

**Herstellung rekombinanter Proteine für die Entwicklung T-Zell-
basierter Diagnostikverfahren für den Nachweis von Erkrankungen,
die durch den pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*
ausgelöst werden**

von Elisabeth Schnack

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Herstellung rekombinanter Proteine für die Entwicklung T-Zell-
basierter Diagnostikverfahren für den Nachweis von Erkrankungen,
die durch den pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus*
ausgelöst werden**

von Elisabeth Schnack
aus Reutlingen

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. Frank Ebel

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Ebel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden bei folgender Konferenz als Poster
vorgestellt:

Lauruschkat CD, Page L, Schnack E, Einsele H, Ebel F, Loeffler J, Wurster S

**Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in
response to *Aspergillus fumigatus* antigens**

Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis, Lugano 27.02.-29.02.2020

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	39
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	45
1.	Taxonomie.....	45
2.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	46
3.	Lebenszyklus und Habitat.....	46
4.	Klinische Bedeutung.....	48
4.1	Bedeutung in der Humanmedizin.....	48
4.1.1	Die invasive Aspergillose.....	48
4.1.2	Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose.....	50
4.2	Bedeutung in der Veterinärmedizin.....	51
4.2.1	Die Aspergillose der Katzen.....	52
4.2.2	Die Aspergillose der Hunde.....	53
4.2.3	Die Aspergillose der Wiederkäuer.....	54
4.2.4	Die Aspergillose der Pferde.....	55
4.2.5	Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel.....	56
5.	Diagnostik und Therapie.....	57
5.1.	Diagnostische Methoden.....	57
5.1.1	Diagnose der ABPA.....	58
5.1.2	Diagnose der IA.....	59
5.2	Therapie.....	61
6.	Immunreaktionen.....	65
6.1	Allgemeines.....	65
6.2	Zytokine.....	65
6.3	Rezeptoren zur Erkennung von <i>A. fumigatus</i>	66
6.4	Ablauf von Immunreaktionen.....	67
6.5	T-Zell-Antwort auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene.....	72
6.6	T-Zellen und ihr Einsatz in der Therapie.....	74
6.7	Nachweismethoden über die Funktionalität immunkompetenter Zellen...75	
6.7.1	Prinzip des ELISpot Assays.....	76
6.7.2	Prinzip des Vollblut-ELISAs.....	77

7.	Ziel dieser Arbeit.....	77
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	79
1.	Allgemein.....	79
1.1.	Plasmide.....	79
1.2	Bakterienstämme.....	79
1.3	Oligonukleotide.....	79
1.4	Chemikalien.....	79
2.	Mikrobiologische Methoden.....	80
2.1	Medien.....	80
2.1.1	Medien für <i>E. coli</i>	80
2.1.2	Medien für <i>A. fumigatus</i>	80
2.2	Anzucht von <i>E. coli</i>	81
2.3	Anzucht und Ernte von <i>A. fumigatus</i>	82
3.	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	82
3.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>A. fumigatus</i>	82
3.2	Herstellung von cDNA.....	83
3.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	84
3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	85
3.5	Fusions-PCR.....	86
3.6	Agarosegelelektrophorese.....	87
3.7	Aufreinigung der DNA.....	87
3.8	Schneiden des gereinigten Gens.....	88
3.9	Ligation des Gens in einen Vektor.....	88
3.10	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	89
3.11	Überprüfung der Klone per PCR.....	89
3.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	89
3.13	Sequenzierung.....	90
3.14	Sequenzanalysen und Datenbanken.....	91
4.	Proteinchemische Methoden.....	91
4.1	Herstellung von Induktionskulturen.....	91
4.2	Eindimensionale SDS-PAGE.....	92
4.3	Western Blot.....	95
4.4	Aufschluss der Bakterien.....	98

