS-Gel von French Press(FP)-Aufschluss von Klon 1

Spur 1: Klon 1 ohne IPTG-Induktion, Spur 2: Klon 1 nach IPTG-Zugabe, Spur 3: unlösliche Fraktion nach FP-Aufschluss, Spur 4: lösliche Fraktion nach FP-Aufschluss

Dies konnte noch deutlicher im dazugehörigen Western-Blot gezeigt werden, in dem das rekombinante Protein mit einem α -His₆-Ak gefärbt wurde (Abb. 23).

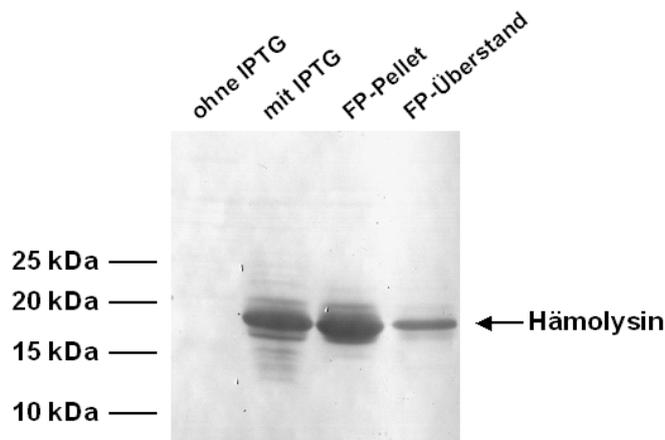


Abb. 23: Western-Blot von French Press-Aufschluss (FP) von Klon 1

Nach Färbung mit einem α -His₆-Ak zeigt sich, dass das rekombinante Hämolysin stärker im Pellet (Spur 3) vertreten ist als im Überstand (Spur 4).

Das unlösliche His₆-Hämolysin wurde in einem Guanidinhydrochlorid-Puffer in Lösung gebracht und dann in denaturierter Form gereinigt. Die Aufreinigung des rekombinanten Hämolytins aus der unlöslichen Fraktion erfolgte über eine Talonmatrix, deren Kobaltionen eine Komplexbindung mit den His₆-Motiven der rekombinanten Proteine eingingen. Nach Bindung der rekombinanten Proteine an die Matrix wurde zweimalig eluiert. Die so gewonnenen Eluate wurden dialysiert, um das Guanidin-Hydrochlorid zu entfernen, welches die Laufeigenschaften der Proteine im Gel verschlechtern würde. Die anschließende Auftrennung der Proben im SDS-Gel zeigte, dass Hämolysin in großer Menge mittels der Talonmatrix aufgereinigt worden war (vgl. Abb. 24).

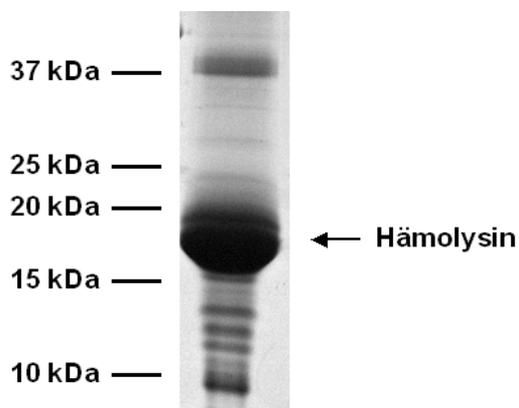


Abb. 24: SDS-Gel von Eluat nach Aufreinigung mittels Talonmatrix

Im Eluat ist hauptsächlich das rekombinante Hämolysin mit einer Größe von ca. 17 kDa vorhanden.

3.3.1.4 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Hämolyisin

Um weitere monoklonale Antikörper auch gegen Hämolyisin zu generieren, wurden zunächst 2 Balb/c- Mäuse mit einer Mischung aus gereinigtem, rekombinant hergestelltem Hämolyisin sowie aufkonzentriertem Kollagen-Kulturüberstand, der natives Hämolyisin enthält, immunisiert (vgl. 2.9.2.1). Die Überstände der durch die Fusion der Mäuse-Lymphozyten mit den Myelomzellen gewonnenen Hybridomzellen wurden abpipettiert und auf Vorhandensein von α -Hly-Ak getestet. Von 240 Kulturüberständen erkannten nur 2 das rekombinante Hämolyisin im Western-Blot (Ak L-102 und Ak L-125), parallel jedoch kein Protein im Kollagenkulturüberstand. Ein weiterer Antikörper, Ak L-2, erkannte eine ca. 17 kDa große Bande im Kollagenkulturüberstand, dagegen nicht das rekombinante Hämolyisin (vgl. Abb. 25).

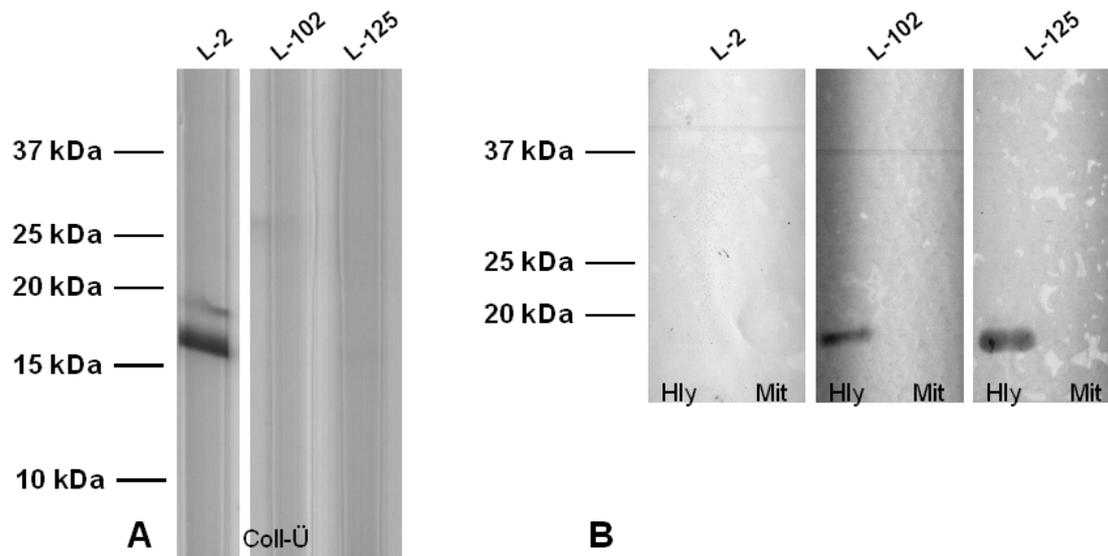


Abb. 25: Ak L-2 erkennt ein ca. 17 kDa großes Protein im Coll-Ü-Blot, L-102 und L-125 erkennen das rekombinante Hämolyisin (Hly)

Auf dem Western-Blot vom Kollagen-Kulturüberstand erkennt der Ak L-2 ein ca. 17 kD großes Protein, welches der Größe von Hämolyisin entspricht (A). Derselbe Ak erkennt weder das rekombinant hergestellte Hämolyisin (Hly), noch das mit 18 kDa ähnlich große rekombinante Mitogillin (Mit) (B).

Die Antikörper L-102 und L-125 erkennen im Kollagenüberstand kein Protein (A). Dafür binden beide an das rekombinante Hämolyisin, jedoch nicht an das rekombinante Mitogillin (B)

Da die Antikörper L-102 und L-125 nicht zusätzlich zum rekombinanten Hämolyisin an das rekombinante Mitogillin binden, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Epitop

dieser Antikörper lediglich um das His₆-Tag handelt. Es ist allerdings zu hinterfragen, warum sie im Kollagenkulturüberstand kein Hämolysin detektieren können. Ebenso ist es unsicher, ob der Antikörper L-2 wirklich an das Protein Hämolysin im Kollagenkulturüberstand bindet, da er das rekombinante Hämolysin nicht erkennen kann. Allerdings scheint er auch nicht gegen das ähnlich große Mitogillin gerichtet zu sein.

Um monoklonale Antikörper zu erhalten, wurde zwei der drei positiv getesteten Kulturen, die Kultur L-2 und die Kultur L-125, nach dem in 2.9.2.4 beschriebenen Schema in Einzelzellkonzentration auf 96-Well-Platten verteilt. Auf diese Weise konnten Einzelzellklone gewonnen und damit monoklonale Antikörper generiert werden. Es konnten 13 Klone als Einzelzellklone identifiziert werden. Diese wurden erneut auf ihre Antikörperproduktion im Western-Blot getestet und positive Klone eingefroren.

3.3.2 Testen von α -Hly-Ak auf Patientenseren

Der Antikörper L-125-3 wurden an Seren von Patienten getestet, die nachweislich an einer Invasiver Aspergillose erkrankt waren. Dafür wurden die Seren von sieben erkrankten Patienten sowie zur negativen Kontrolle die Seren zweier gesunder Patienten über SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Diese wurde dann mit dem mutmaßlichen α -Hly-Ak L-125-3 inkubiert. Es zeigte sich lediglich eine unspezifische Färbung des Blots (siehe Abb. 26), nicht nur im Bereich in dem die Seren der erkrankten, sondern auch in dem die Seren der gesunden Patienten aufgetragen waren. Hämolysin war in diesem Experiment in den Patientenseren folglich nicht nachweisbar.

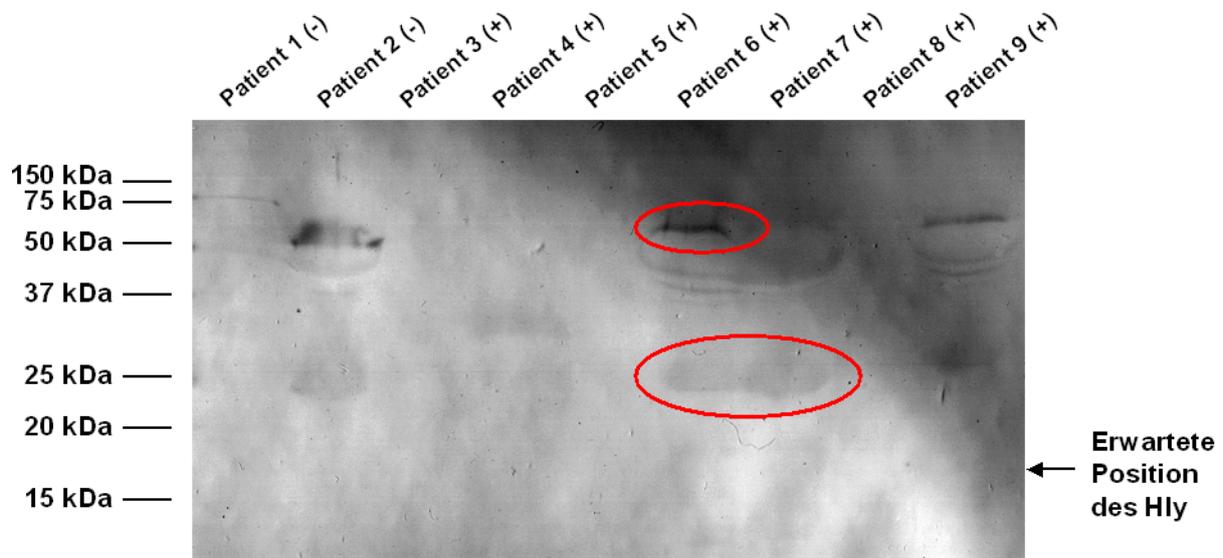


Abb. 26: Blot von gesunden und IA-Patientenseren mit L-125-3

Im Blot von zwei gesunden (Patient 1 und 2) und sieben IA-Patientenseren (Patient 3-9) kommt es zur Kreuzreaktion des mAk L-125-3 mit verschiedenen Serumproteinen, u.a. der Größe ca. 25 kDa und ca. 55 kDa (rote Markierung), sowohl bei den gesunden, als auch den erkrankten Patienten.

3.3.3 Suche nach α -Hly-Antikörpern in Patientenseren

Da die Detektion von Hämolyysin in Patientenseren erfolglos blieb, wurde versucht Antikörper gegen Hly in Seren von IA-Patienten zu aufzuzeigen. Dazu wurde rekombinantes Hly mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Via Immunfärbung wurde im Anschluss versucht das Hly zu detektieren, wobei als primäre Antikörper die Seren der Patienten aus 3.3.2 dienen. Leider konnte auch hier nur eine unspezifische Färbung erreicht werden (ohne Abb.). Daraus lässt sich schließen, dass in den Patientenseren keine Antikörper gegen Hämolyysin vorhanden waren, oder diese nicht in ausreichender Konzentration vorlagen.

3.4 Durchmusterung der Antikörperbank

3.4.1 Durchmusterung der Antikörperbank mittels Western-Blot

Die Hybridomzellen, die aus der Immunisierung mit dem Kollagenkulturüberstand und dem rekombinanten Hly entstanden sind, wurden im Western-Blot hinsichtlich ihrer

Antikörperproduktion untersucht. Dafür wurden Kollagenkulturüberstände auf Nitrozellulosemembranen geblottet und in Miniblot-Kammern mit den jeweiligen Überständen inkubiert. Es zeigte sich, dass 23 von 176 Hybridomzellüberständen ein oder mehrere Proteine aus dem Kulturüberstand erkannten (vgl. Abb. 27 und Tab. 5). Alle Hybridomkulturen, die im Western-Blot mindestens ein Protein erkannten, wurden gemäß Protokoll 2.9.2.6 in flüssigem Stickstoff konserviert.

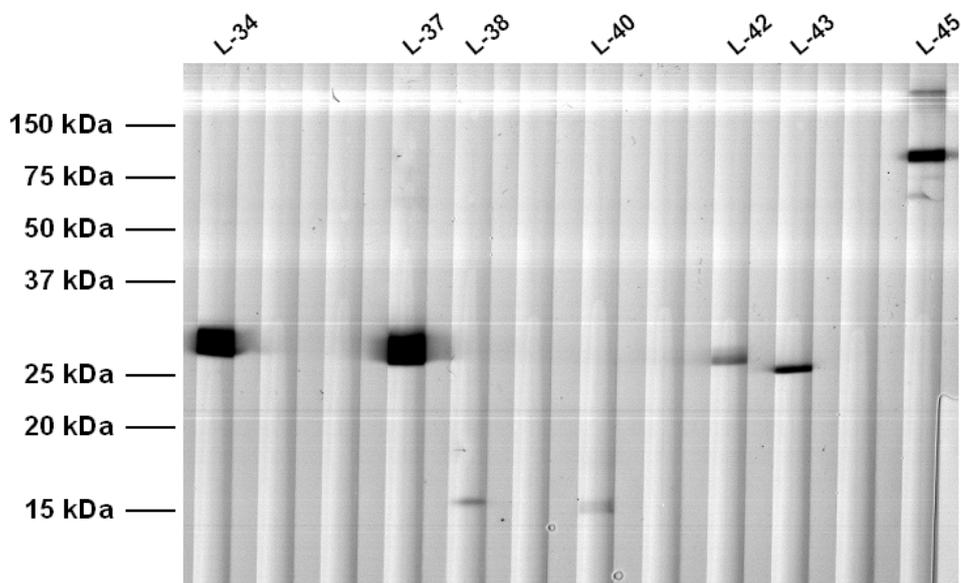


Abb. 27: Hybridomzellüberstände aus der Fusion L erkennen Kollagenkulturüberstandsproteine

Klon 34, 37, 38, 40, 42, 43 und 45 detektieren jeweils ein oder mehrere Kollagenkulturüberstandsproteine im Western-Blot. (Dies repräsentiert nur einen Teil der positiven Hybridome.)

Hybridomkultur-Nr.	Größe der erkannten Bande/n
L-2	17 kDa, 19 kDa
L-10	80 kDa
L-13	40 kDa
L-34	30 kDa
L-37	30 kDa

L-38	17 kDa
L-40	16 kDa
L-42	28 kDa
L-43	27 kDa
L-45	100 kDa, 150 kDa
L-58	55 kDa
L-61	30 kDa
L-66	30 kDa
L-70	30 kDa
L-89	30 kDa
L-95	35 kDa
L-98	35 kDa, 75 kDa
L-99	17 kDa, 32 kDa, 35 kDa, 55 kDa, 75 kDa
L-153	30 kDa
L-154	30 kDa
E	26 kDa, 30 kDa
H	30 kDa, 80 kDa
J	37 kDa

Tab. 5: Hybridomkulturen aus der Fusion L und die von ihnen im Westernblot erkannten Banden von Proteinen aus Kollagenkulturüberstand

Die zur Fusion verwendete Lympozyten stammten aus einer Immunisierung zweier Mäuse mit konzentriertem Kollagenkulturüberstand.

3.4.2 Durchmusterung der Antikörperbank in der Immunfluoreszenz

Zusätzlich zur Western-Blot-Analyse wurden die Überstände einiger Hybridomzellen in der Immunfluoreszenz getestet. Dafür wurde Myzel, welches in Kollagenmedium gewachsen war, vorbereitet und mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht (siehe 2.10.1). Die so fixierten Präparate konnten anschließend laut Protokoll 2.10.2.1 gefärbt werden, wobei als Primäntikörper die unverdünnten Hybridomzellüberstände aus Tab. 5 dienten. Als Sekundär-Ak wurde ein Cy3-konjugierter α -Maus-Ak verwendet. Nach Fixierung mit Fluoprep konnten die Präparate im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Es zeigte sich, dass nur 2 Hybridomzellüberstände das Myzel von *Aspergillus fumigatus* färben konnten: L-10 und L-99 (vgl. Abb. 28).

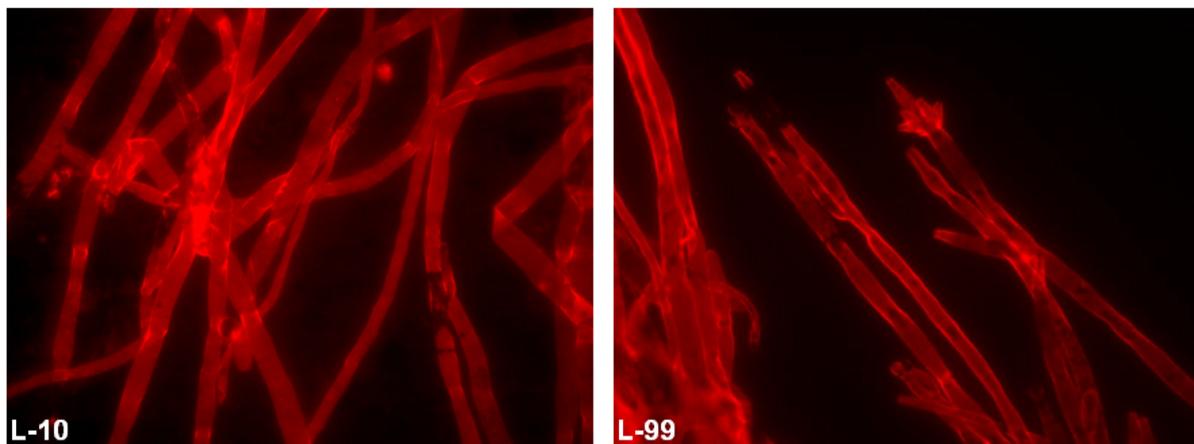


Abb. 28: Myzel von *A. fumigatus* gefärbt mit L-10 und L-99

Die beiden Hybridomzellüberstände aus Fusion L, L-10 und L-99, erkennen Strukturen auf der Oberfläche von in Kollagenmedium gewachsenem *A. fumigatus*-Myzel in der Immunfluoreszenz.

3.4.3 Klonierung der Hybridomzelllinien L-99 und L-10

Um monoklonale Antikörper zu gewinnen wurden die beiden Hybridomzelllinien L-99 und L-10 auf 96-Well-Platten vereinzelt (siehe 2.9.2.4.). Nachdem die Einzelzellklone die Vertiefungen dicht bewachsen hatten, wurden die Überstände hinsichtlich ihrer Ak-Produktion erneut in der Immunfluoreszenz auf in Kollagenmedium gewachsenem Myzel getestet. Es zeigte sich, dass die beiden Klone L-10-1 und L-99-13 eine besonders kräftige Färbung des Myzels hervorriefen. Mit diesen beiden Hybridomzelllinien wurde im folgenden

gearbeitet.

3.4.4 Genauere Charakterisierung der Antikörper L-10-1 und L-99-13

Im ELISA zur Typisierung der Antikörper-Klasse konnten sowohl L-99-13 als auch L-10-1 als IgM-Ak identifiziert werden (siehe 2.9.2.5). Da beide Antikörper ein ähnliches Färbeverhalten aufwiesen, wurde angenommen, dass sie auch gegen ähnliche Moleküle/Epitope gerichtet sind. Ein erster Anhaltspunkt bei der Suche nach dem Antigen, an das die Antikörper binden, war die kräftige, gleichmäßige Färbung, die die Antikörper auf der Oberfläche des Myzels hervorrief. Da die Zellwand von *A. fumigatus* zum Großteil aus einer Polysaccharidmatrix besteht, lag die Hypothese nahe, dass auch eine zuckerhaltige Struktur das Antigen bildet. Um dies genauer zu untersuchen wurden einige Tests durchgeführt.

3.4.4.1 Verdau von Proteinantigenen der Hyphenoberfläche mit Proteinase K

Die Behandlung der Hyphen mit Proteinase K führt zu einer Auflösung sämtlicher peptidischer Bindungen und damit zum Ablösen aller Peptide von der Hyphenoberfläche. Erkennt der Antikörper L-99-13 eine Proteinstruktur, so sollte er nach der Behandlung des Myzels mit Proteinase K nichts mehr detektieren können und somit zu keiner weiteren Färbung führen. Nach Protokoll 2.10.2.1.1 wurde die Proteinase K-Behandlung durchgeführt und im Anschluss daran das Präparat mit L-99-13 gefärbt (vgl. 2.10.2.1).



Abb. 29: Färbung von *A. fumigatus* Myzel mit L-99-13 nach Behandlung mit Proteinase K

Auch nach der Proteinasebehandlung waren Oberflächenstrukturen des Myzels unverändert mit L-99-13 anfärbbar.

Auch nach der Behandlung durch die Proteinase konnte eine unverändert starke Färbung des Myzels mit L-99-13 erzielt werden (Abb. 29). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem Antigen, welches der Antikörper L-99-13 erkennt nicht um eine Proteinstruktur, sondern um eine Zuckerstruktur handeln muss.

3.4.4.2 Oxidation der Zuckerantigene auf der Hyphenoberfläche mit Natriumperjodat

Die Behandlung von Hyphen mit Natriumperjodat (NaJO_4) bewirkt eine Oxidation der Zuckerstrukturen der Hyphenoberfläche. Da angenommen wurde, dass der Antikörper L-99-13 an eine zellwandständige Zuckerstruktur bindet, wurde nach der Behandlung mit NaJO_4 ein abgeschwächtes Färbeverhalten erwartet. Dafür wurde in Kollagenmedium gewachsenes Myzel auf Objektträgern fixiert, nach Protokoll 2.10.2.1.2 mit NaJO_4 inkubiert und anschließend, wie bereits oben beschrieben, mit L-99-13 gefärbt.

Die Inkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen von NaJO_4 bewirkte eine unterschiedlich starke Abschwächung der Färbung durch L-99-13 (Abb. 30). Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Antigen, welches L-99-13 erkennt, um eine Polysaccharidstruktur handelt.

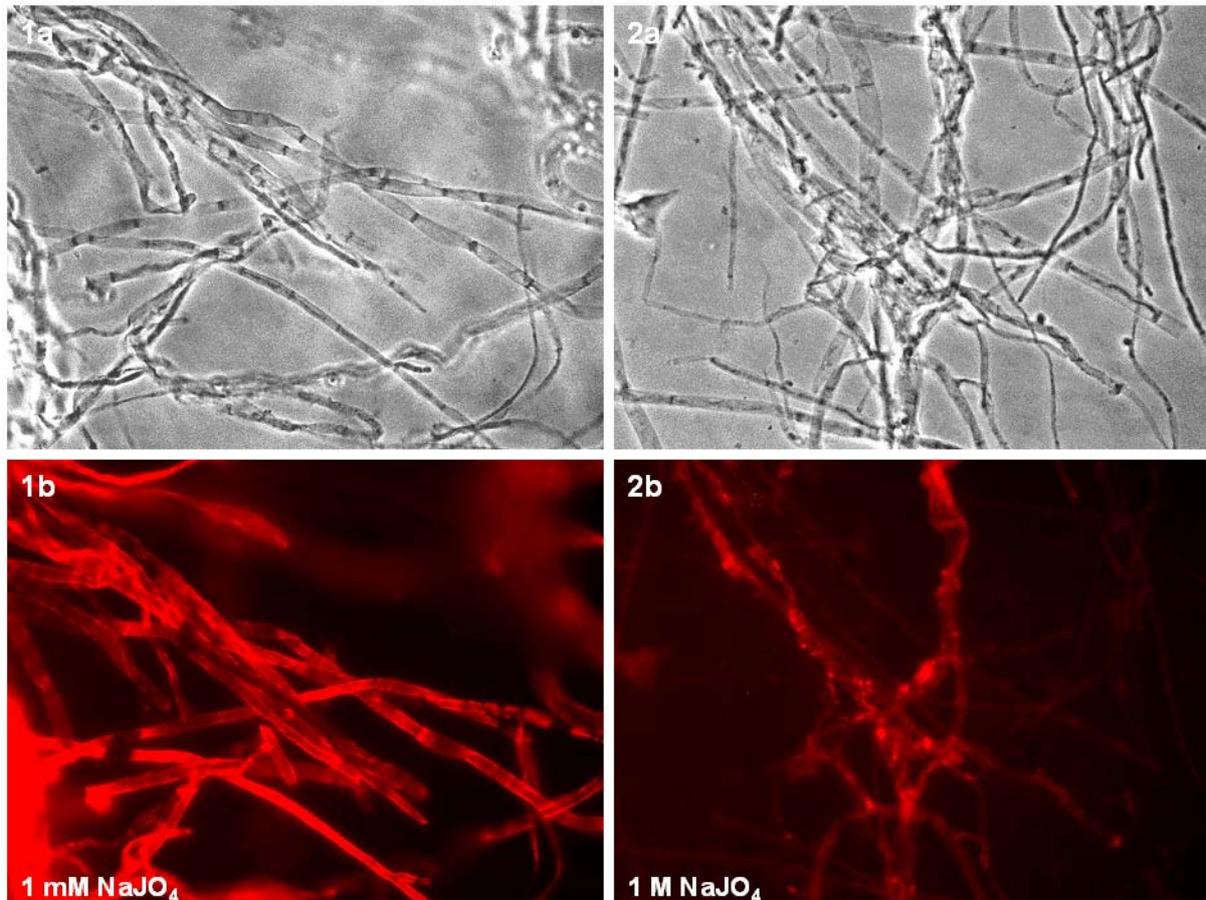


Abb. 30: Färbung von *A. fumigatus*-Myzel nach Behandlung mit Natriumperjodat:

Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von NaPJO_4 verwendet: Bild **1b** zeigt das beinahe unveränderte Färbeverhalten durch L-99-13 nach Behandlung mit 1mM NaPJO_4 . Nach Verwendung einer 1M NaPJO_4 -Lösung war nur noch eine schwache Färbung durch L-99-13 nachweisbar (**2b**). (Obere Abbildungen Durchlichtaufnahmen, untere Abbildungen unter Fluoreszenzlicht aufgenommen)

3.4.4.3 Entfernung von Galaktofuranoseresten auf der Hyphenoberfläche durch HCl-Hydrolyse

Es ist wahrscheinlich, dass in den Überstandsextrakten aus dem Kollagenmedium, mit dem die Mäuse immunisiert worden waren, auch Bestandteile der pilzlichen Zellwand enthalten waren. Diese könnten ebenfalls eine immunogene Wirkung in der Maus gezeigt und dadurch eine Antikörperproduktion ausgelöst haben. Galaktomannan ist einer der Hauptbestandteile der Zellwand von *A. fumigatus* und seine Zuckerseitenkette Galaktofuranose als Epitop der Antikörper L-10-1 und L-99-13 denkbar, da bekannt ist, dass Galaktofuranose den immundominanten Teil des Galaktomannan bildet (Bennett et al. 1985). Wie bereits bei

Latge et al. (1994) beschrieben, ist es möglich, selektiv mittels HCl-Hydrolyse die Galaktofuranose-Seitenketten des Galaktomannans zu entfernen. Um herauszufinden, ob es sich bei dem Epitop, an das die mAk L-10-1 und L-99-13 binden, um Galaktofuranose handelt, wurde in Kollagenmedium gewachsenes Myzel mit einer 0,01 M HCl-Lösung inkubiert (siehe 2.10.2.1.3). Anschließend wurde das so vorbehandelte Myzel wie oben beschrieben auf Objektträgern fixiert und mit den beiden mAk L-10-1 und L-99-13 gefärbt. Es zeigte sich, dass die Inkubation des Myzels mit der HCl-Lösung bewirkt hatte, dass die beiden mAk kaum noch an die Hyphenoberfläche binden konnten (siehe Abb. 31). Dies führt zu der Annahme, dass es sich bei dem Antigen, gegen das die beiden mAk gerichtet sind, um ein Epitop handeln muss, das Galaktofuranose enthält.

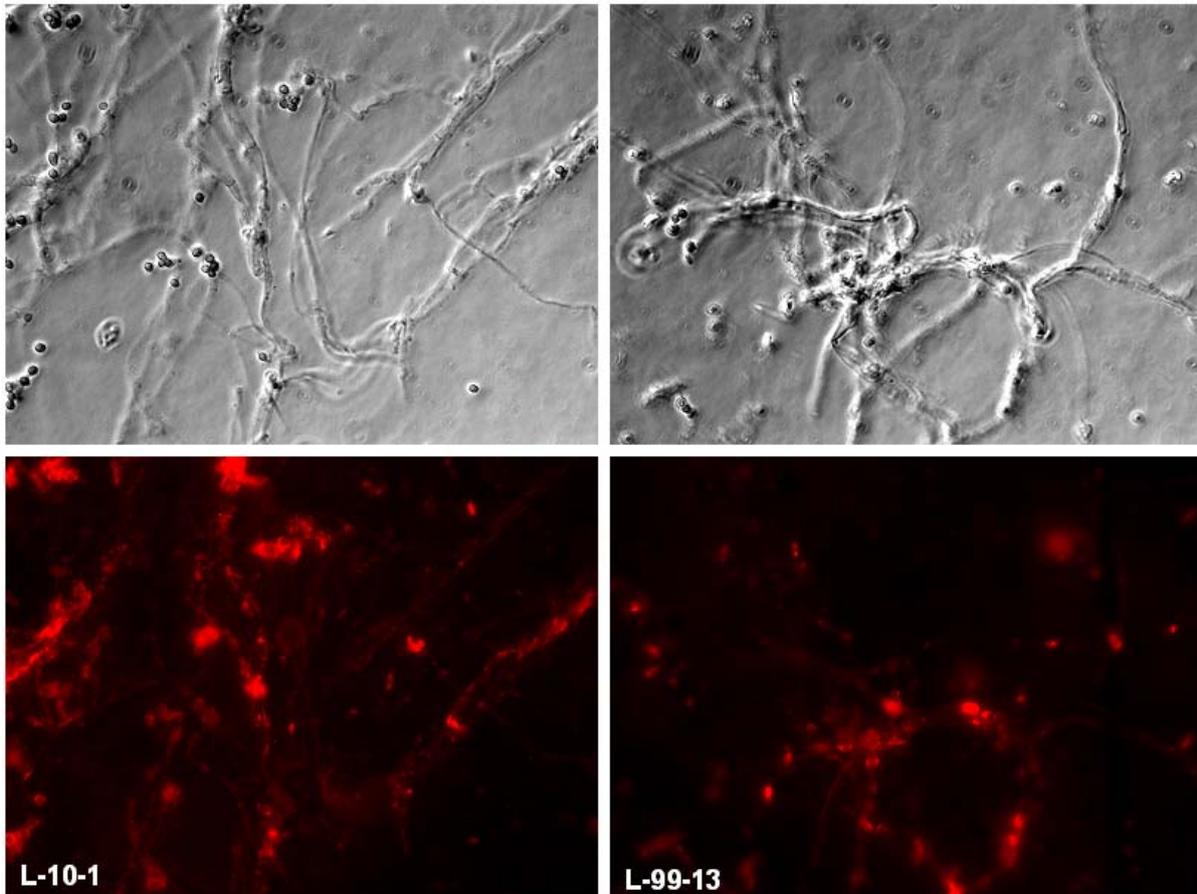


Abb. 31: Färbung von *A. fumigatus*-Myzel nach Behandlung mit HCl-Lösung

Die selektive Hydrolyse der Galaktofuranose durch HCl führt zu einer abgeschwächten Färbung sowohl durch L-10-1 als auch durch L-99-13 (Obere Abbildungen Durchlichtaufnahmen, untere Abbildungen unter Fluoreszenzlicht)

3.4.4.4 Untersuchung des Färbeverhaltens einer *Galf*-Deletionsmutante

Um die Hypothese des vorhergehenden Versuches zu bekräftigen, dass es sich bei L-10-1 und L-99-13 um α -*Galf*-Ak handelt, sollte als nächstes das Färbeverhalten einer Galaktofuranose-Mutante (Δ *galf*) von *A. fumigatus* untersucht werden. Dazu wurden Sporen der *Galf*-Deletionsmutante in Kollagenmedium zu Myzelbällchen herangezüchtet und diese nach Fixation auf Objektträgern mit den beiden Ak immunfluoreszenzgefärbt. Weder L-10-1 noch L-99-13 konnten eine Färbung des Myzels hervorrufen (ohne Abb).

3.5 Galaktofuranose (Gal_f)

Galaktofuranose (Gal_f) ist als Unterform der Galaktose in zahlreichen Zuckerverbindungen von Mikroorganismen enthalten, die zum Großteil für den Menschen pathogen sind. Darunter vertreten sind neben Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* auch Protozoen (z.B. Leishmanien) und Bakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) (de Lederkremer und Colli 1995). Im Menschen liegt Galaktose nur in der Pyranoseform vor. Daher kann das menschliche Immunsystem Galaktofuranose als fremd erkennen und so die zelluläre Immunabwehr aktiviert werden (Morelle et al. 2005). Zum anderen macht die Abwesenheit von Galaktofuranose im Menschen diesen Zucker zu einem interessanten Ziel von antimikrobieller Therapien (Pedersen und Turco 2003).

In *Aspergillus fumigatus* ist Galaktofuranose in folgenden 4 Molekülarten enthalten (Latge 2008):

- als Teil des Glyko-Grundgerüsts der Zellwand
- in den N-/O-gebundenen Glykanen sekretierter Proteine oder Oberflächenproteine
- als GPI-verankertes Lipophosphogalaktomannan
- in zahlreichen Sphingolipiden, die über Inositol-Phosphoceramid an der Zellwand verankert sind

Meist liegt Galaktofuranose in *A. fumigatus* jedoch als Bestandteil von Galaktomannan (GM) vor, einem Polysaccharid, dessen Grundgerüst sich aus einer linearen Kette von Mannotetraoseeinheiten zusammensetzt, die in sich $\alpha(1,6)$ glykosidisch verbunden sind. An diesem Grundgerüst hängen Seitenketten bestehend aus je 4-5 $\beta(1,5)$ -verknüpften Galaktofuranoseeinheiten die über $\beta(1,6)$ - oder $\beta(1,3)$ -glykosidische Bindungen mit der Mannose verbunden sind (Latge et al. 1994) (vgl. Abb. 2). Galaktomannan wird von dem Pilz während der Wachstumsphase freigesetzt und ist in Serum, Urin und Bronchialsekret von IA-Patienten nachweisbar (Mennink-Kersten et al. 2006). Die Kinetik der Zirkulation von GM ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die Freisetzung von GM von Umweltbedingungen wie pH-Wert und Nährstoffangebot abhängig ist (Mennink-Kersten et al. 2006).

3.5.1 Testen der α -Gal-f-Ak auf Myzel, das in verschiedenen Medien gewachsen war

Um zu überprüfen, ob die Expression von Galaktomannan abhängig vom Nährstoffangebot ist, wurde das Myzel von drei *Aspergillus fumigatus*-Kulturen mit den beiden α -Gal-f-Ak L-99-13 und L-10-1 in der Immunfluoreszenz untersucht. Es wurde hierzu Myzel verwendet, das je 72h in 0,2%-Kollagenmedium, Hly-Medium oder YG_f-Medium gewachsen war. Das Myzel wurde nach Protokoll 2.10.1 vorbereitet und anschließend je ein Präparat mit L-10-1 und L-99-13 inkubiert (vgl. 2.10.2.1).