4.5	Aufreinigung der Proteine.....	99
4.6	Reinigung der Proteine mit Hilfe der Endotoxinsäule.....	101
4.7	Dialyse der gereinigten Proteine.....	102
IV.	ERGEBNISSE.....	103
1.	Auswahl und Einteilung der Proteine.....	103
2.	Erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine.....	104
2.1.	Aspf1/Mitogillin (Afu5g02330).....	104
2.2	Aspf4 (Afu2g03830).....	109
2.3	Aspf13 (Afu2g12630).....	115
2.4	CsnB (Afu4g01290).....	119
2.5	Hämolysin/AspHS (Afu3g00590).....	124
2.6	FG-GAP (Afu1g04130).....	128
3.	Nicht erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine.....	133
3.1	Aspf5/Mep1 (Afu8g07080).....	133
3.2	Aspf7 (Afu4g06670).....	137
3.3	Aspf10/Pep1 (Afu5g1330).....	140
3.4	Aspergillopepsin (Afu7g01200).....	144
4.	Erfolgreich hergestellte Zellwandproteine.....	148
4.1	Aspf2 (Afu2g09580).....	148
4.2	Aspf9/Crf1 (Afu1g16190).....	152
4.3	Ecm33 (Afu4g06820).....	160
4.4	Gel1 (Afu2g01170).....	165
4.5	Cat1 (N-Terminus, Afu3g02270).....	171
5.	Nicht erfolgreich hergestellte Zellwandproteine.....	177
5.1	Aspf17/MP1 (Afu4g03240).....	177
5.2	CspA (Afu3g08990).....	181
6.	Erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine.....	185
6.1	Aspf3/Pmp20 (Afu6g02280).....	185
6.2	Aspf6/MnSOD (Afu1g14550).....	190
6.3	Aspf8 (Afu2g10100).....	194
6.4	Aspf11/cyp4 (Afu2g03720).....	199
6.5	Aspf22/Enolase (Afu6g06770).....	202
6.6	CipC (Afu5g09330).....	208

7.	Nicht erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine.....	212
7.1	Aspf12 (Afu5g04170).....	212
7.2	Smt1 (Afu4g09190).....	216
8.	Erfolgreich hergestellte Konidienproteine.....	220
8.1	Pst2 (Afu1g02820).....	220
8.2	CcpA (Afu1g13670).....	225
V.	DISKUSSION.....	229
1.	Auswahl <i>A. fumigatus</i>-spezifischer Antigene.....	229
1.1	Bekannte T-Zell-Antigene.....	230
1.2	Weitere Auswahlkriterien.....	236
1.3	Ausgewählte Antigene.....	237
2.	Herstellung rekombinanter Proteine.....	238
2.1	Anpassungen.....	238
2.1.1	Medien für die Gewinnung von cDNA.....	238
2.1.2	Transformation in <i>E. coli</i>	239
2.1.3	Bewertung verschiedener Aufschlussmethoden.....	240
2.1.4	Puffer.....	240
2.1.5	Proteinreinigung.....	241
2.1.6	Dialyse.....	241
2.1.7	LPS.....	242
2.1.7.1	Endotoxin-Reinigungssäulen.....	243
2.1.7.2	ClearColi TM -K12-Stamm.....	244
3.	Auswertung der bearbeiteten Antigene.....	244
4.	Erfolgreich hergestellte Proteine.....	246
4.1	Sekretierte Proteine.....	246
4.1.1	Aspf1/Mitogillin.....	246
4.1.2	Aspf4.....	246
4.1.3	Aspf13.....	247
4.1.4	CsnB.....	247
4.1.5	Hämolysin/AspHS.....	248
4.1.6	FG-GAP.....	248
4.2	Zellwandproteine.....	249
4.2.1	Aspf2.....	249
4.2.2	Aspf9/Crf1.....	249

4.2.3	Ecm33.....	251
4.2.4	Gel1.....	252
4.2.5	Cat1 (N-Terminus).....	252
4.3	Cytosolische Proteine.....	253
4.3.1	Aspf3.....	253
4.3.2	Aspf6.....	253
4.3.3	Aspf8.....	254
4.3.4	Aspf11.....	254
4.3.5	Aspf22/Enolase.....	255
4.3.6	CipC.....	255
4.4	Konidienproteine.....	256
4.4.1	Pst2.....	256
4.4.2	CcpA.....	256
5.	Nicht erfolgreich hergestellte Proteine.....	257
5.1	Sekretierte Proteine.....	257
5.1.1	Aspf5/Mep1.....	257
5.1.2	Aspf7.....	258
5.1.3	Aspf10.....	258
5.1.4	Aspergillopepsin.....	259
5.2	Zellwandproteine.....	260
5.2.1	Aspf17.....	260
5.2.2	CspA.....	260
5.3	Cytosolische Proteine.....	261
5.3.1	Aspf12.....	261
5.3.2	Smt1.....	261
6.	Konklusion und Ausblick.....	262
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	265
VII.	SUMMARY	267
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	269
IX.	DANKSAGUNG	297

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABPA	allergisch bronchopulmonale Aspergillose
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimal-Medium
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbend assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immuno-spot</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-disease</i>
H ₂ O _{dest.}	demineralisiertes Wasser
IA	Invasive Aspergillose
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton

LB	Luria Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
mDC	<i>myeloid dendritic cell</i>
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
OD	Optische Dichte
PAMPs	<i>pathogen-associated moleculare patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
<i>spp.</i>	mehrere Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht von durch <i>A. fumigatus</i> verursachten Erkrankungen beim Menschen.....	41
Abbildung 2: A: Morphologie von <i>A. fumigatus</i>	47
B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors.....	47
Abbildung 3: Lebenszyklus von <i>A. fumigatus</i>	48
Abbildung 4: Analyse der Sequenz des <i>Aspf1</i> -Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	105
Abbildung 5: Genomische Sequenz des <i>Aspf1</i> -Gens	106
Abbildung 6: Amplifikat der PCR von <i>Aspf1</i>	106
Abbildung 7: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen <i>Aspf1</i> Klonen im Agarosegel.....	106
Abbildung 8: Coomassie-Gel der <i>Aspf1</i> Klone.....	107
Abbildung 9: Gegenüberstellung der <i>Aspf1</i> -Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	108
Abbildung 10: Coomassie-Gel und Western Blot von <i>Aspf1</i>	108
Abbildung 11: Talonreinigung von <i>Aspf1</i>	108
Abbildung 12: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von <i>Aspf1</i>	108
Abbildung 13: Dialyse von <i>Aspf1</i>	109
Abbildung 14: Analyse der Sequenz des <i>Aspf4</i> -Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	110
Abbildung 15: Genomische Sequenz des <i>Aspf4</i> -Gens	111
Abbildung 16: Amplifikat der PCR von <i>Aspf4</i>	111
Abbildung 17: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation	

	entstandenen Aspf4 Klonen im Agarosegel.....	111
Abbildung 18 A:	Coomassie-Gel der Aspf4-Klone.....	112
Abbildung 18 B:	Gegenüberstellung der Aspf4-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	113
Abbildung 19:	Coomassie-Gel und Western Blot von Aspf4.....	113
Abbildung 20:	Talonreinigung von Aspf4.....	114
Abbildung 21:	Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf4.....	114
Abbildung 22:	Dialyse von Aspf4.....	114
Abbildung 23:	Analyse der Sequenz des Aspf13-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	116
Abbildung 24:	Genomische Sequenz des Aspf13-Gens.....	116
Abbildung 25:	Amplifikat der PCR von Aspf13.....	117
Abbildung 26:	Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf13 Klonen im Agarosegel.....	117
Abbildung 27:	Coomassie-Gel der Aspf13 Klone.....	117
Abbildung 28:	Gegenüberstellung der Aspf13-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	118
Abbildung 29:	Talonreinigung von Aspf13.....	118
Abbildung 30:	Dialyse von Aspf13.....	118
Abbildung 31:	Analyse der Sequenz des CsnB-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	120
Abbildung 32:	Genomische Sequenz des CsnB-Gens	120
Abbildung 33:	Amplifikat der PCR von CsnB.....	121
Abbildung 34:	Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CsnB Klonen im Agarosegel.....	121