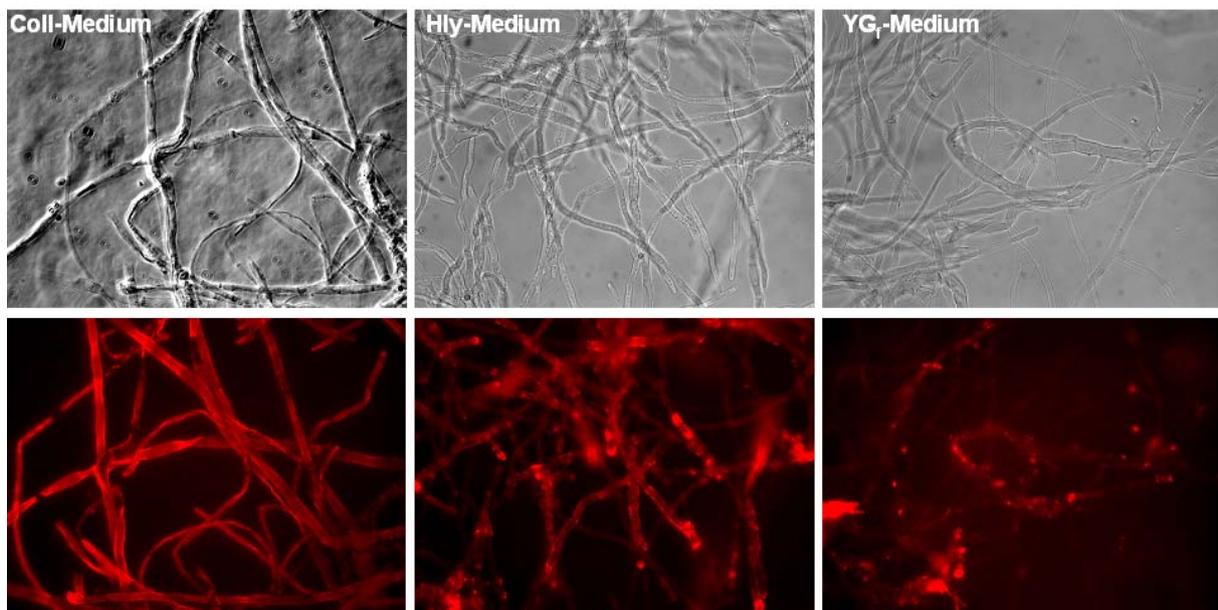


Abb. 32: Nachweis von Galaktofuranose auf Myzel verschiedener Kulturmedien.

Die obere Bilderreihe zeigt Durchlichtaufnahmen, die untere Reihe die dazugehörigen Immunfluoreszenzaufnahmen. Das im Kollagenmedium gewachsene Myzel leuchtete stark in der Immunfluoreszenz, die anderen beiden Myzelien zeigten nur eine schwache bzw. keine Fluoreszenz. Als Primär-Ak wurde L-99-13 verwendet, als Sekundär-Ak ein Ziege- α -Maus-Cy3-Ak.

Es stellte sich heraus, dass die Hyphen, welche im Kollagenmedium gewachsen waren eine weitaus stärkere Fluoreszenz aufwiesen, als die im Hämolyisin- oder YG_f-Medium gewachsenen Hyphen (siehe Abb. 32). Dies weist darauf hin, dass Galaktofuranose auf der Hyphenoberfläche in Gegenwart von Kollagen verstärkt exprimiert wird.

3.5.2 Nachweis von sezernierter Galaktofuranose in Kulturüberständen

Um herauszufinden, ob Galaktofuranose oder galaktofuranosehaltige Proteine nicht nur auf der Oberfläche von *Aspergillus fumigatus* exprimiert, sondern auch in seine Umgebung sezerniert werden, wurden die Kulturüberstände von Kollagenkulturen, Hly-Kulturen und YG_F-Kulturen untersucht. Diese Kulturüberstände wurden via SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurden sie mit den Antikörpern L-10-1 und L-99-13 inkubiert und danach mit einem α -Maus-AP-Ak gefärbt.

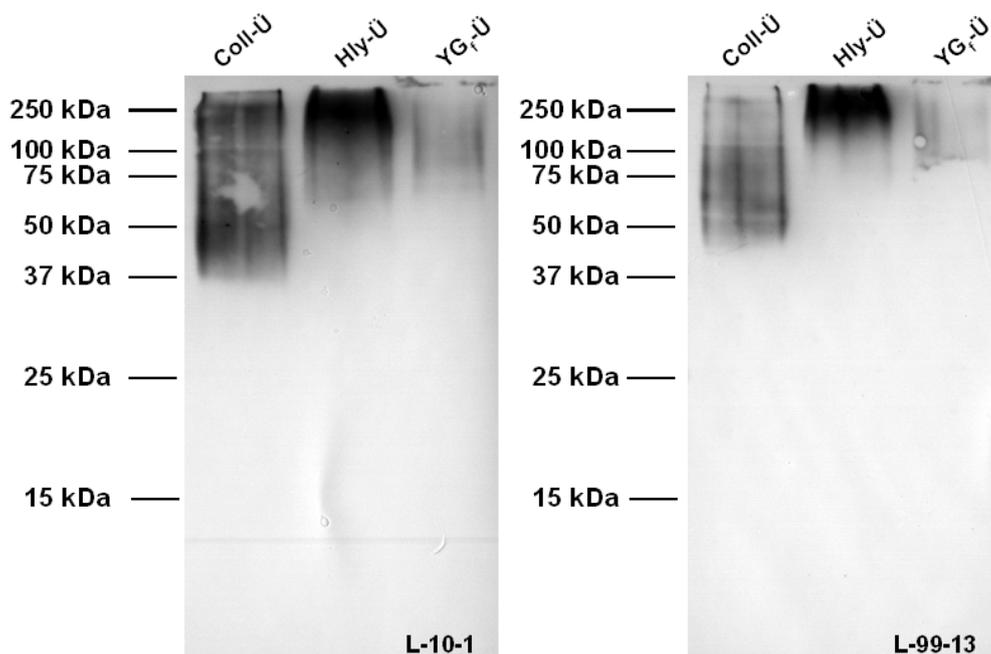


Abb. 33: Nachweis von Galaktofuranose in 3 Kulturüberständen von *A. fumigatus* im Western-Blot.

Die beiden Antikörper L-10-1 und L-99-13 erkennen hochmolekulare Strukturen in den Kulturüberständen, am ausgeprägtesten im Kollagenmedium, am schwächsten im YG_F-Medium.

Im Färbeverhalten der Ak L-10-1 und L-99-13 fand sich kaum ein Unterschied. Beide Antikörper erkannten im Western-Blot in allen 3 Kulturüberständen hochmolekulare Strukturen: Im Kollagenüberstand ab einer Größe von ca. 37 kDa, im Hly-Überstand ab ca. 60 kDa und im YG_F-Überstand ab ca. 75 kDa (siehe Abb. 33). Damit konnte nicht nur gezeigt werden, dass Galaktofuranose vom Pilz sezerniert wird, sondern auch, dass die Sezernierung je nach Nährstoffangebot variiert.

Auffällig war, dass das Muster der durch die beiden α -Galaktofuranose-Ak erkannten

Strukturen in den Kulturüberständen ähnlich dem Muster war, das die Antikörper eines Kaninchens mit Invasiver Aspergillose in den Kulturüberständen erkannten (siehe Abb. 34). Dies könnte eventuell darauf hinweisen, dass einige Antikörper des Kaninchens ebenfalls gegen Galaktofuranose gerichtet waren. Zumindest weiß man, dass Galaktofuranose während der Infektion exprimiert wird und eine starke antigene Wirkung aufweist (Pedersen und Turco 2003)

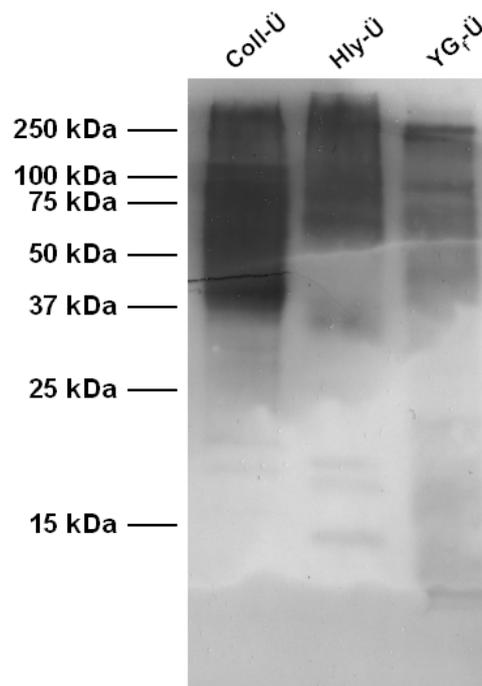


Abb. 34: Antikörper aus dem Serum eines Kaninchens mit IA erkennen Strukturen aus *A. fumigatus*-Kulturüberständen.

Das Muster der erkannten Strukturen ist denen aus Abb. 33 ähnlich.

3.5.3 Untersuchung unterschiedlicher Wachstumsstadien hinsichtlich der Expression von Galaktofuranose in der Immunfluoreszenz

Um die Kinetik der Galaktofuranoseexpression von *A. fumigatus* in den einzelnen Wachstumsstadien zu untersuchen, wurden neben ruhenden Konidien auch angeschwollene und auskeimende Sporen verwendet (siehe 2.7.4.2). Diese wurden zuerst mit dem Antikörper L-99-13 und darauf mit dem sekundären Ak α -Maus-Cy3 gefärbt. Zuletzt wurde der Pilz mit dem Immunfluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) inkubiert, um die ruhenden Sporen besser abgrenzen zu können. Dieser Farbstoff lagert sich an die DNA an

und fluoresziert, angeregt durch UV-Licht, blau. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop fand sich lediglich eine Cy3-Färbung der bereits ausgekeimten Sporen (vgl Abb. 35).

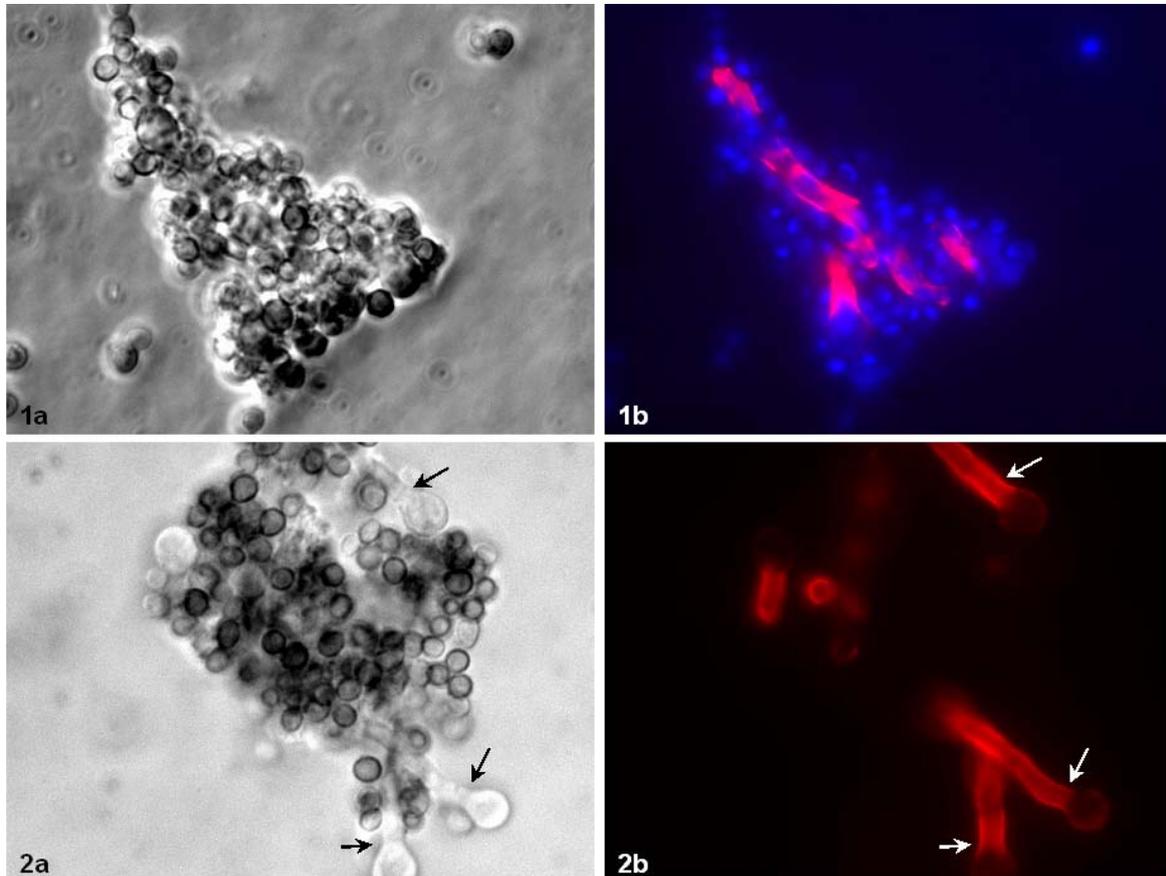


Abb. 35: Färbung von *A. fumigatus* in verschiedenen Wachstumsstadien mit L-99-13

1a und **2a** zeigen Durchlichtaufnahmen, **1b** und **2b** die dazu passende Fluoreszenzaufnahme. Das Präparat 1 ist zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt worden. Beide Aufnahmen belegen, dass der Ak L99-13 nur die Hyphen der bereits ausgekeimten Sporen erkennt (Pfeile). Ruhende oder angeschwollene Sporen werden nicht gefärbt.

Weder die ruhenden, noch die angeschwollenen Sporen wiesen eine Färbung auf. Dies lässt darauf schließen, dass Galaktofuranose erst im Keimschlauch an der Oberfläche exprimiert wird.

3.5.4 Nachweis von Galaktofuranose auf Myzel verschiedener *Aspergillus*-Gattungen

Als nächstes sollte gezeigt werden, dass Galaktofuranose nicht nur auf *A. fumigatus*, sondern auch auf anderen *Aspergillus*-Gattungen vorkommt. Dazu wurde Kollagenmedium mit Sporen des nicht pathogenen *A. giganteus* und *A. niger* beimpft und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor die *A. fumigatus* Kulturen herangezüchtet. Die anschließend gewonnenen Myzelbällchen wurden auf Objektträgern fixiert und konnten so mit dem Antikörper L-10-1 immunfluoreszenzgefärbt werden (vgl. 2.10.2.1), wobei ein α -Maus-Cy3-Ak als sekundärer Antikörper diente.

Beide *Aspergillus*-Gattungen wiesen eine starke Färbung durch den Antikörper L-10-1 auf (siehe Abb. 36), was darauf schließen lässt, dass Galaktofuranose auch auf der Hyphenoberfläche nicht und schwach pathogener *Aspergillus* Arten exprimiert wird.

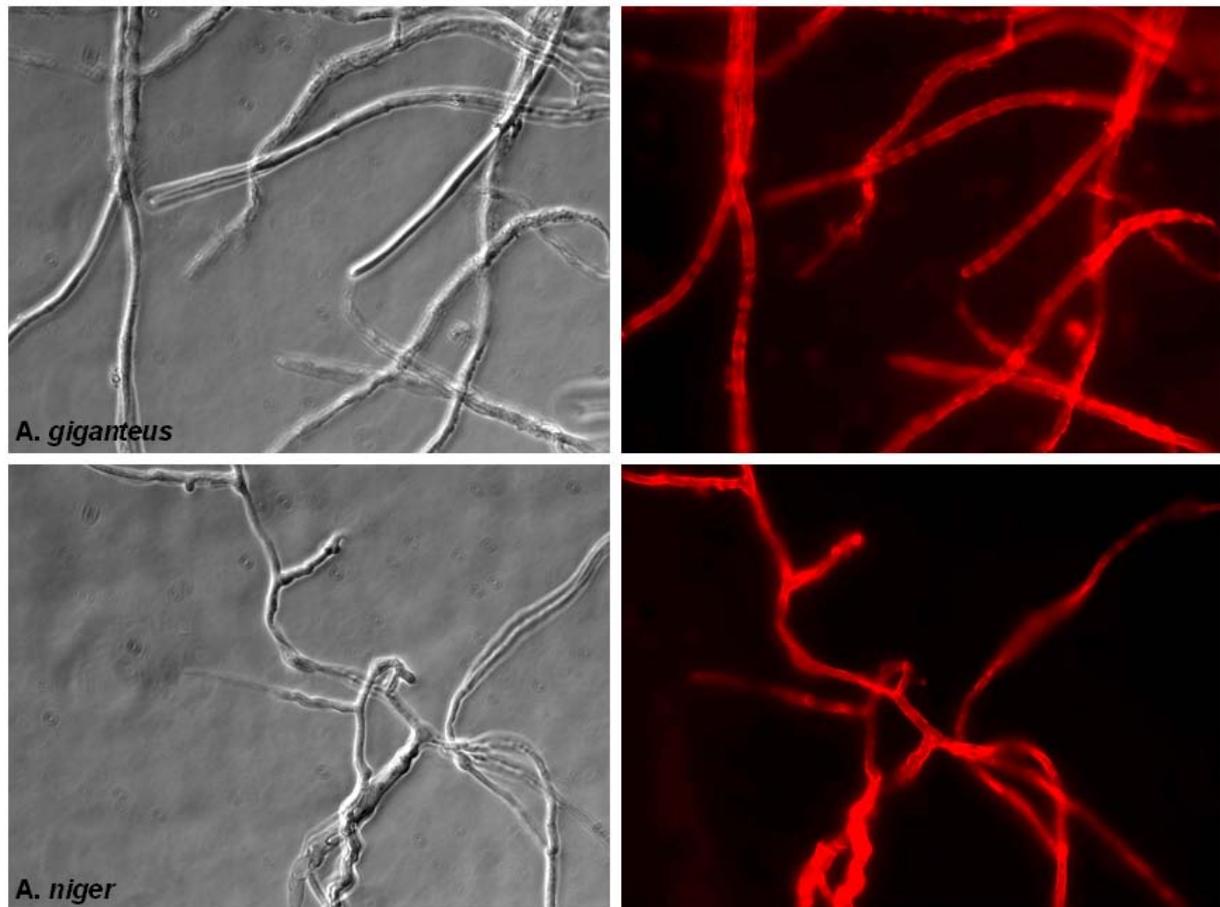


Abb. 36: Färbung von Myzel verschiedener *Aspergillus*-Gattungen mit L-10-1 und α -Maus-Cy3-Ak
 Sowohl das Myzel von *A. giganteus* (obere Reihe) als auch das von *A. niger* (untere Reihe) konnten mit dem α -Galf-Ak angefärbt werden. Dies beweist, dass Galf auch auf der Hyphenoberfläche anderer *Aspergillus*-Gattungen exprimiert wird.

3.5.5 Färbung histologischer Präparate einer IPA mit α -Galf-Antikörpern

Um nachzuweisen, dass Galf auch unter Infektionsbedingung exprimiert wird, wurden histologische Lungenschnitte von Patienten untersucht, die an einer Invasiven Aspergillose erkrankt waren. Die Präparate wurden freundlicher Weise vom Pathologischen Institut der LMU in der Frauenlobstraße zur Verfügung gestellt. Die Schnitte wurden, ähnlich wie die Myzel-Präparate, unter Zuhilfenahme des „Shandon Coverplate“ gefärbt. Als primärer Antikörper diente hierbei der mAk L-10-1 oder L-99-13, als sekundärer Antikörper wurde ein α -Maus-IgM-Cy3-Ak verwendet. Zusätzlich zur rötlichen Immunfärbung sollten die Hyphen zur besseren Identifizierung mittels Calcofluor/Weiß angefärbt werden. Calcofluor/Weiß

bindet an das Chitin der Zellwand und führt dadurch zu einer bläulichen Fluoreszenz (vgl. 2.10.2.2).