Abbildung 35: Coomassie-Gel der CsnB Klone.....	121
Abbildung 36: Gegenüberstellung der CsnB-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	122
Abbildung 37: Coomassie-Gel und Western Blot von CsnB.....	122
Abbildung 38: Talonreinigung von CsnB.....	123
Abbildung 39: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von CsnB.....	123
Abbildung 40: Dialyse von CsnB.....	123
Abbildung 41: Analyse der Sequenz des Hly-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	124
Abbildung 42: Genomische Sequenz des Hly-Gens	125
Abbildung 43: Amplifikat der PCR von Hly.....	125
Abbildung 44: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Hly Klonen im Agarosegel.....	125
Abbildung 45: Coomassie-Gel der Hly Klone.....	125
Abbildung 46: Gegenüberstellung der Hly-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	126
Abbildung 47: Coomassie-Gel und Western Blot von Hly.....	127
Abbildung 48: Talonreinigung von Hly.....	127
Abbildung 49: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Hly.....	127
Abbildung 50: Dialyse von Hly.....	127
Abbildung 51: Analyse der Sequenz des FG-GAP-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	129
Abbildung 52: Genomische Sequenz des FG-GAP-Gens	130
Abbildung 53: Amplifikat der PCR von FG-GAP.....	130

Abbildung 54: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen FG-GAP Klonen im Agarosegel.....	130
Abbildung 55: Gegenüberstellung der FG-GAP-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	131
Abbildung 56: Talonreinigung von FG-GAP.....	132
Abbildung 57: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von FG-GAP.....	132
Abbildung 58: Dialyse von FG-GAP.....	132
Abbildung 59: Analyse der Sequenz des Aspf5-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	134
Abbildung 60: Genomische Sequenz des Aspf5-Gens	135
Abbildung 61: Amplifikat der PCR von Aspf5.....	136
Abbildung 62: Proteinsequenz von Aspf5.....	137
Abbildung 63: Analyse der Sequenz des Aspf7-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	138
Abbildung 64: Genomische Sequenz des Aspf7-Gens.....	138
Abbildung 65: Amplifikat der PCR von Aspf7.....	139
Abbildung 66: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf7 Klonen im Agarosegel.....	139
Abbildung 67: Coomassie-Gel der Aspf7 Klone.....	139
Abbildung 68: Gegenüberstellung der Aspf7-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	140
Abbildung 69: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation in den Rosetta- <i>E. coli</i> -Stamm entstandenen Aspf7 Klonen im Agarosegel.....	140
Abbildung 70: Coomassie-Gel der Aspf7 Klone (Rosetta).....	140
Abbildung 71: Analyse der Sequenz des Aspf10-Gens mit der <i>codon usage</i> von	

<i>E. coli</i>	142
Abbildung 72: Genomische Sequenz des Aspf10-Gens	143
Abbildung 73: Amplifikat der PCR von Aspf10.....	143
Abbildung 74: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf10 Klonen im Agarosegel.....	143
Abbildung 75: Proteinsequenz von Aspf10.....	144
Abbildung 76: Analyse der Sequenz des Aspergillopepsin-Gens mit der <i>codon</i> <i>usage</i> von <i>E. coli</i>	145
Abbildung 77: Genomische Sequenz des Aspergillopepsin-Gens	146
Abbildung 78: Amplifikat der PCR von Aspergillopepsin.....	146
Abbildung 79: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation in <i>E. coli</i> (M15) entstandenen Aspergillopepsin Klonen im Agarosegel.....	146
Abbildung 80: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation in <i>E. coli</i> (Rosetta) entstandenen Aspergillopepsin Klonen im Agarosegel.....	146
Abbildung 81: Coomassie-Gel der Aspergillopepsin Klone.....	147
Abbildung 82: Gegenüberstellung der Aspergillopepsin-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz...147	147
Abbildung 83: Analyse der Sequenz des Aspf2-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	149
Abbildung 84: Genomische Sequenz des Aspf2-Gens	150
Abbildung 85: Amplifikat der PCR von Aspf2.....	150
Abbildung 86: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation	

	entstandenen Aspf2 Klonen im Agarosegel.....	150
Abbildung 87:	Gegenüberstellung der Aspf2-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	151
Abbildung 88:	Talonreinigung von Aspf2.....	152
Abbildung 89:	Analyse der Sequenz des Aspf9-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	154
Abbildung 90:	Genomische Sequenz des Aspf9-Gens	155
Abbildung 91:	Amplifikat der PCR von Aspf9.....	155
Abbildung 92:	Fusionsprodukt von Aspf9.....	155
Abbildung 93:	Coomassie-Gel der Aspf9-Klone.....	156
Abbildung 94:	Talonreinigung von Aspf9.....	156
Abbildung 95:	Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf9.....	156
Abbildung 96:	Gegenüberstellung der Aspf9-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	157
Abbildung 97:	Dialyse von Aspf9.....	158
Abbildung 98:	Amplifikat der PCR von Aspf9 (cDNA).....	159
Abbildung 99:	Coomassie-Gel der Aspf9 Klone (cDNA).....	159
Abbildung 100:	Gegenüberstellung der Aspf9-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	160
Abbildung 101:	Analyse der Sequenz des Ecm33-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	162
Abbildung 102:	Genomische Sequenz des Ecm33-Gens	163
Abbildung 103:	Amplifikat der PCR von Ecm33.....	164
Abbildung 104:	Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Ecm33 Klonen im Agarosegel.....	164

Abbildung 105: Coomassie-Gel der Ecm33 Klone.....	164
Abbildung 106: Gegenüberstellung der Ecm33-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	165
Abbildung 107: Analyse der Sequenz des Gell1-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	167
Abbildung 108: Genomische Sequenz des Gell1-Gens	167
Abbildung 109: Amplifikat der PCR von Gell1.....	168
Abbildung 110: Fusionsprodukt von Gell1.....	168
Abbildung 111: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Gell1 Klonen im Agarosegel.....	168
Abbildung 112: Coomassie-Gel des Gell1 Klons.....	168
Abbildung 113: Gegenüberstellung der Gell1-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	169
Abbildung 114: Talonreinigung von Gell1.....	170
Abbildung 115: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Gell1.....	170
Abbildung 116: Dialyse von Gell1.....	170
Abbildung 117: Analyse der Sequenz des Cat1-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	172
Abbildung 118: Genomische Sequenz des Cat1-Gens	173
Abbildung 119: Amplifikat der PCR von Cat1.....	174
Abbildung 120: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Cat1 Klonen im Agarosegel.....	174
Abbildung 121: Gegenüberstellung der Cat1-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	175

Abbildung 122: Coomassie-Gel und Western Blot von Cat1.....	176
Abbildung 123: Talonreinigung von Cat1 (Waschfraktionen).....	176
Abbildung 124: Talonreinigung von Cat1 (Elutionen).....	176
Abbildung 125: Dialyse von Cat1.....	176
Abbildung 126: Analyse der Sequenz des Aspf17-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	178
Abbildung 127: Genomische Sequenz des Aspf17/MP1-Gens	179
Abbildung 128: Amplifikat der PCR von Aspf17/MP1.....	179
Abbildung 129: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf17 Klonen im Agarosegel.....	179
Abbildung 130: Coomassie-Gel der Aspf17 Klone (M15).....	180
Abbildung 131: Gegenüberstellung der Aspf17-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	180
Abbildung 132: Analyse der Sequenz des CspA-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	182
Abbildung 133: Genomische Sequenz des CspA-Gens	183
Abbildung 134: Amplifikat der PCR von CspA.....	183
Abbildung 135: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation (M15) entstandenen CspA Klonen im Agarosegel.....	183
Abbildung 136: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation (Rosetta) entstandenen CspA Klonen im Agarosegel.....	184
Abbildung 137: Coomassie-Gel der CspA Klone.....	184
Abbildung 138: Gegenüberstellung der CspA-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	184
Abbildung 139: Analyse der Sequenz des Aspf3-Gens mit der <i>codon usage</i> von	

<i>E. coli</i>	186
Abbildung 140: Genomische Sequenz des Aspf3-Gens	187
Abbildung 141: Amplifikat der PCR von Aspf3.....	187
Abbildung 142: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf3 Klonen im Agarosegel.....	187
Abbildung 143: Coomassie-Gel der Aspf3 Klone.....	188
Abbildung 144: Gegenüberstellung der Aspf3-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	188
Abbildung 145: Talonreinigung von Aspf3.....	189
Abbildung 146: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf3.....	189
Abbildung 147: Dialyse von Aspf3.....	189
Abbildung 148: Analyse der Sequenz des Aspf6-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	191
Abbildung 149: Genomische Sequenz des Aspf6-Gens	191
Abbildung 150: Amplifikat der PCR von Aspf6.....	192
Abbildung 151: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf6 Klonen im Agarosegel.....	192
Abbildung 152: Coomassie-Gel der Aspf6 Klone.....	192
Abbildung 153: Gegenüberstellung der Aspf6-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	193
Abbildung 154: Talonreinigung von Aspf6.....	193
Abbildung 155: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf6.....	193
Abbildung 156: Dialyse von Aspf6.....	194
Abbildung 157: Reinigung von Aspf6 über die Endotoxinsäule.....	194