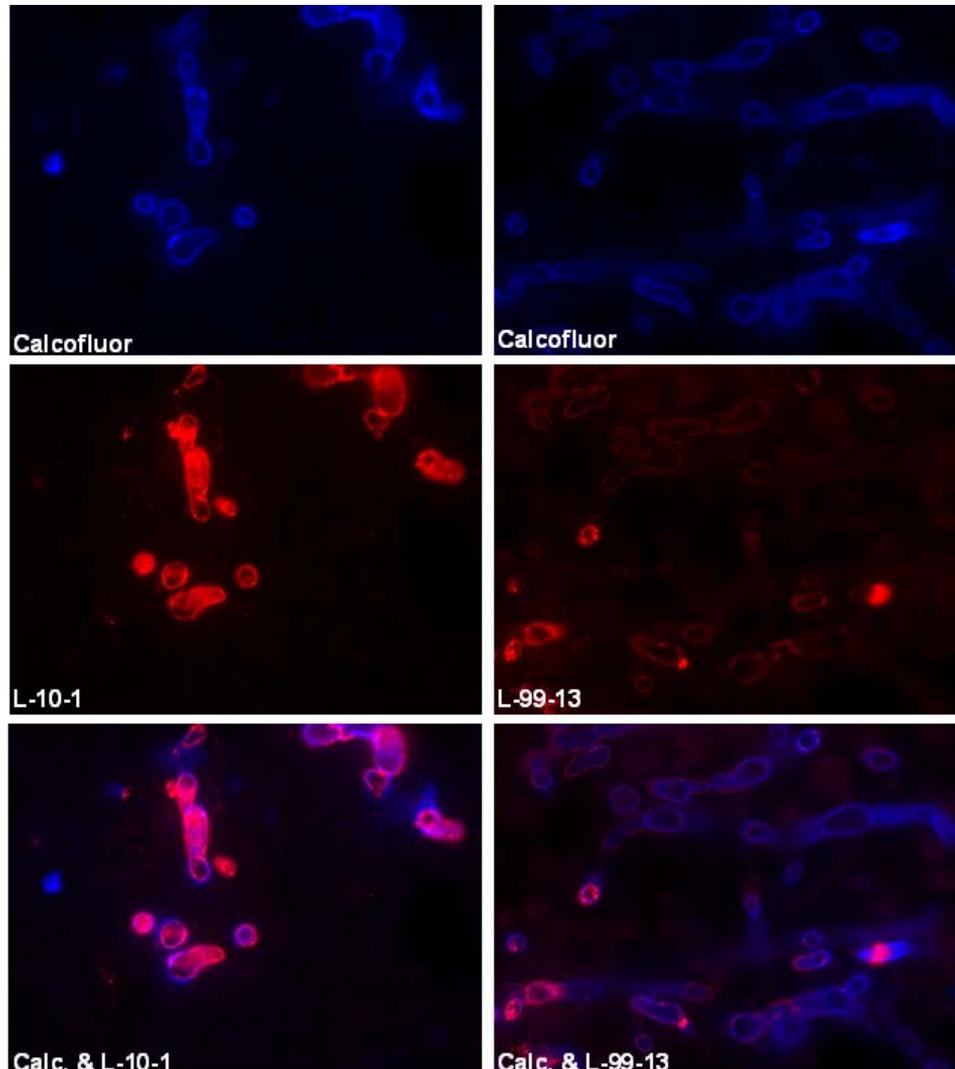


Abb. 37: Färbung histologischer Schnitte eines Lungenpräparates eines IA-Patienten mit α -Gal β -Ak

Es wurde ein Lungenschnitt mit Calcofluor/Weiß und L-10-1 gefärbt, ein weiterer mit Calcofluor/Weiß und L-99-13. Beide Antikörper zeigten eine gute Bindung an das Myzel in der Lunge, jedoch fiel die Färbung durch L-10-1 etwas kräftiger aus.

Die Färbung der Lungenschnitte mittels der α -Gal β -Ak zeigte das gleiche Muster, wie die Färbung der Hyphen mit Calcofluor/Weiß, wenn auch die Färbung durch L99-13 etwas schwächer in der Intensität ausfiel. Dies könnte an einer geringeren Konzentration des Antikörpers gelegen haben, die vor dem Versuch nicht bestimmt worden war. Dennoch

wurde deutlich, dass Galaktofuranose unter Infektionsbedingungen im Menschen auf der Oberfläche der *A. fumigatus*-Hyphen exprimiert wird und durch die beiden Antikörper L-10-1 sowie L-99-13 detektiert werden kann.

3.5.6 Färbung histologischer Präparate einer invasiven Candidose

Um zu zeigen, dass während einer ebenfalls häufigen invasiven Pilzkrankung, der Invasiven Candidose, keine Galaktofuranose exprimiert wird, wurden wie in 3.5.5 histologische Präparate mit dem mAk L-10-1 oder L-99-13 immunfluoreszenzgefärbt und der Pilz durch eine Calcofluor/Weiß-Färbung zusätzlich sichtbar gemacht (Abb. 38).

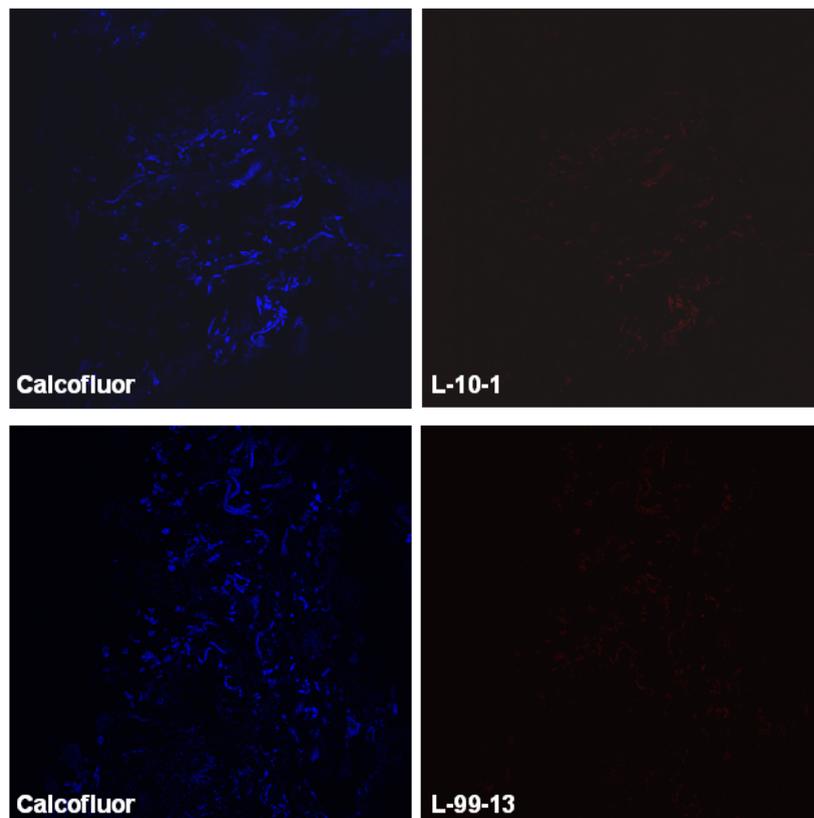


Abb. 38: Immunfluoreszenzfärbung eines histologischen Präparates einer invasiven Candidose mit α -GalF-Aks

Zwei histologische Schnitte wurden jeweils mit dem mAk L-10-1 oder L-99-13 (rechte Spalte) und zusätzlich mit Calcofluor/Weiß (linke Spalte) gefärbt. *C. albicans* lässt sich nicht durch die beiden α -GalF-Aks L-10-1 und L-99-13 anfärben.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt, dass sich *Candida albicans* nicht durch die beiden α -Gal-f-Aks anfärben lässt. Dies lässt annehmen, dass Galaktofuranose von *C. albicans* unter Infektionsbedingungen nicht exprimiert wird, was bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist.

3.5.7 Aufbau eines Sandwich-ELISAs mit L-10-1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die beiden AK L-10-1 und L-99-13 unter Infektionsbedingungen Oberflächenmoleküle von *A. fumigatus* in histologischen Schnittpräparaten detektieren können, sollte als nächstes versucht werden mithilfe dieser Antikörper einen ELISA aufzubauen. Dieser ELISA soll es ermöglichen im Patientenserum zirkulierende galaktofuranosehaltige Moleküle zu erkennen, die von *A. fumigatus* sezerniert wurden. Es ist bereits ein Sandwich-ELISA zur Diagnostik der invasiven Aspergillose (Platelia Aspergillus EIA, BioRad) auf dem Markt erhältlich. Dieser basiert auf dem monoklonalen Ratten-Antikörper EB-A2, der ebenfalls Galaktofuranose erkennt (Stynen et al. 1995). Ein Sandwich-ELISA mit nur einem monoklonalen Antikörper ist nur darum möglich, da es sich bei der Galaktofuranose um eine repetitive Struktur handelt und dadurch Fänger- und Detektions-Antikörper nicht um ein einzelnes Antigen konkurrieren müssen. An diesen angelehnt sollte untersucht werden, ob mit den α -Gal-f-Aks L-10-1 und L-99-13 ebenfalls ein effektiver Test aufgebaut werden kann. Da hierfür zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen, ist es vorstellbar, die Sensitivität und Spezifität des ELISAs im Vergleich zum Platelia-Test zu erhöhen, der nur auf einem mAK basiert.

Für diese Versuche wurde der AK L-10-1 aus dem Kulturüberstand aufkonzentriert (siehe 2.9.4), aufgereinigt (siehe 2.9.3) und ein Teil dieses Antikörpers wurde mit Peroxidase konjugiert (2.9.5).

3.5.7.1 Platelia-Aspergillus-ELISA mit L-10-1-PO als Detektions-Ak

Zunächst sollte herausgefunden werden, ob der mit Peroxidase konjugierte L-10-1-Ak ähnlich gut im ELISA funktioniert, wie der im Platelia-Kit enthaltene monoklonale Ratten-Ak EB-A2. Dazu wurden mit EB-A2 vorbeschichteten ELISA-Platten, die im Kit enthalten sind, nach Anleitung mit je 50 μ l der verschiedenen mitgelieferten Kontrollseren (ein positives,

galaktomannanhaltiges Kontrollserum, ein sogenanntes *cut-off*-Serum und ein negatives, galaktomannanfreies Kontrollserum) inkubiert. Bevor die Seren eingesetzt werden konnten, mussten sie allerdings mit einer im Kit enthaltenen EDTA-Lösung vorbehandelt werden, um störende Serumproteine aus den Proben zu entfernen (siehe 2.8.7.3). Gebundenes Galaktomannan sollte nach der Inkubation durch den Antikörper L-10-1-PO nachgewiesen werden. Es wurden je Vertiefung 50 µl des Antikörper L-10-1-PO in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt:

1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml und 0,125 µg/ml in PBS. Die Entwicklung des ELISAS folgte streng nach Packungsanleitung. Schließlich konnte der ELISA bei einer OD von 450 nm/620 nm im ELISA-Reader abgelesen werden.

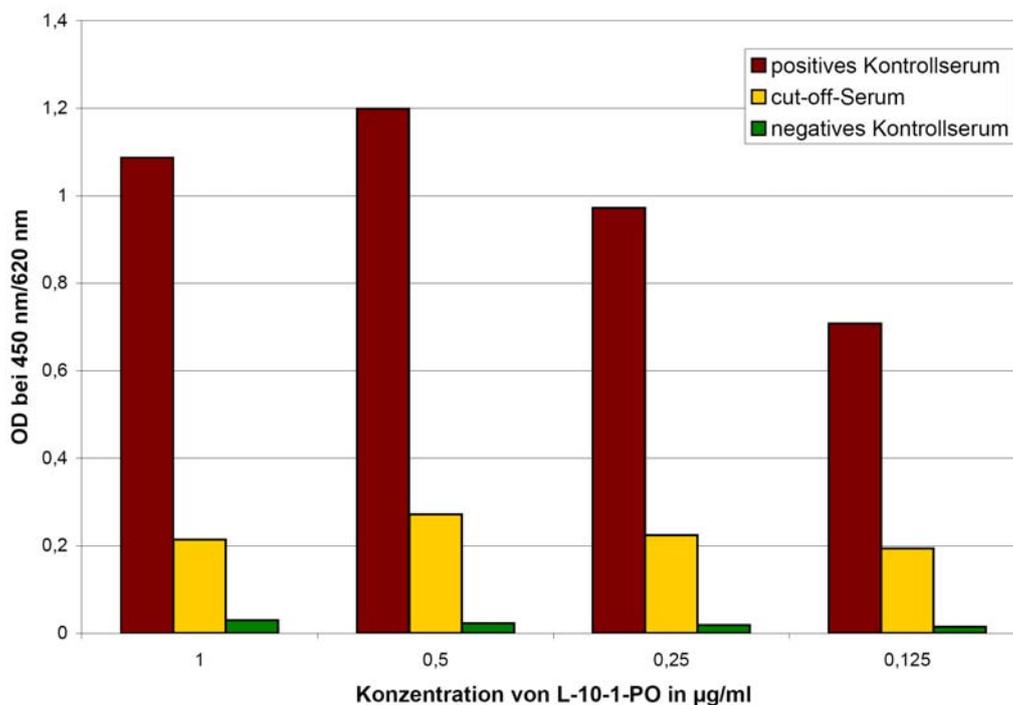


Abb. 39: ELISA mit vorbeschichteter *Platelia Aspergillus*-Platte und L-10-1-PO als Detektions-Ak

Es wurden 4 verschiedene Konzentrationen des Detektions-Ak verwendet. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,5 µg/ml die besten Testergebnisse erbrachte.

Die Auswertung des ELISAs zeigte, dass die Detektion von Galaktomannan in humanen Seren durch L-10-1-PO ähnlich gut funktioniert, wie mittels des kommerziellen Antikörpers EB-A2 (Daten nicht gezeigt). Eine Konzentration von 0,5 µg/ml L-10-1-PO ergab das

beste Resultat. Diese Konzentration wurde auch in folgenden Versuchen eingesetzt.

3.5.7.2 Sandwich-ELISA mit L-10-1 als Fänger- und L-10-1-PO als Detektions-Ak

Da sich im vorangehenden Versucht der L-10-1-PO als geeigneter Detektions-Ak für Galaktomannan im ELISA gezeigt hat, sollte als nächstes untersucht werden, ob L-10-1 auch als Fänger-Ak im ELISA zu verwenden ist. Dazu wurde zunächst eine ELISA-Platte mit L-10-1 beschichtet (siehe 2.8.7.1). Hierzu wurde ein aufgereinigtes Ak-Konzentrat von L-10-1 verwendet, dass in 7 unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,5 µg/ml und 50 µg/ml in Beschichtungs-Puffer gelöst wurde. Die ELISA-Platten wurden mit der Beschichtungslösung für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abnahme der Lösung wurden die freien Bindestellen der Platte mit einer 3%igen BSA-Lösung (in TBS-T) für eine Stunde bei 37°C blockiert und die Vertiefungen daraufhin 2-malig mit der im Platelia-Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde in die einzelnen Wells je 50 µl des Detektions-Ak L-10-1-PO in einer Verdünnung von 1:500 pipettiert (entspricht einer Konzentration von 0,5 µg/ml) und danach je Well 50 µl der jeweiligen Kontrollseren. Die Entwicklung erfolgte nach 90 minütiger Inkubationszeit mit den Reagenzien aus dem Platelia Aspergillus-Kit nach Herstellerangaben.

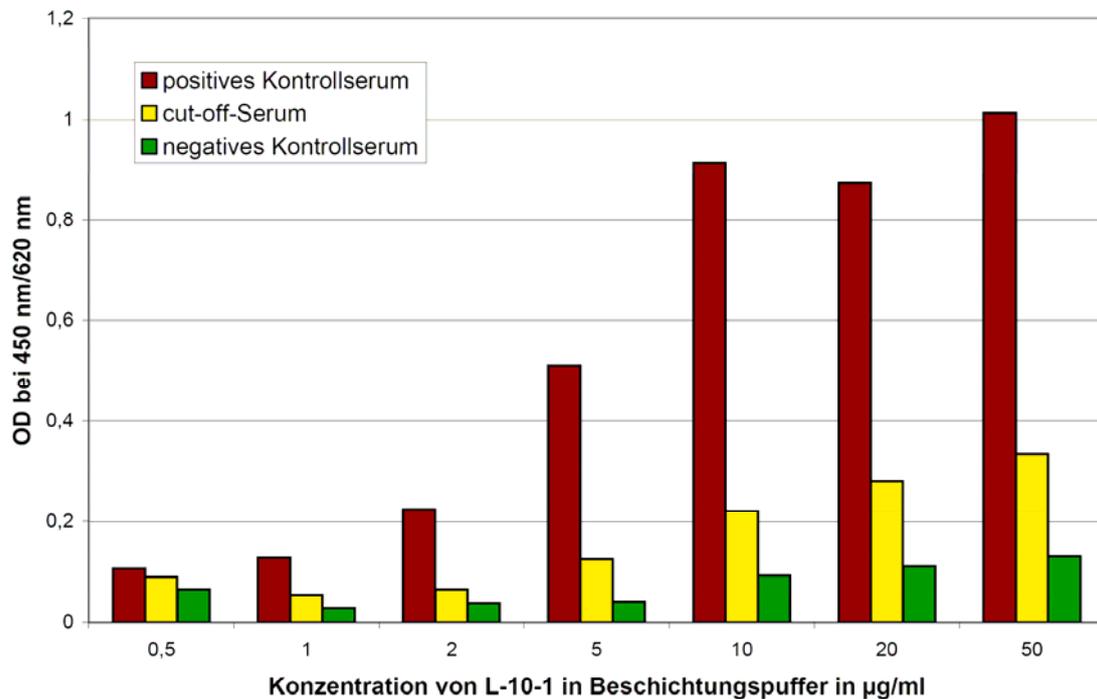


Abb. 40: ELISA mit L-10-1 als Fänger- und L-10-1-PO als Detektions-Ak

Durch die Variation der eingesetzten Konzentrationen des Beschichtungs-Aks konnten unterschiedlich intensive Signale mit der gleichen Menge an Antigen erreicht werden.