Abbildung 158: Analyse der Sequenz des Aspf8-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	195
Abbildung 159: Genomische Sequenz des Aspf8-Gens	196
Abbildung 160: Amplifikat der PCR von Aspf8.....	196
Abbildung 161: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf8 Klonen im Agarosegel.....	196
Abbildung 162: Coomassie-Gel der Aspf8 Klone.....	197
Abbildung 163: Western Blot der Aspf8 Klone.....	197
Abbildung 164: Gegenüberstellung der Aspf8-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	197
Abbildung 165: Talonreinigung von Aspf8 (Waschfraktionen).....	198
Abbildung 166: Talonreinigung von Aspf8 (Elutionen).....	198
Abbildung 167: Dialyse von Aspf8.....	198
Abbildung 168: Analyse der Sequenz des Aspf8-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	200
Abbildung 169: Genomische Sequenz des Aspf11-Gens	201
Abbildung 170: Amplifikat der PCR von Aspf11.....	201
Abbildung 171: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf11 Klonen im Agarosegel.....	201
Abbildung 172 A: Coomassie-Gel der Aspf11 Klone (Rosetta).....	202
Abbildung 172 B: Gegenüberstellung der Aspf11-Proteinsequenz aus der Daten- bank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	202
Abbildung 173: Analyse der Sequenz des Enolase-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	204
Abbildung 174: Genomische Sequenz des Enolase-Gens	205

Abbildung 175: Amplifikat der PCR der Enolase.....	205
Abbildung 176: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Enolase Klonen im Agarosegel.....	205
Abbildung 177: Gegenüberstellung der Enolase-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	206
Abbildung 178: Talonreinigung der Enolase.....	207
Abbildung 179: Zweiter Durchgang Talonreinigung der Enolase.....	207
Abbildung 180: Dialyse der Enolase.....	207
Abbildung 181: Analyse der Sequenz des CipC-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	209
Abbildung 182: Genomische Sequenz des CipC-Gens.....	209
Abbildung 183: Amplifikat der PCR von CipC.....	210
Abbildung 184: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CipC Klonen im Agarosegel.....	210
Abbildung 185: Coomassie-Gel des CipC Klons.....	210
Abbildung 186: Gegenüberstellung der CipC-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	211
Abbildung 187: Coomassie-Gel und Western Blot von CipC.....	211
Abbildung 188: Talonreinigung von CipC (Elutionen).....	211
Abbildung 189: Talonreinigung von CipC (Waschfraktionen).....	211
Abbildung 190: Dialyse von CipC.....	212
Abbildung 191: Dialyse von CipC (resuspendiertes Pellet).....	212
Abbildung 192: Analyse der Sequenz des Asp12-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	214

Abbildung 193: Genomische Sequenz des Asp12-Gens	215
Abbildung 194: Amplifikat der PCR von Asp12.....	215
Abbildung 195: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Asp12 Klonen im Agarosegel.....	215
Abbildung 196: Proteinsequenz von Asp12.....	216
Abbildung 197: Analyse der Sequenz des Smt1-Gens mit der <i>codon usage</i>	218
Abbildung 198: Genomische Sequenz des Smt1-Gens	219
Abbildung 199: Amplifikat der PCR von Smt1.....	219
Abbildung 200: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Smt1 Klonen im Agarosegel.....	219
Abbildung 201: Coomassie-Gel der Smt1 Klone (M15).....	219
Abbildung 202: Gegenüberstellung der Smt1-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	220
Abbildung 203: Analyse der Sequenz des Pst2-Gens mit der <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	222
Abbildung 204: Genomische Sequenz des Pst2-Gens	222
Abbildung 205: Amplifikat der PCR von Pst2.....	223
Abbildung 206: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Pst2 Klonen im Agarosegel.....	223
Abbildung 207: Gegenüberstellung der Pst2-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	224
Abbildung 208: Talonreinigung von Pst2.....	224
Abbildung 209: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Pst2.....	224
Abbildung 210: Dialyse von Pst2.....	224
Abbildung 211: Analyse der Sequenz des CcpA-Gens mit der <i>codon usage</i> von	