In diesem ELISA konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Reaktion bei Verwendung einer gleichbleibenden Detektions-Ak- und Antigen-Konzentration von der Konzentration des Fänger-Aks abhängig ist. Möglicherweise könnte die Intensität der Signale noch weiter gesteigert werden. Ob dieses sinnvoll ist, ist fraglich, da dies auch zu einer gesteigerten Reaktion mit dem negativen Kontrollserum führen würde. Daher wurde in dieser Arbeit davon abgesehen und in weiterführenden Versuchen eine Konzentration des Fänger-Ak L-10-1 von 50 µg/ml verwendet.

3.5.7.3 Vergleich von *Platelia Aspergillus* EIA mit dem L-10-1-ELISA

Um als nächstes die Aussagekraft eines rein auf dem Antikörper L-10-1 basierendem ELISA zu untersuchen, wurden Patientenseren parallel im *Platelia Aspergillus* ELISA und im L-10-1-ELISA getestet. Es sollte die Reaktion nicht nur mit den drei im *Platelia*-Kit enthaltenen Kontrollseren, sondern zusätzlich mit 13 Patientenseren aus der hausinternen Serologie untersucht werden. Dieser Arbeit liegt ein Ethikvotum vor, dass den Einsatz dieser „Restseren“ für wissenschaftliche Zwecke erlaubt. Die Patientenseren waren bereits durch

die Mitarbeiter der Serologie vorgetestet und in drei Gruppen eingeteilt: Serum 1 bis 4 galten als positiv, Serum 5 bis 8 als grenzwertig (da sie im ersten Test zwar positiv, in der Wiederholung jedoch negativ waren) und die Seren 9 bis 13 als negativ. Bevor die Seren der Diagnostik unterzogen werden konnten mussten sie, ebenso wie die Kontrollseren in 3.5.7.1, vorbehandelt werden. Der Platelia Aspergillus ELISA wurde nach Angaben des Herstellers angewendet. Für den L-10-1-ELISA wurde eine MaxiSorp-Platte mit gereinigtem L-10-1 als Fänger-Ak in einer Konzentration von 50 µg/ml beschichtet (siehe 2.8.7.1). Als nächstes konnte der Detektions-Ak L-10-1-PO in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in PBS dazugegeben. Im direkten Anschluss wurde in die einzelnen Vertiefungen je 50 µl der zu untersuchenden Seren pipettiert und das ganze 90 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte die Entwicklung mit den im Platelia-Kit enthaltenen Reagenzien. Abgelesen wurden die ELISAs bei einer OD von 450 nm/620 nm im ELISA-Reader.

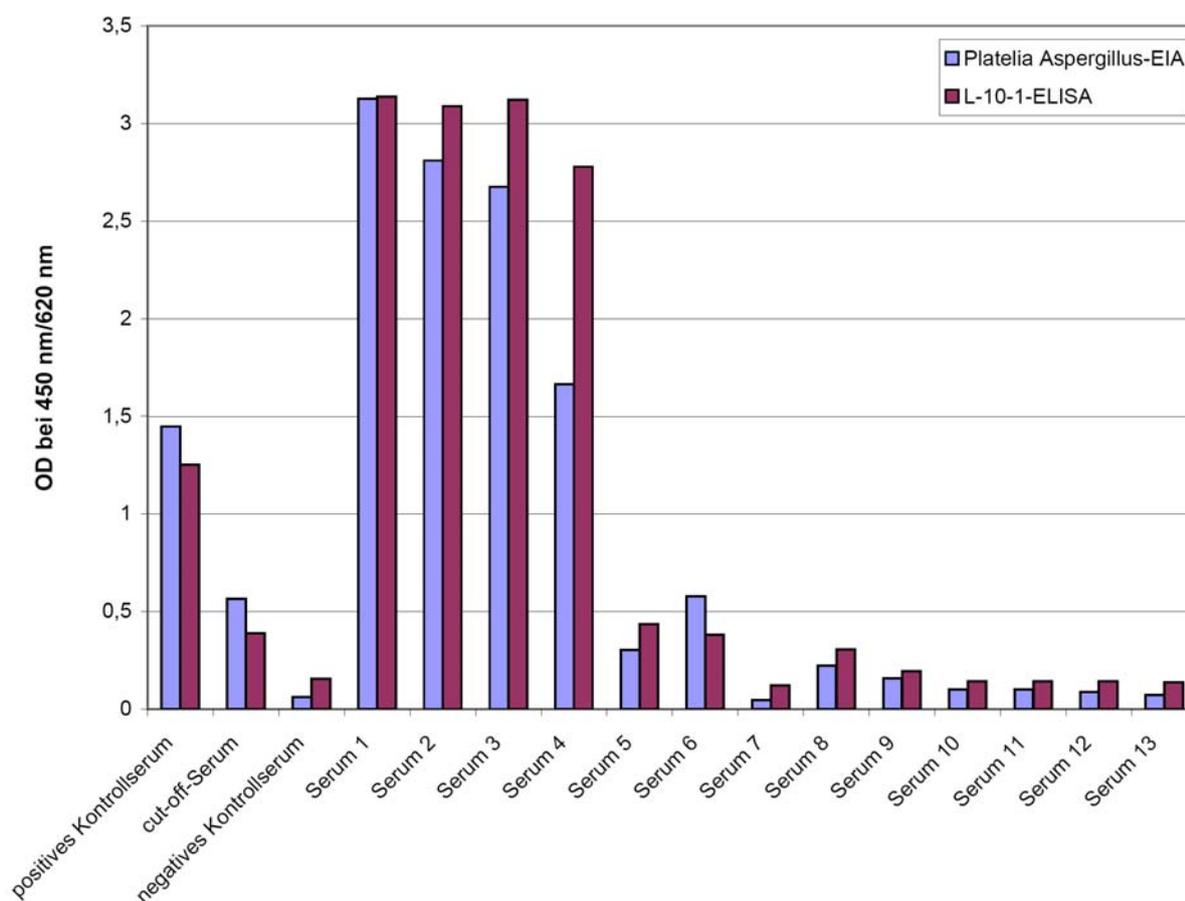


Abb. 41: Vergleich von Platelia Aspergillus EIA und einem auf L-10-1 basierendem ELISA

Es wurden neben den drei im Kit enthaltenen Kontrollseren auch 13 Patientenseren getestet. Die Patientenseren waren Restseren aus der hausinternen Serologie und waren bereits vorgetestet, so dass sie in drei Gruppen eingeteilt waren: Serum 1-4 galten als positiv, Serum 5-8 als grenzwertig und Serum 9 bis 13 als negativ.

Der Vergleich der beiden ELISAs zeigte, dass der L-10-1-ELISA auf ähnliche Ergebnisse kommt, wie der kommerzielle Platelia-ELISA. Einzig das Ergebnis der positiven Patientenseren fiel im L-10-1-ELISA noch deutlich intensiver aus.

3.5.8 Aufbau eines Sandwich-ELISAs mit L-99-13 und L-10-1-PO

Um die Sensitivität des ELISAs zu verbessern, sollte als nächstes ein Sandwich-ELISA aufgebaut werden, der auf 2 unterschiedlichen α -Gal β -Ak basiert: als Fänger sollte der Ak L-99-13 und zur Detektion der Peroxidase-konjugierte Ak L-10-1 dienen. Zu Beschichtung der ELISA-Platte wurde L-99-13 in der gleichen Konzentration eingesetzt, wie in den vorherigen Versuchen der Ak L-10-1 (50 μ g/ml). Der weitere Versuchsaufbau gleicht Protokoll 3.5.7.3. Getestet wurden die drei im Platelia-Kit enthaltenen Kontrollseren (positiv, *cut-off*, negativ), als auch die bereits im reinen L-10-1-ELISA getesteten Patientenseren 1-13.

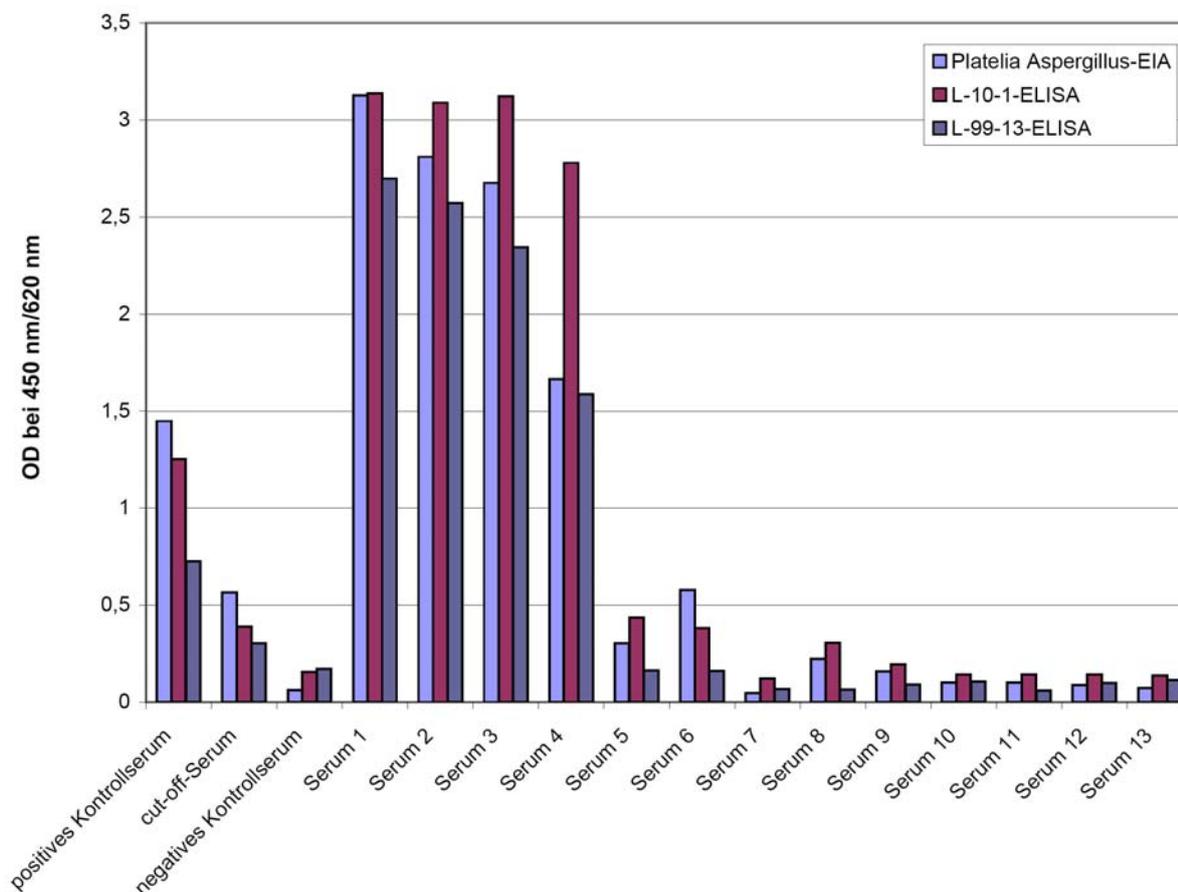


Abb. 42: Vergleich des L-99-13-ELISA mit L-10-1-ELISA und Platelia-ELISA

Der neu aufgebaute ELISA, basierend auf L-99-13 als Fänger-Ak, erkennt sowohl die Kontrollseren, als auch die Patientenseren ähnlich wie die beiden anderen ELISA (aus 3.5.7.3) als positiv bzw. negativ.

Die Messung des ELISA-Ergebnisses zeigt, dass der Austausch des bisher eingesetzten Fänger-Antikörpers L-10-1 durch L-99-13 ebenfalls zu einer richtigen Detektion der Testseren und der Patientenseren führt (siehe Abb. 42). Zwar fällt die Intensität insgesamt etwas schwächer aus, aber die positiv-negativ-Diskriminierung der klinischen Proben bleibt erhalten.

3.5.9 Testen auf Kreuzreaktion der drei ELISA Platelia Aspergillus, L-10-1/L-10-1-PO und L-99-13/L-10-1-PO mit Augmentan, Bifidumbakterien und pflanzlichem Galaktomannan

Für den Platelia-Aspergillus-ELISA sind bisher einige Kreuzreaktion beschrieben worden, darunter eine Kreuzreaktion mit Antibiotika wie Augmentan® (= Amoxicillin + Clavulansäure)

und eine mit Bifidobakterien. Letztere ist gehäuft bei Neugeborenen beobachtet worden, deren Darm dicht mit Bifidobakterien (*Bifidobacterium* sp.) besiedelt war (siehe 1.5.3.3.1). Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob die beiden ELISA mit L-10-1 bzw. L-99-13 als Fänger-Ak ebenfalls mit diesen beiden Substanzen kreuzreagieren. Daneben sollte getestet werden ob auch ein pflanzliches Galaktomannan, das anstelle von Galaktofuranose Galaktopyranose enthält, eine Kreuzreaktion hervorrufen kann.

Anstelle von Patientenseren wurden für diesen Versuch Lösungen von Augmentan (1 mg/ml), gefriergetrockneten Bifidobakterien (Bifidum-Milch mit Lactulose, Eugalan Töpfer LC; Töpfer, Allgäu) (1 mg Pulver/ml) und pflanzlichem Galaktomannan aus *Ceratonia siliqua* (=Johannesbrotbaum) (10 µg/ml) eingesetzt. Die restliche Durchführung des ELISAs blieb gleich (siehe oben).

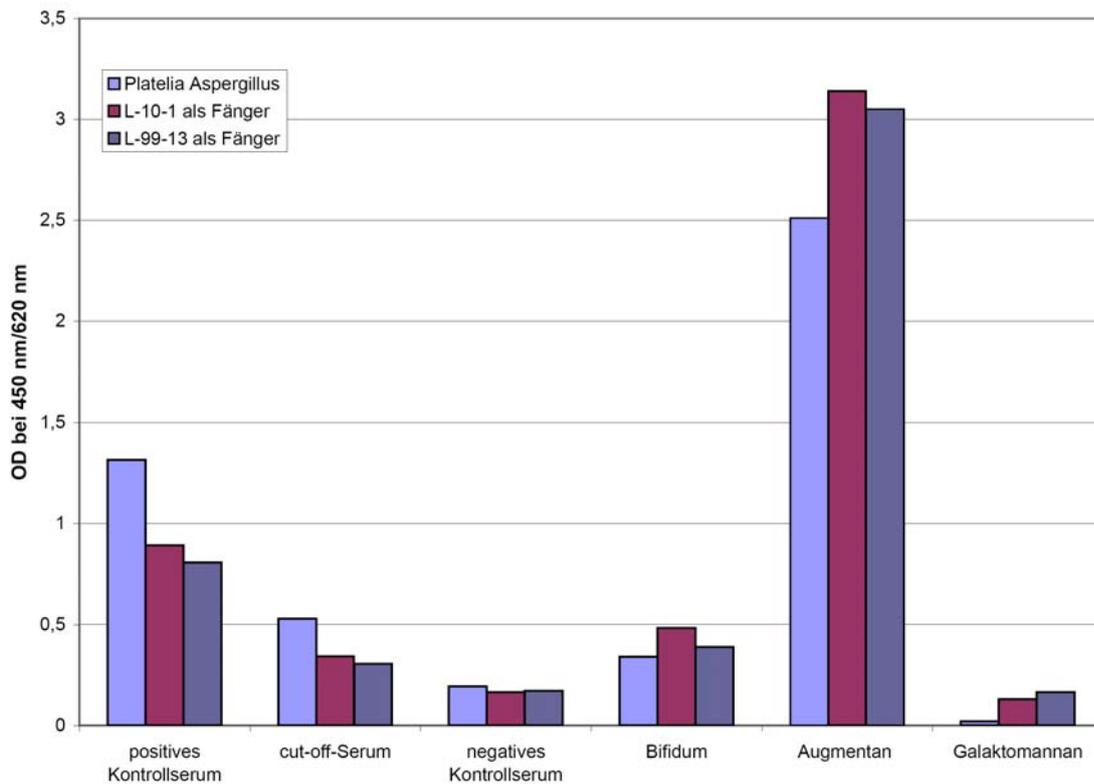


Abb. 43: Kreuzreaktion der drei ELISA mit Bifidobakterien, Augmentan und pflanzlichem Galaktomannan

Es zeigte sich, dass alle drei ELISA stark mit Augmentan kreuzreagierten, außerdem sehr schwach mit den Bifidobakterien und mit dem pflanzlichen Galaktomannan keiner der drei (siehe Abb. 43). Da aber eine Probe eigentlich erst dann als positiv gilt, wenn die OD nicht nur über der des negativen Kontrollserums, sondern auch der des *cut-off*-Kontrollwertes liegt,

kann die Reaktion des Platelia-ELISA mit den Bifidumbakterien in diesem Versuch als negativ gewertet werden.

4 Diskussion

Aspergillus fumigatus ist nach *Candida albicans* der häufigste Erreger invasiver Mykosen bei immungeschwächten Patienten und hat die höchste Letalitätsrate. Der Respirationstrakt bildet dabei sowohl die wichtigste Eintrittspforte für die Pilzsporen, als auch den häufigsten Manifestationsort (80-90%) der Infektion. Seine allgegenwärtigen Sporen gelangen über die Atemluft in die Lunge. Dort können sie auskeimen und sich vermehren, wenn sie nicht von einem funktionierenden Immunsystem eliminiert werden. Schließlich kommt es zur Invasion des Lungengewebes und später zur Einsprossung in benachbarte Organe oder hämatogener Streuung. Die Symptome einer invasiven Aspergillose sind unspezifisch (u.a. Abgeschlagenheit, Fieber, Husten) und werden häufig zu spät wahrgenommen, da die Patienten im Rahmen ihrer Grunderkrankung (z.B. AIDS) bzw. Immunsuppression bereits geschwächt sind. Daher werden klinische Symptomatik und radiologische Veränderungen meist erst im späteren Krankheitsverlauf auffällig (Rinaldi 1983). Der Goldstandard der mikrobiologischen Diagnostik basiert auf der Biopsie infizierten Gewebes und deren mikroskopische Auswertung in Kombination mit kulturellem Nachweis des Pilzes aus der Patientenprobe. Diese Vorgehensweise ist aber in Realität nur selten praktikabel, da die aufwendige Gewebegewinnung den geschwächten Patienten u.a. aufgrund eines zu hohen Blutungsrisikos oft nicht zumutbar ist (Hope et al. 2005).

Eines der Hauptprobleme in der Bewertung der Diagnostikergebnisse war bisher die mangelnde Vergleichbarkeit der Daten einzelner medizinischer Zentren aufgrund von fehlender Standardisierung. 2001 wurde dazu von der „European Organization for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC) und der „Mycoses Study Group“ (MSG) des „National Institute of Allergy and Infectious Diseases“ vorgeschlagen, die qualitative Aussage der Diagnostik der IA in drei Grade einzuteilen: die „gesicherte“ IA, die „wahrscheinliche“ IA und die „mögliche“ IA (Ascioglu et al. 2002).

Gesicherte IA	Nachweis von Hyphen mittels histo- oder zytopathologischer Untersuchung von Biopsiematerial aus einem Gebiet, das Anzeichen assoziierter Gewebedestruktion zeigt; oder positive Kultur aus einer Probe, die durch ein steriles Verfahren aus einem gewöhnlich sterilen, klinisch oder radiologisch krankhaft veränderten Gebiet, das mit einer Infektion vereinbar wäre, gewonnen wurde.
Wahrscheinliche IA	1 Risikofaktor (z.B. Neutropenie, Langzeitbehandlung mit Kortikosteroiden, persistierendes Fieber) und 1 mikrobiologisches Kriterium (z.B. positive Kultur aus Sputum, BAL oder Liquor) und 1 klinisches Hauptkriterium (z.B. neue Infiltrate / Halo-Zeichen im CT- oder Röntgenbild) oder 2 Nebenkriterien (z.B. Husten, Dyspnoe, Pleurareiben, Pleuraerguss)
Mögliche IA	1 Risikofaktor und 1 mikrobiologisches Kriterium oder 1 klinisches Hauptkriterium (s.o.) oder 2 klinische Nebenkriterien (s.o.)

Tab. 6: EORTC-MSG-Kriterien für die Definition der Invasiven Aspergillose (Ascioglu et al. 2002)

In der Klinik ist diese Einteilung der Invasiven Aspergillose jedoch nur bedingt sinnvoll. Aufgrund mangelnder biotischer Nachweise, teils negativer kultureller Nachweise und oft fehlender Hinweisen im CT/Röntgen, können die meisten Patienten nach den EORTC-Kriterien lediglich als „mögliche“ Invasive Aspergillose eingestuft werden. Es sind folglich weitere Differenzierungskriterien notwendig, um die Patienten genauer einteilen zu können und nur ausgewählte Patienten mit der zumeist nebenwirkungsreichen antimykotischen Therapie zu belasten.

4.1 Anforderungen an einen idealen Test für die Diagnostik der Invasiven Aspergillose

Eine sichere Diagnostik der Invasiven Aspergillose über Analyse von Gewebeproben (=Goldstandard) existiert zwar bereits, jedoch wird diese aufgrund ihrer Invasivität nur selten praktiziert. Eine weitere Testmethode wäre sinnvoll, um im Zusammenspiel mit radiologischen Befunden und klinischen Zeichen eine möglichst sichere Diagnose treffen zu können. Ein solcher idealer Test darf für den Patienten keine große Belastung darstellen und sollte somit möglichst wenig invasiv sein. Das Patientenserum wäre ein solches optimales Untersuchungsmaterial, das minimal invasiv, schnell und kostengünstig gewonnen werden kann. Da das Myzel des Pilzes selbst kaum im Serum zirkuliert, müssen IA-assoziierte Marker zu Hilfe gezogen werden.

Die Anforderungen an einen solchen Surrogat-Marker sind hoch (Yeo und Wong 2002). Er sollte:

- in großer Menge vom Pilz abgegeben werden
- bereits in der Frühphase der Infektion präsent sein
- möglichst spezifisch für die Gattung *Aspergillus* sein
- keine Kreuzreaktion mit menschlichem Serum oder Antigenen anderer Organismen hervorrufen
- nur mit der invasiven Erkrankung und nicht mit reiner *Aspergillus*-Kolonialisierung assoziiert sein
- valide und standardisierbar sein

Zu den von *A. fumigatus* während der Infektion abgegebenen Molekülen gehören sowohl Proteine wie z.B. Aspergillopepsin 1 oder Hämolyisin, als auch polysaccharidhaltige Substanzen, die entweder in Form eines Glykoproteins oder als Zellwandbestandteil vorliegen. Proteine haben den Vorteil, dass sie meist spezifisch für die Gattung *Aspergillus* sind. Pilz-Polysaccharide zeigen zwar eine geringere Variabilität als Proteinantigene, sie sind aber stabiler im Serum und liegen dort auch meist in größerer Konzentration vor, als Proteinantigene.

IA-assoziierte Serummarker sollten nur mit der Infektion, nicht jedoch mit der reinen

Kolonialisierung durch *A. fumigatus* assoziiert sein, da Substanzen des Pilzes nur nach Gewebe- und Gefäßinvasion in die Zirkulation gelangen. Durch den Nachweis IA-assoziierte Serummarker könnte die Rate an falsch positiven Diagnosen, wie z.B. bei der PCR-Diagnostik aus Bronchialsekret oder Sputum, gesenkt werden. Wichtig ist dabei, dass diese Marker bereits in der Frühphase der Infektion präsent sind, damit möglichst noch in der Initialphase die Erkrankung gesichert und mit der Therapie begonnen werden kann. Denn jede Verzögerung in der Behandlung führt zu einem unmittelbaren Anstieg der Letalitätsrate (von Eiff et al. 1995).

Eine der schnellsten und sichersten Methoden zum Nachweis von Pilzsubstanzen im Serum ist der ELISA. Da ein ELISA-Test maschinell unterstützt durchgeführt werden kann, bietet er eine sowohl personalsparende als auch standardisierbare Möglichkeit der Diagnostik

Ein seit Mitte der 90er Jahre kommerziell erhältlicher Aspergillus-Antigen-Capture-ELISA (Platelia Aspergillus-EIA, BioRad) (in den USA erst seit 2003 zugelassen), mit welchem Galaktomannan, ein Hauptbestandteil der Aspergillen-Zellwand, nachgewiesen wird, stellt eine solche, mittlerweile etablierte, nicht invasive diagnostische Methode dar. Dabei werden Hochrisikopatienten durch seriell abgenommene Seren (1-2x wöchentlich) im Rahmen eines Screening-Programmes überwacht. Auf diese Weise konnte bei 80% der Patienten die IA bereits 8 Tage vor dem Auftreten klinischer Symptome bzw. radiologischer Zeichen entdeckt werden (Maertens et al. 2002).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob weitere zirkulierende Antigene von *A. fumigatus* bei IA-Patienten nachgewiesen werden können und damit die Diagnostik der IA verbessert werden kann.

Zunächst wurde versucht die von *A. fumigatus* unter verschiedenen Kulturbedingungen sezernierten oder freigesetzten Proteine zu charakterisieren. Es wurde die Proteinsekretion in vier verschiedenen Medien untersucht: einem Hefe-Glukose-Medium (YG), einem rein hefehaltigem Medium (1% Y), einem Kollagenmedium (0,2% Coll) welches der extrazellulären Matrix im Gewebe entspricht und einem Spezialmedium, das neben Glukose noch Pepton und NaCl enthält (Hly). Die Pilzkulturüberstände wurden aufkonzentriert und über SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden Coomassie-anfärbbare Proteinbanden ausgeschnitten und über MALDI-TOF-MS analysiert. Auffällig war, dass sich im Kulturüberstand des Kollagenmediums besonders degradierende Enzyme wie u.a. Glutaminase, Dipeptidylpeptidase oder Catalase befanden. Dies liegt wahrscheinlich am Mangel von Glukose im Nährmedium, wodurch der Pilz auf Aminosäuren als Kohlenstoffquelle angewiesen ist. Des weiteren fanden sich im Kollagenkulturüberstand zwei

Toxine, Mitogillin und Hämolysin, wobei das zweite noch nicht ausreichend in der Literatur charakterisiert wurde. Die konzentrierten Kulturüberstände von YG und 0,2% Coll wurden ohne Auftrennung zur Immunisierung von je zwei Mäusen verwendet, um monoklonale Antikörper herzustellen. Nach Fusion der Mäuse-Lymphozyten mit Myelomzellen konnten antikörperproduzierende Hybridomzellen erhalten werden. Die so gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden schließlich hinsichtlich ihres diagnostischen Potentials an Patientenmaterial getestet. Dabei waren besonders die Protease PEP1, die vom Pilz in großer Mengen in den Kulturüberstand sezerniert wurde, als auch das Toxin Hämolysin von Bedeutung. Da es sich bei beiden um potentielle Virulenzfaktoren handelt, ist die Expression und folgende Sekretion ins menschliche Blut als wahrscheinlich anzunehmen. Das dritte von monoklonalen Antikörpern erkannte Antigen war das galaktofuranosehaltige Galaktomannan.

4.2 Die Diagnostik der Invasiven Aspergillose anhand Aspergillopepsin 1

Zunächst sollten die sezernierten Moleküle unter Wachstum des Pilzes in YG_F-Medium analysiert werden. Dabei wurde das ca. 37 kDa große Protein Aspergillopepsin 1 (PEP1) als das vorherrschende Protein im Kulturüberstand identifiziert. PEP1 gehört zur Gruppe der Aspartylproteasen und bildet damit neben den Serin- (ALP) und Metalloproteasen (MEP) die dritte am besten untersuchte Proteasegruppe von *A. fumigatus*. Hydrolytische Enzyme spielen eine zentrale Rolle in der Virulenz von Bakterien, Protozoen und pathogenen Hefen. Unter diesen wiederum sind es die Proteasen (eiweißverdauende Enzyme), die am häufigsten mit Virulenz assoziiert sind. Bei saprophytären Pilzen sind sezernierte Proteasen wahrscheinlich in erster Linie für die Versorgung des Pilzes mit Nährstoffen zuständig (Naglik et al. 2003). Den sezernierten Proteasen kommt zusätzlich eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Invasiven Aspergillose zu. Man geht davon aus, dass dem pathogenen Pilz *A. fumigatus* die proteolytischen Enzyme zusätzlich im Infektionsprozess nützen, um von seinem Hauptauskeimungsort in der Lunge in das umliegende proteinreiche Bindegewebe einzudringen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei der Gene der drei Hauptproteasen von *A. fumigatus*, MEP und ALP, gezielt deletiert (Monod et al. 1993; Tang et al. 1993; Jatou-Ogay et al. 1994). Im Vergleich zum Wildtyp konnte bei den Mutanten aber keine Verminderung der Virulenz im Tiermodell nachgewiesen werden. Dies schließt aber nicht ihre Virulenzfunktion aus, da das Mausinfektionsmodell zum Nachweis dieser Defekte

vielleicht nicht geeignet ist.

Auch die Bedeutung der dritten Protease, PEP1, für die Virulenz von *A. fumigatus* ist noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch deuten bisherige Untersuchungen daraufhin, dass PEP1 ebenfalls in keinem Zusammenhang mit der Virulenz steht. So konnte anhand einer PEP1-Deletionsmutante gezeigt werden, dass sowohl das Ausmaß der Invasion in der Lunge von Meerschweinchen, als auch die Letalität der Tiere gleich der des Wildtyps war (Reichard et al. 1997). Da jedoch ein weiteres, zellwandständiges Aspergillopepsin existiert (PEP2) und dieses in der PEP1-Mutante weiterhin aktiv war, ist es möglich, dass diese strukturell ähnliche Protease die Funktion von PEP1 ersetzt (Redundanz der Proteasen). Es müsste also eine Doppel-Mutante entwickelt werden, um den vollen Effekt der Deaktivierung des Aspergillopepsins im Tiermodell zu untersuchen. Des Weiteren weiß man seit der Entschlüsselung des Genoms von *A. fumigatus*, dass neben den drei bereits gut charakterisierten Proteasen noch mindestens 111 weitere Proteasegene existieren (Reichard et al. 2008), von denen mindestens 52 ein Signalpeptid besitzen und damit sezerniert werden (siehe Anhang) (Robson et al. 2005).

Ob PEP1 unter Infektionsbedingungen im Menschen in einer Menge sezerniert wird, die ausreichend für die Detektion im Patientenserum ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dafür wurden zwei Mäuse mit aufkonzentriertem YG_f-Kulturüberstand immunisiert. Die Plasmazellen wurden mit Myelomzellen fusioniert und die so entstandenen Hybridomzellen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion analysiert. Es konnte eine monoklonale Hybridomzelle selektiert werden, die Antikörper gegen PEP1 produziert. Die Antikörper wurden gegen Kulturüberstand einer PEP1-Mangelmutante getestet (ebenfalls gewachsen in YG_f). Im Western-Blot konnte kein Protein mit dem PEP1-mAk nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass gegen kein weiteres als das 37 kDa große PEP1-Protein, Reaktivität besteht.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob PEP1 auch unter anderen Kulturbedingungen sezerniert wird. Dazu wurden Sporen von *A. fumigatus* in drei weiteren Medien inkubiert: Im Kollagenmedium, im Hly-Medium und im 1%-Y-Medium. In keinem der drei Kulturüberstände, aufgetrennt über SDS-Gele, konnte rein visuell eine Bande im Bereich von 37 kDa ausgemacht werden. Der Kulturüberstand der Kollagenkultur wurde zusätzlich mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit der α -PEP1-Antikörper-Lösung konnten keine Bande nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass im Kollagenmedium kein PEP1 sezerniert wurde. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da PEP1 die drei Hauptproteine der Lungenmatrix, Kollagen, Elastin und Laminin, degradieren kann (Lee und Kolattukudy

1995). Während ein elastinhaltiges Kulturmedium die Sekretion von PEP1 induziert, trifft dies für ein kollagenhaltiges Kulturmedium nicht zu. Es ist bekannt, dass die Sekretion von Proteasen abhängig ist von der Zusammensetzung des Kulturmediums (Gifford et al. 2002; Schwienbacher et al. 2005).

Reichard und Kollegen konnten in histologischen Schnitten nachweisen, dass PEP1 unter Infektionsbedingungen in der menschlichen Lunge sezerniert wird (Reichard et al. 1994). In dieser Arbeit sollte versucht werden, PEP1 in Seren von Patienten mit einer nachgewiesenen Invasiven Aspergillose zu detektieren. Damit wäre die erste Voraussetzung erfüllt, um einen auf PEP1 basierenden serologischen Test zur Diagnostik der IA zu entwickeln. Dazu wurden 9 unterschiedliche Seren mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich des Vorhandenseins von PEP1 untersucht. Der monoklonale Antikörper α -PEP1 färbte dabei gleich stark Proteinbanden unterschiedlicher Größen in allen Patientenseren, jedoch kam es zu keiner Färbung in Höhe von 37 kDa, wo das Aspergillopepsin1 erwartet wurde (siehe Abb. 17). Es schien sich also lediglich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einigen Serumproteinen zu handeln. Die Ursache für die fehlende Detektion von PEP1 im Serum könnte eine zu geringe Konzentration von PEP1 im Blut sein, z.B. bedingt durch eine zu geringe Invasion von Arterien bzw. Arteriolen durch den Pilz, mit dortiger PEP1-Sekretion. Des weiteren wäre es denkbar, dass das Protein PEP1 durch serumeigene Proteasen bereits vorzeitig im Blut abgebaut worden war. Außerdem muss erwähnt werden, dass die Analyse via Western-Blot nicht sehr sensitiv ist. Eine sensitivere Methode zur Detektion von Proteinen in Serum wäre der ELISA, der zusätzlich zur qualitativen auch eine quantitative Aussage ermöglicht. Der Aufbau eines Sandwich-ELISAs basierend auf dem mAk α -PEP1 als Fänger- und/oder Detektions-AK wäre in der Fortsetzung der vorliegenden Arbeit der nächste Schritt.

Abschließend wurde α -PEP1-Antikörper auch in der Immunfluoreszenz zum Nachweis von Aspergillus-assoziiertem PEP1 getestet. Dazu wurden in YG_r-Medium ausgekeimte *A. fumigatus* Sporen auf einem Objektträger fixiert und nach einem Inkubationsschritt mit dem mAk α -PEP1 mit einem Cy3-markierten α -Maus-Ak gefärbt. Es konnte jedoch in keinem Präparat ein spezifisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis passt zur Charakterisierung von PEP1, welches ein sezerniertes Protein ist, das nicht membranassoziiert ist. Die Antikörper können nur das Äußere des Pilzes färben und nicht durch die Zellwand ins Zytosol eindringen, wo sich ebenfalls ein Teil des PEP1 vor der Ausschleusung aus der Zelle finden sollte. Außerdem ist nicht jeder Antikörper, der im Western-Blot Proteinantigene erkennt, auch für die Immunfluoreszenzfärbung geeignet, da das Antigenepitop markiert sein kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein monoklonaler Antikörper gegen das sezernierte PEP1 von *A. fumigatus* entwickelt werden konnte, dieser jedoch für den PEP1-Nachweis in Patientenmaterial ungeeignet ist. Dieses negative Ergebnis könnte an einer zu geringen Konzentration von PEP1 im Serum liegen, oder daran, dass das Epitop für Mab-PEP1 nicht zugänglich ist.

4.3 Das Toxin Hämolysin

Neben Proteasen werden auch einige Toxine von *A. fumigatus* als Virulenzfaktoren diskutiert. Es sind bisher sechs Toxine bekannt, die von den Hyphen sezerniert werden, darunter das gut charakterisierte Ribotoxin/Mitogillin, das bereits im Urin von IA-Patienten detektiert werden konnte (Lamy et al. 1991). Ein weiteres Toxin, Hämolysin (Hly) mit einer Größe von ca. 17 kDa, konnte in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF-MS im Kulturüberstand eines 0,2%igen Kollagenmediums identifiziert werden (vgl. Abb. 9). Neben der Sezernierung durch Hyphen konnte es auch im Kulturüberstand ruhender Sporen nachgewiesen werden (Schwienbacher et al. 2005). Hierbei handelt es sich um ein aus 131 Aminosäuren bestehendes, ca. 14 kDa großes Protein, das zur Familie der Aegerolysine zählt. Es wird berichtet, dass die Proteine dieser Familie in der Initialphase der Sporenbildung von Bedeutung zu sind. Für Hämolysin selbst ist bereits eine hämolytische Aktivität bezüglich der Erythrozyten verschiedener Spezies nachgewiesen worden, darunter besonders humaner, Kaninchen- und Schafserythrozyten (Sakaguchi et al. 1977). Ebenso ist in vitro ein zytotoxischer Effekt bezüglich Makrophagen und Endothelzellen, als auch die Fähigkeit zur Induktion der Zytokinproduktion bekannt (Kumagai et al. 1999; Kumagai et al. 2001). Da Hämolysin im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte, wurde mittels des Programmes „signal-P“ untersucht, ob es auch ein für die Sekretion notwendiges N-terminales Signalpeptid aufweist. Mit dem Programm konnte kein Signalpeptid für Hämolysin nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass *A. fumigatus* über einen atypischen Sekretionsmechanismus verfügen muss, um Proteine ohne Signalpeptid aus der Zelle zu schleusen. Erste Hinweise auf atypische Sekretionswege konnten bereits bei *A. niger* gewonnen werden (Punt et al. 2001). Auch bei *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* sind zahlreiche extrazelluläre Proteine ohne Signalpeptid beschrieben (Nombela et al. 2006). Insgesamt wurden im Kulturüberstand des Kollagenmediums 10 Proteine identifiziert, von denen 2 kein Signalpeptid besaßen.

Auch gegen Hämolysin sollten monoklonale Antikörper hergestellt werden. Ähnlich wie bei

der Generierung vom mAk α -PEP1, wurden dafür 2 Mäuse mit Kulturüberstand immunisiert, nur diesmal mit Kollagenkulturüberstand anstelle von YG_F-Kulturüberstand. Da jedoch Hämolyisin nur eines von vielen sezernierten Proteinen im Überstand ist, sollte zusätzlich ein rekombinant hergestelltes Hämolyisin zur Immunisierungslösung hinzugefügt werden, um die Immunantwort gegen Hämolyisin zu verstärken. Dafür musste zunächst die DNA des Hly-Gens mittels PCR amplifiziert werden. Das Amplifikat wurde in einen Vektor (pQE30 UA) eingebaut und in elektrokompetente *E.coli* transfiziert. Das rekombinante Hämolyisin wurde aus der *E.coli*-Kultur mithilfe einer Talonmatrix aufgereinigt und konnte schließlich zur Immunisierung der Mäuse verwendet werden. Die Lymphozyten der Mäuse wurden wiederum mit Myelomzellen hybridisiert und die daraus entstandenen Hybridomzellen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion untersucht. Die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände wurden im Western-Blot sowohl auf einer Membran mit rekombinantem Hämolyisin getestet, als auch auf einer Membran, auf der die Kollagenkultur-Überstandsproteine übertragen waren.

Es fand sich zum einen ein Hybridomzellklon (L-2), der im Kollagenkulturüberstand eine Proteinbande der Größe 17 kDa erkannte, jedoch weder mit dem rekombinanten Hly reagierte, noch mit dem ähnlich großen rekombinanten Überstandsprotein Mitogillin (18 kDa). Bei dem Epitop des Antikörpers L-2 handelt es sich zwar um ein sezerniertes Protein aus dem Kollagenkulturüberstand, jedoch wahrscheinlich nicht um Hämolyisin selbst sondern um ein Protein ähnlichen Molekulargewichtes. Es wäre allerdings auch denkbar, dass der Ak L-2 zwar gegen Hly gerichtet ist, allerdings genau an das Epitop bindet, an der das rekombinante Hly einen Basenaustausch während der Amplifizierung erfahren hatte, der wiederum zum Austausch einer Aminosäure geführt hat (siehe 3.3.1.1). Diese Möglichkeit ist jedoch als weitaus unwahrscheinlicher anzusehen.

Zum anderen fanden sich zwei Hybridomzellklone (L-102 und L-125), die zwar das rekombinante Hly erkannten, aber kein Überstandsprotein in der Kollagenkultur. Da zuerst angenommen wurde, dass das Epitop dieser beiden Antikörper vielleicht das His₆-Tag des rekombinanten Hämolyisin sein könnte, wurde überprüft, ob sie auch mit einem anderen His₆-Tag-Protein, in diesem Fall rekombinantes His₆-Mitogillin, reagieren würden. Allerdings blieb hier eine Reaktion aus, weshalb diese These verworfen werden konnte.

Die fehlende Reaktivität mit Kulturüberstand-Hämolyisin könnte auch für eine posttranslationale Modifikation des sezernierten Hämolyisins sprechen

Nach der Subklonierung der Klone L-2 und L-125 konnten monoklonale Hybridomzellen bzw. monoklonale Antikörper gewonnen und diese für weitere Versuche verwendet werden.

Als nächstes wurde versucht mit den monoklonalen Antikörpern Hämolsin in Patientenseren nachzuweisen. Dafür wurden die Seren von neun IA-Patienten durch das Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den Antikörpern L-2-? bzw. L-125-3 inkubiert. Keiner der beiden Antikörper konnte in den Seren spezifisch ein Protein erkennen. Beide Blots zeigten lediglich unspezifische Kreuzreaktionen mit mutmaßlichen Serumproteinen (siehe Abb. 26), wie bereits bei der Untersuchung der Patientenseren mit einem Mab-PEP1 (vgl. Abb. 17). Auch die Suche nach Antikörpern gegen rekombinantes Hly in den Patientenseren blieb erfolglos, was dafür sprechen könnte, dass Aspergillus-Hämolsin unter Infektionsbedingungen nicht sezerniert wird oder ein schwaches Antigen ist.

4.4 Galaktofuranose und seine Bedeutung für die Diagnostik der Invasiven Aspergillose

Zirkulierende Antigene von *A. fumigatus* wurden erstmals 1978 entdeckt (Lehmann und Reiss 1978). Dazu wurde ein gesundes Kaninchen mit dem Serum eines an einer disseminierten Invasiven Aspergillose erkrankten Kaninchens immunisiert. Mit Hilfe des so gewonnenen Antiserums konnte sowohl in Kaninchen als auch in Menschen mit einer Invasiven Aspergillose ein spezifisches Antigen detektiert werden. Dieses immunreaktive Molekül wurde ein Jahr später als das Polysaccharid Galaktomannan identifiziert (Reiss und Lehmann 1979). Die Gruppe um Bennett und Kollegen konnte zeigen, dass das immundominante Epitop des Galaktomannan durch den Zucker Galaktofuranose (GalF) gebildet wird (Bennett et al. 1985). Dieser ist als Seitenkette an dem nicht immunogenen Mannan-Grundgerüst verankert (siehe Abb. 2). Galaktomannan selbst besitzt ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Darüber hinaus sezerniert *A. fumigatus* zahlreiche Glykoproteine der Größe 35 kDa bis 94 kDa, die ebenfalls Galaktofuranose-Reste tragen (Latge et al. 1994).

Die Kinetik der Freisetzung GalF-haltiger Moleküle ist noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass die Freisetzung der Glykoproteine und Polysaccharide in vitro zwar nicht von der Umgebungstemperatur, aber von der Zusammensetzung des Kulturmediums und der Inkubationszeit abhängt (Latge 1995). Die Medienabhängigkeit der Freisetzung dieser Antigene konnte auch in dieser Arbeit belegt werden. Es wurden Sporen von *A. fumigatus* in vier unterschiedlichen Kulturmedien inkubiert. Dazu wurde ein kollagenhaltiges Medium, ein filtriertes Hefe-Glukose-Medium, ein 1%iges Hefemedium und ein Spezialmedium (Hämolsin-Medium) (vgl. 3.1) verwendet. Die abfiltrierten Kulturüberstände wurde

anschließend hinsichtlich ihrer sezernierten Proteine miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die jeweiligen Proteinbandenmuster höchst spezifisch für das verwendete Medium waren und untereinander große Unterschiede aufwiesen.

Außerdem wurden die verschiedenen Kulturüberstände (YG_f, 0,2%-Coll, Hly) mittels Western-Blot-Analyse auf galaktofuranosehaltigen Proteinen untersucht. Dazu wurden die Blots mit den beiden α -Gal_f-Antikörpern L-99-13 und L-10-1 gefärbt. Es zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit vom Kulturmedium (vgl. 3.5.2), die sich sowohl in der Konzentration, als auch in der Größe der Gal_f-haltigen Proteine zeigte. Es scheint im Kollagenmedium zu einer stärkeren Galaktofuranosylierung der Proteine zu kommen, als in den anderen beiden Medien. Außerdem konnten hier galaktofuranosehaltige Proteine ab einer Größe von 37 kDa identifiziert werden, im Gegensatz zu 60 bzw. 75 kDa im Hly- bzw. YG_f-Medium. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch die Immunfluoreszenzfärbung des in den unterschiedlichen Medien gewachsenen Myzels mittels des mAk L-99-13. Die Hyphen aus der Kollagenkultur zeigten die intensivste Fluoreszenz mit L99-13, gefolgt von den Hyphen aus der Hly-Kultur.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit Aufschluss darüber gewonnen werden, in welchen Wachstumsstadien die Proteine galaktofuranolysiert werden. Dazu wurden ruhende, angeschwollene und auskeimende Sporen mit dem mAk L-99-13 immunfluoreszenzgefärbt. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich auskeimende Sporen und ihre Hyphen auf ihrer Oberfläche Galaktofuranosylepitope tragen (vgl. Abb. 35).

In der Immunfluoreszenz konnte allerdings nicht nur das Myzel von *A. fumigatus* durch L-99-13 gefärbt werden, sondern ebenfalls das anderer *Aspergillus*-Arten wie *A. niger* und *A. giganteus*. Es lässt sich daraus schließen, dass die Myzeloberfläche auch von anderen *Aspergillus*-Arten galaktofuranolysiert ist. Für diagnostische Zwecke ist dies nicht von großer Bedeutung, da alle Infektionen durch die verschiedenen *Aspergillus*-Arten auf gleiche Weise therapiert werden. Von Interesse ist, in wie weit diese Kulturmedien die In-vivo-Situation widerspiegeln. In der Lunge trifft der Pilz auf eine proteinreiche Umgebung, basierend v.a. auf Elastin und Kollagen, mit einem pH von ca. 7,4. Wahrscheinlich wird der Pilz über benachbarte Gefäße ständig mit Glukose aus dem Blutkreislauf versorgt. Um die Kinetik der Galaktomannanfreisetzung in vivo besser verstehen können, müsste ein Kulturmedium gefunden werden, das dem Pilz ähnliche Gewebebedingungen bietet.

Um die in vivo Präsenz von Pilzgalaktomannan zu überprüfen, wurden zusätzlich histologische Schnitte, die aus der Lunge eines Patienten mit invasiver Aspergillose gewonnen wurden, mit den mAk L-99-13 und L-10-1 für die Immunfluoreszenzfärbung inkubiert. Es gelang das Aspergillenmyzel im Gewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung

sichtbar zu machen. Dieses Ergebnis spricht dafür, *Aspergillus*-Infektionen mittels des mAk L-99-13 und L-10-1 zu detektieren. Es wäre z.B. denkbar, durch bildgebende Verfahren Aspergillusherde zu identifizieren, diese zu biopsieren und anschließend mit den mAk L-99-13 oder L-10-1 zu färben, um so eine Infektion durch *Aspergillus spp.* sicherzustellen. Jedoch musste zuvor sichergestellt werden, ob andere Pilze wie z.B. der häufige opportunistische Erreger *Candida albicans*, auch Galaktofuranose-Epitope tragen und dadurch ebenfalls durch die beiden α -Gal-f-Ak zu detektieren wären. Um das zu überprüfen wurden histologische Schnittpräparate einer mit *C. albicans* infizierten Lunge mit dem mAk L-10-1 und L-99-13 immungefärbt. *C. albicans* war durch diese zwei Antikörper nicht anfärbbar, woraus sich folgern lässt, dass er keine Galaktofuranose-Epitope auf seiner Oberfläche trägt. Dies Ergebnis spricht für die *Aspergillus*-Spezifität der mAk L-10-1 und L-99-13.

Auch für die serologische Diagnostik der IA eignen sich Kohlenhydrate wie Galaktomannan zum Nachweis eher als Proteine, da sie über einen langen Zeitraum und auch bei erhöhter Temperatur stabil sind. Um die Diagnostik von *A. fumigatus*-Infektionen durch Antigennachweis anhand von einfach zu gewinnenden Serumproben zu verbessern, sollte in dieser Arbeit ein Sandwich-ELISA basierend auf den beiden mAk L-99-13 und L-10-1 aufgebaut werden. Da diese beiden mAk in vorangegangenen Versuchen leicht differierende Färbereigenschaften aufgezeigt haben, kann davon ausgegangen werden, dass beide ein unterschiedliches Epitop innerhalb des Galaktomannans erkennen. Dies wäre von Vorteil, da die beiden Antikörper nicht um dasselbe Epitop konkurrieren würden.

Da bereits ein etablierter Sandwich-ELISA (Platelia Aspergillus Eia, BioRad) auf dem Markt ist, der auf der Erkennung von Galaktofuranose-Epitopen basiert, sollte sich in dieser Arbeit an diesem Test orientiert werden. Der Platelia-Test verfügt über einen monoklonalen Ratten- α -Gal-f-Antikörper (EB-A2), der sowohl als Antigen-Fänger-Antikörper, als auch als Peroxidase-gekoppelter Antigen-Detektor-Antikörper eingesetzt wird. Der Einsatz des selben Antikörpers als Fänger und Detektor ist nur möglich, da es sich bei dem Galaktofuranosylepitop um ein Polysaccharid mit vielen sich wiederholenden Epitopen handelt, so dass beide Antikörper binden können. Anders verhält sich dies allerdings bei Proteinen mit einem oder wenigen Galaktofuranose-Resten. Hier könnte die Antikörperbindung des Epitops die Bindung eines weiteren galaktofuranosylspezifischen Antikörpers verhindern.

Zunächst wurde der mAk-L-10-1 als Detektions-Antikörper mit Peroxidase (PO) konjugiert. Als nächstes musste untersucht werden, ob eine Detektion von Galaktofuranoseresten mittels L-10-1-PO überhaupt im ELISA möglich ist und in welcher Konzentration der

Antikörper dafür am geeignetsten vorliegen sollte. Dafür wurde eine bereits mit dem Antikörper EB-A2 vorbeschichtete ELISA-Platte aus dem Platelia-Kit mit den beiliegenden Kontrollseren beladen (ein stark positives, ein grenzwertiges („cut-off“) und ein Aspergillus-Galaktomannan-negatives Kontrollserum) und dem Peroxidase-gekoppelte Ak L-10-1-PO in vier unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert (zwischen 0,125 und 1 µg/ml). Es zeigte sich, dass die Detektion von Galaktofuranosylresten durch L-10-1-PO im ELISA möglich ist. Die Konzentration von 0,5 µg/ml stellte sich als die geeignetste heraus und wurde im folgenden stets im ELISA verwendet. Im nächsten Schritt musste eine geeignete Konzentration für den Fänger-Antikörper gefunden werden. Dazu wurde der Antikörper L-10-1 in sieben unterschiedlichen Konzentrationen in Beschichtungspuffer verdünnt (zwischen 0,5 und 50 µg/ml) und die Mikrotiterplatte damit inkubiert. Anschließend wurden ebenfalls die Kontrollseren aus dem Platelia-Kit und der Detektions-Antikörper L-10-1-PO in der zuvor ermittelten Konzentration von 0,5 µg/ml hinzu pipettiert. Bei der Entwicklung des Tests wurde deutlich, dass die Intensität des Enzymsubstrats mit zunehmender Konzentration des eingesetzten Fänger-Aks stieg. Die Reaktionsintensität könnte durch zunehmenden Konzentrationseinsatz des „Fänger“-Aks wahrscheinlich noch gesteigert werden. Der ELISA-Test wurde zur weiteren Evaluierung auf 50µg/ml eingestellt.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass der L-10-1-Sandwich-ELISA zwischen den Kontrollseren ähnlich gut differenzieren kann wie der Platelia-ELISA, sollte eine Reihe von Patientenseren untersucht werden, um den ELISA für eine künftige serologische Diagnostik der „Invasiven Aspergillose“ zu qualifizieren. Dazu wurden bereits mit dem Platelia-Kit vorgetestete Seren aus der serologischen Diagnostik des Routinelabors des MvPI verwendet. Entsprechend der serologischen Titer wurden drei Gruppen definiert: Sicher positiv (= zweimalig positiv getestet), eventuell positiv (= einmal positiv, in der Wiederholung negativ getestet) und negativ. Die Ergebnisse des Platelia-Kits konnten mit dem L-10-1-ELISA-Test bestätigt werden.

Da der ELISA in der Kombination der mAk L-10-1 und L-10-1-PO zuverlässige Ergebnisse erzielte, sollte in einem nächsten Schritt der Fänger-Ak durch L-99-13 ausgetauscht werden. Dafür wurde die ELISA-Platte mit dem aufgereinigten mAk L-99-13 in der selben Konzentration wie der vorher eingesetzte mAk L-10-1 beschichtet und zunächst anhand der Kontrollseren getestet. Auch in dieser Antikörper-Kombination konnte der ELISA die Kontrollseren zuverlässig erkennen, daher wurden als nächstes ebenso die Patientenseren getestet. Es zeigte sich, dass die Patientenseren mit dem L-10-1-ELISA ähnliche Ergebnisse ergaben, wie mit dem Platelia-Kit, jedoch fielen die einzelnen ELISA-Werte insgesamt etwas

schwächer aus, als in den anderen beiden ELISA. Grund dafür könnte eine leichte unspezifische Hintergrundreaktion des L-10-1-ELISA und des Platelia-ELISA sein, die z.B. durch ungenügende Absättigung durch BSA entstanden ist, oder eine ungenügende Waschung der ELISA-Platten vor der Entwicklung.

Abschließend sollten in dieser Arbeit zwei Formen von Kreuzreaktionen des Platelia-ELISA überprüft werden. Hierbei handelt es sich zum einen um eine relativ häufig beobachtete Kreuzreaktion mit dem Antibiotikum Augmentan® (= Amoxicillin + Clavulansäure). Da Amoxicillin aus Pilzen der Gattung *Penicillium* gewonnen wird, die wie *A. fumigatus* Galaktomannan als Hauptbestandteil der Zellwand besitzen, kann es durch den Herstellungsprozess mit Galaktomannan kontaminiert sein (Mattei et al. 2004). Die zweite häufige Kreuzreaktion wurde mit Antigenen von Bifidobakterien beobachtet. Diese gehören zur physiologischen Darmflora des Menschen und können bei Darmmukosaschädigung, z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, in den Blutkreislauf übertreten (Mennink-Kersten et al. 2005). Um herauszufinden, ob auch der reine L-10-1-ELISA sowie der L-99-13/L-10-1-ELISA mit diesen Antigenen kreuzreagiert, wurden die ELISA-Tests wie beschrieben durchgeführt, nur dass anstelle der Patientenseren eine Augmentan- bzw. eine Bifidumbakterienlösung eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde überprüft, ob die beiden ELISA-Tests auch pflanzliches Galaktomannan erkennen können, welches statt Galaktofuranose Galaktopyranose enthält. Leider zeigten beide Versionen des in dieser Arbeit entwickelten ELISA-Tests, mit L-99-13 und mit L-10-1, eine ähnliche Kreuzreaktivität mit Augmentan®, wie der Platelia-ELISA. Dieses Problem könnte vielleicht durch Verwendung von Antikörpern, die Aspergillus-Proteinantigene erkennen, die während der Infektion freigesetzt werden (z.B. die beschriebenen Überstandsproteine im kollagenhaltigen Medium) gelöst werden. Für diese Alternativen wurde mit dieser Arbeit eine Grundlage geschaffen.

5 Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist der häufigste zum Tode führende opportunistische Erreger invasiver Mykosen des Menschen. Durch den zunehmenden Einsatz von Immunsuppressiva und aggressiverer Chemotherapieschemata, aber auch durch Zunahme von Organ- und Stammzelltransplantationen, steigt die Zahl abwehrgeschwächter Patienten stetig an und mit ihnen die Zahl der Invasiven Aspergillosen. Bei steigender Inzidenz blieb die Letalität trotz weiterentwickelten Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren nahezu konstant. Einer der Hauptgründe dafür ist die meist späte Diagnostik der Erkrankung, welche bei Entdeckung häufig so weit fortgeschritten ist, dass jeder Therapieversuch zu spät kommt. Diese Situation erfordert dringend die Einführung von neuen diagnostischen Methoden zur Früherkennung der Invasiven Aspergillose.

Ein Ansatz in dieser Arbeit sollte sein, herauszufinden welche Makromoleküle von *A. fumigatus* sezerniert, und damit beim Patienten in den Blutkreislauf oder Urin gelangen. Anschließend sollte untersucht werden, ob diese Pilz-Makromoleküle auch unter Infektionsbedingungen im Menschen exprimiert werden und letztendlich im Serum detektierbar sind. Dazu wurde *A. fumigatus* in unterschiedlichen Medien kultiviert und sezernierte Proteine analysiert. Pilzproteine sind für die Diagnostik so wichtig, da sie als erregerspezifische Antigene mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Umgekehrt können diese Antigene auch im Patienten eine Antikörperantwort induzieren, die mittels Antigen nachgewiesen werden kann.

Von den elf sezernierten Proteinen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, wurden zwei Proteine näher charakterisiert: Die Protease Aspergillopepsin1 (PEP1) und das Toxin Hämolyisin (Hly). Gegen diese beiden Proteine wurden monoklonale Antikörper (mAK) generiert, wofür Hly zuerst rekombinant hergestellt werden musste. Mithilfe monoklonaler Antikörper wurden sowohl die Sekretionsbedingungen von PEP1 und Hly genauer charakterisiert als auch versucht, in Patientenserum diese zwei Proteine nachzuweisen. Leider konnte weder PEP1 noch Hly im Serum detektiert werden. Grund dafür könnte ein vorzeitig stattgefundenen Verdau durch serumeigene Proteasen sein, oder eine zu geringe Konzentration der beiden Proteine im Serum. Die Sensitivität dieses Test könnte verbessert werden, in dem diese monoklonalen Antikörper z.B. innerhalb eines Sandwich-ELISAS eingesetzt werden.

Neben Proteinen haben sich in der Vergangenheit auch Polysaccharide von *A. fumigatus* als geeignete diagnostische Marker einer invasiven Aspergillose erwiesen. Zwar haben sie

den Nachteil, als Zellwandbestandteil von Pilzen nicht *Aspergillus* spezifisch zu sein. Dagegen haben sie für den Nachweis im Serum andere Vorteile: Sie sind sehr stabile Moleküle (z.B. hitzebeständig) und werden in größeren Mengen von *A. fumigatus* produziert und freigesetzt, sodass sie bereits mit weniger sensitiven Methoden detektierbar sind.

In dieser Arbeit wurden nach Immunisierung zweier Mäuse mit *A. fumigatus*-Kulturüberstand u.a. zwei Antikörper gegen Galaktofuranose (Gal f) identifiziert. Galaktofuranose kommt nicht nur als Seitenkette des Galaktomannans, einem Hauptbaustein der *Aspergillus*-Zellwand, vor, sondern ist auch Bestandteil vieler sezernierter Pilz-Glykoproteine. Das Vorkommen sowohl als fester Bestandteil der Zellwand und gleichzeitig als in die Umgebung abgegebenes Molekül macht den Zuckerrest Galaktofuranose nicht nur zu einem brauchbaren Marker für histopathologische Untersuchungen sondern auch für die Serologie. Anhand einer Gal f -Deletionsmutante von *A. fumigatus* konnte die Spezifität zweier monoklonaler Antikörper (L-10-1 und L-99-13) gezeigt werden. Diese Antikörper wurden im Folgenden genutzt, um die Expressionsbedingungen von Galaktofuranose-Resten in *A. fumigatus* näher zu untersuchen. Es fiel auf, dass die Freisetzung von Zellwandbestandteilen mit Galaktofuranose-Resten stark von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig ist und erst mit Auskeimung der Sporen einsetzt. Des weiteren sollte mit Hilfe der beiden α -Gal f -Antikörper versucht werden in Patientenserum Galaktofuranose-Reste zudetektieren. Hierzu wurde ein Sandwich-ELISA aufgebaut, der in zwei Varianten jeweils einen der beiden α -Gal f -Antikörper als Fänger-Ak nutzte und den mAk L-10-1 (nach Konjugation mit Peroxidase) als Detektor-Ak. Es konnte gezeigt werden, dass dieser ELISA in Patientenseren sehr sensitiv Galaktofuranose-haltige Bestandteile nachweist und damit die Differentialdiagnostik einer invasiven Infektion durch *A. fumigatus* verbessern könnte.

Nach den in dieser Arbeit erhobenen Daten kann die Sensitivität gegenüber dem kommerziell verfügbaren ELISA vermutlich noch erhöht werden. Bezüglich der Spezifität konnten die Probleme mit Galaktofuranose-Reste enthaltenen Antibiotika (wie Augmentan®) jedoch nicht beseitigt werden. Die guten Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit dem L-10-1-ELISA erzielt wurden, führten dazu, dass dieser ELISA zur Zeit für den Einsatz in der Routinediagnostik am Max-von-Pettenkofer-Institut validiert wird.

Anhang

Name der Protease	Zahl der Vertreter
Aspartylprotease	6
Serinprotease	4
Disintegrin	2
Carboxypeptidase	15
Pitriysin	2
Dipeptidylpeptidase	2
Serinpeptidase	1
Aminopeptidase	1
Metallopeptidase	6
Metalloprotease	1
Aspergillopepsin	2
Aminopeptidase	3
Alkalische Serinprotease	2
Deuterolysin	2
Rhomboid-Familie	3

Tab. 7: Vorhersage der sekretierten Proteasen (nach Robson et al. 2005)

Literaturverzeichnis

- Addrizzo-Harris, D. J., T. J. Harkin, et al. (1997). "Pulmonary aspergilloma and AIDS. A comparison of HIV-infected and HIV-negative individuals." Chest **111**(3): 612-8.
- Arnou, P. M., M. Sadigh, et al. (1991). "Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of Aspergillus organisms." J Infect Dis **164**(5): 998-1002.
- Ascioglu, S., J. H. Rex, et al. (2002). "Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus." Clin Infect Dis **34**(1): 7-14.
- Bart-Delabesse, E., A. Marmorat-Khuong, et al. (1997). "Detection of Aspergillus DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by the polymerase chain reaction." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **16**(1): 24-5.
- Bates, D. W., L. Su, et al. (2001). "Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy." Clin Infect Dis **32**(5): 686-93.
- Bennett, J. E. (2005). Aspergillosen. Harrisons Innere Medizin. M. S. Dietel, N.; Zeitz, M. Berlin. **16**: 1277-1278.
- Bennett, J. E., A. K. Bhattacharjee, et al. (1985). "Galactofuranosyl groups are immunodominant in Aspergillus fumigatus galactomannan." Mol Immunol **22**(3): 251-4.
- Botterel, F., C. Farrugia, et al. (2008). "Real-time PCR on the first galactomannan-positive serum sample for diagnosing invasive aspergillosis in liver transplant recipients." Transpl Infect Dis **10**(5): 333-8.
- Brodoefel, H., H. Schimmel, et al. (2005). "[Invasive pulmonary aspergillosis]." Rofo **177**(9): 1191-5.
- Campbell, J. H., J. H. Winter, et al. (1991). "Treatment of pulmonary aspergilloma with itraconazole." Thorax **46**(11): 839-41.
- Carlile M., W. S., Graham G. (2001). The fungi. Norfolk, Elsevier.
- Chen, J. C., Y. L. Chang, et al. (1997). "Surgical treatment for pulmonary aspergilloma: a 28 year experience." Thorax **52**(9): 810-3.
- Cummings, J. R., G. R. Jamison, et al. (2007). "Cross-reactivity of non-Aspergillus fungal species in the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay." Diagn Microbiol Infect Dis **59**(1): 113-5.
- de Lederkremer, R. M. and W. Colli (1995). "Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids." Glycobiology **5**(6): 547-52.

- Fontaine, T., C. Simenel, et al. (2000). "Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall." J Biol Chem **275**(36): 27594-607.
- Gifford, A. H., J. R. Klippenstein, et al. (2002). "Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*." Infect Immun **70**(1): 19-26.
- Haynes, K. and T. R. Rogers (1994). "Retrospective evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**(8): 670-4.
- Haynes, K. A., J. P. Latge, et al. (1990). "Detection of *Aspergillus* antigens associated with invasive infection." J Clin Microbiol **28**(9): 2040-4.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, et al. (2002). "Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis." N Engl J Med **347**(6): 408-15.
- Hope, W. W., T. J. Walsh, et al. (2005). "Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis." Lancet Infect Dis **5**(10): 609-22.
- Hospenthal, D. R., K. J. Kwon-Chung, et al. (1998). "Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation." Med Mycol **36**(3): 165-8.
- Jaton-Ogay, K., S. Paris, et al. (1994). "Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*." Mol Microbiol **14**(5): 917-28.
- Johnson, L. B. and C. A. Kauffman (2003). "Voriconazole: a new triazole antifungal agent." Clin Infect Dis **36**(5): 630-7.
- Kolattukudy, P. E., J. D. Lee, et al. (1993). "Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis." Infect Immun **61**(6): 2357-68.
- Kothary, M. H., T. Chase, Jr., et al. (1984). "Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice." Infect Immun **43**(1): 320-5.
- Kudo, Y., T. Kumagai, et al. (1999). "Binding of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* to oxidized low density lipoprotein." Biol Pharm Bull **22**(5): 549-50.
- Kumagai, T., T. Nagata, et al. (1999). "Cytotoxic activity and cytokine gene induction of Asp-hemolysin to murine macrophages." Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi **40**(4): 217-22.
- Kumagai, T., T. Nagata, et al. (2001). "[Cytotoxic activity and cytokine gene induction of Asp-hemolysin to vascular endothelial cells]." Yakugaku Zasshi **121**(4): 271-5.
- Lamy, B., M. Moutaouakil, et al. (1991). "Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections." Mol Microbiol **5**(7): 1811-5.
- Latge, J. P. (1995). "Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*." Curr Top

- Med Mycol **6**: 245-81.
- Latge, J. P. (1999). "Aspergillus fumigatus and aspergillosis." Clin Microbiol Rev **12**(2): 310-50.
- Latge, J. P. (2008). "Galactofuranose containing molecules in Aspergillus fumigatus." Med Mycol: 1-6.
- Latge, J. P., J. P. Debeaupuis, et al. (1993). "Cell wall antigens in Aspergillus fumigatus." Arch Med Res **24**(3): 269-74.
- Latge, J. P., H. Kobayashi, et al. (1994). "Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of Aspergillus fumigatus." Infect Immun **62**(12): 5424-33.
- Latge, J. P., M. Moutaouakil, et al. (1991). "The 18-kilodalton antigen secreted by Aspergillus fumigatus." Infect Immun **59**(8): 2586-94.
- Latge, J. P., I. Mouyna, et al. (2005). "Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of Aspergillus fumigatus." Med Mycol **43** Suppl 1: S15-22.
- Lee, J. D. and P. E. Kolattukudy (1995). "Molecular cloning of the cDNA and gene for an elastinolytic aspartic proteinase from Aspergillus fumigatus and evidence of its secretion by the fungus during invasion of the host lung." Infect Immun **63**(10): 3796-803.
- Lehmann, P. F. and E. Reiss (1978). "Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits." Infect Immun **20**(2): 570-2.
- Maertens, J., J. Van Eldere, et al. (2002). "Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients." J Infect Dis **186**(9): 1297-306.
- Marr, K. A., S. A. Balajee, et al. (2004). "Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance." J Infect Dis **190**(3): 641-9.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, et al. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med **348**(16): 1546-54.
- Mattei, D., D. Rapezzi, et al. (2004). "False-positive Aspergillus galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment." J Clin Microbiol **42**(11): 5362-3.
- McCarthy, D. S. and J. Pepys (1973). "Pulmonary aspergilloma--clinical immunology." Clin Allergy **3**(1): 57-70.

- Mennink-Kersten, M. A., D. Ruegebrink, et al. (2005). "Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity." J Clin Microbiol **43**(8): 3925-31.
- Mennink-Kersten, M. A., D. Ruegebrink, et al. (2006). "In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis." J Clin Microbiol **44**(5): 1711-8.
- Miyazaki, T., S. Kohno, et al. (1995). "Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis." J Clin Microbiol **33**(12): 3115-8.
- Monod, M., S. Paris, et al. (1993). "Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*." Infect Immun **61**(10): 4099-104.
- Monod, M., S. Paris, et al. (1993). "Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*." FEMS Microbiol Lett **106**(1): 39-46.
- Morelle, W., M. Bernard, et al. (2005). "Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*." Eukaryot Cell **4**(7): 1308-16.
- Mroueh, S. and A. Spock (1994). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis." Chest **105**(1): 32-6.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe, et al. (2003). "Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." Microbiol Mol Biol Rev **67**(3): 400-28, table of contents.
- Nombela, C., C. Gil, et al. (2006). "Non-conventional protein secretion in yeast." Trends Microbiol **14**(1): 15-21.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, et al. (2009). "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*." Nature **457**(7228): 471-4.
- Paris, S., J. P. Debeauvais, et al. (2003). "Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1581-8.
- Pedersen, L. L. and S. J. Turco (2003). "Galactofuranose metabolism: a potential target for antimicrobial chemotherapy." Cell Mol Life Sci **60**(2): 259-66.
- Perfect, J. R., G. M. Cox, et al. (2001). "The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis." Clin Infect Dis **33**(11): 1824-33.
- Punt, P. J., B. Seiboth, et al. (2001). "Identification and characterization of a family of secretion-related small GTPase-encoding genes from the filamentous fungus *Aspergillus niger*: a putative SEC4 homologue is not essential for growth." Mol Microbiol **41**(2): 513-25.
- Raper, K., Fennell, D. (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore., The Williams & Wilkins

Company.

- Reichard, U., H. Eiffert, et al. (1994). "Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*." J Med Vet Mycol **32**(6): 427-36.
- Reichard, U., O. Jousson, et al. (2008). "[Secreted proteases from the mold *Aspergillus fumigatus*]." Mycoses **51 Suppl 3**: 30-2.
- Reichard, U., M. Monod, et al. (1997). "Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall." J Med Vet Mycol **35**(3): 189-96.
- Reichard, U., M. Monod, et al. (1995). "Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*." FEMS Microbiol Lett **130**(1): 69-74.
- Reiss, E. and P. F. Lehmann (1979). "Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis." Infect Immun **25**(1): 357-65.
- Rinaldi, M. G. (1983). "Invasive aspergillosis." Rev Infect Dis **5**(6): 1061-77.
- Robson, G. D., J. Huang, et al. (2005). "A preliminary analysis of the process of protein secretion and the diversity of putative secreted hydrolases encoded in *Aspergillus fumigatus*: insights from the genome." Med Mycol **43 Suppl 1**: S41-7.
- Ruchel, R., A. Dellmann, et al. (2004). "[Fungus detection--a simple method. Screening with optical brighteners]." Pathologe **25**(3): 235-7.
- Ruhnke, M., A. Bohme, et al. (2003). "Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)." Ann Hematol **82 Suppl 2**: S141-8.
- Sakaguchi, O., K. Yokota, et al. (1977). "[Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus*. VIII. Biological properties of Asp-hemolysin (author's transl)]." Nippon Saikingaku Zasshi **32**(6): 821-8.
- Schonheyder, H., T. Jensen, et al. (1988). "Clinical and serological survey of pulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis." Int Arch Allergy Appl Immunol **85**(4): 472-7.
- Schwartz, H. J. and P. A. Greenberger (1991). "The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk." J Lab Clin Med **117**(2): 138-42.
- Schwiebacher, M., M. Weig, et al. (2005). "Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions." Med Mycol **43**(7): 623-30.

- Siemann, M., M. Koch-Dorfler, et al. (1998). "False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay." Mycoses **41**(9-10): 373-7.
- Stynen, D., A. Goris, et al. (1995). "A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis." J Clin Microbiol **33**(2): 497-500.
- Tang, C. M., J. Cohen, et al. (1993). "The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis." Infect Immun **61**(5): 1650-6.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, et al. (1995). "Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall." Can J Microbiol **41**(8): 714-21.
- Tuon, F. F. (2007). "A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples." Rev Iberoam Micol **24**(2): 89-94.
- Viscoli, C., M. Machetti, et al. (2004). "False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam." Clin Infect Dis **38**(6): 913-6.
- von Eiff, M., N. Roos, et al. (1995). "Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival." Respiration **62**(6): 341-7.
- Walsh, T. J., E. J. Anaissie, et al. (2008). "Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **46**(3): 327-60.
- Weig, M., M. Frosch, et al. (2001). "Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases." J Clin Microbiol **39**(5): 1721-30.
- Yeo, S. F. and B. Wong (2002). "Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections." Clin Microbiol Rev **15**(3): 465-84.
- Yu, V. L., R. R. Muder, et al. (1986). "Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Results from a three-year prospective study." Am J Med **81**(2): 249-54.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Frank Ebel für seine umfangreiche Betreuung, seine Geduld und vor allem seine ständige Präsenz. Dadurch war er zu jeder Zeit eine große Hilfe bei der Bewältigung aller aufkommender Probleme.

Weiterhin möchte ich der AG Aspergillus für das überaus nette und entspannte Arbeitsumfeld und die große Hilfsbereitschaft danken. Ganz besonders Dr. Kathrin Luther, die mich von Beginn an bei meinen ersten Experimenten unterstützt hat und die ich immer mit jeglicher Art Fragen nerven durfte. Außerdem Danke sagen möchte ich Marzena Broniszewska, dem guten Geist des Labors, die das Geheimnis der Anwendung des Bestellcomputers beinahe als einzige verstand und außerdem meine Zellen so liebevoll gepflegt hat.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Haas (MvPI, LMU München) die mich mit Patientenseren versorgt hat.

Weiterhin danke ich der Pathologie der LMU in der Frauenlobstraße für die Bereitstellung zahlreicher histologischer Lungenpräparate.

Auch möchte ich ganz herzlich Frau Dr. Françoise Routier (MHH, Hannover) danken, dafür, dass sie die Galf-Mutante zu Verfügung gestellt hat.

Bei allen Computerfragen haben mir mein Bruder Justin Heesemann und Dr. Johannes Wagener geholfen – tausend Dank.

Nicht zu vergessen meinem Vater, dafür, dass er mich in seinem Institut geduldet und sich, außer gelegentliche ketzerische Fragen zu stellen, so wunderbar zurückgehalten hat. Danke!

Zuletzt Danke ich Dominik Büll für die motivierende und inspirierende gemeinsame Zeit des Schreibens in der tristen FH-Bibliothek und dem schönen Lenno.