<i>E. coli</i>	226
Abbildung 212: Genomische Sequenz des CcpA-Gens	226
Abbildung 213: Amplifikat der PCR von CcpA.....	227
Abbildung 214: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CcpA Klonen im Agarosegel.....	227
Abbildung 215: Coomassie-Gel der CcpA Klone.....	227
Abbildung 216: Gegenüberstellung der CcpA-Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz.....	227

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von <i>A. fumigatus</i> (DE HOOG et al., 2000).....	46
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.....	79
Tabelle 3: Inhaltsstoffe des Trenngels.....	94
Tabelle 4: Inhaltsstoffe des Sammelgels.....	94
Tabelle 5: Übersicht aller geplanten Antigene.....	104
Tabelle 6: Liste aller erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine.....	104
Tabelle 7: Informationen zu Aspf1.....	104
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf1-Konstrukt.....	105
Tabelle 9: Informationen zu Aspf4.....	109
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf4-Konstrukt.....	110
Tabelle 11: Informationen zu Aspf13.....	115
Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf13-Konstrukt.....	115
Tabelle 13: Informationen zu CsnB.....	119
Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide für das CsnB-Konstrukt.....	119
Tabelle 15: Informationen zu Hly.....	124
Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für das Hly-Konstrukt.....	124
Tabelle 17: Informationen zu FG-GAP.....	128
Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide für das FG-GAP-Konstrukt.....	128
Tabelle 19: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine.....	133
Tabelle 20: Informationen zu Aspf5.....	133
Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf5-Konstrukt.....	134
Tabelle 22: Informationen zu Aspf7.....	137

Tabelle 23: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf7-Konstrukt.....	137
Tabelle 24: Informationen zu Aspf10.....	140
Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf10-Konstrukt.....	141
Tabelle 26: Informationen zu Aspergillopepsin.....	144
Tabelle 27: Verwendete Oligonukleotide für das Aspergillopepsin-Konstrukt.....	145
Tabelle 28: Liste aller erfolgreich hergestellten Zellwandproteine.....	148
Tabelle 29: Informationen zu Aspf2.....	148
Tabelle 30: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf2-Konstrukt.....	149
Tabelle 31: Informationen zu Aspf9.....	152
Tabelle 32: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf9-Konstrukt.....	154
Tabelle 33: Informationen zu Ecm33.....	160
Tabelle 34: Verwendete Oligonukleotide für das Ecm33-Konstrukt.....	161
Tabelle 35: Informationen zu Gel1.....	165
Tabelle 36: Verwendete Oligonukleotide für das Gel1-Konstrukt.....	166
Tabelle 37: Informationen zu Cat1.....	171
Tabelle 38: Verwendete Oligonukleotide für das Cat1-Konstrukt.....	171
Tabelle 39: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten Zellwandproteine.....	177
Tabelle 40: Informationen zu Aspf17.....	177
Tabelle 41: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf17-Konstrukt.....	178
Tabelle 42: Informationen zu CspA.....	181
Tabelle 43: Verwendete Oligonukleotide für das CspA-Konstrukt.....	181
Tabelle 44: Liste aller erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine.....	185
Tabelle 45: Informationen zu Aspf3.....	185
Tabelle 46: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf3-Konstrukt.....	186
Tabelle 47: Informationen zu Aspf6.....	190

Tabelle 48: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf6-Konstrukt.....	190
Tabelle 49: Informationen zu Aspf8.....	194
Tabelle 50: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf8-Konstrukt.....	195
Tabelle 51: Informationen zu Aspf11.....	199
Tabelle 52: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf11-Konstrukt.....	200
Tabelle 53: Informationen zur Enolase.....	202
Tabelle 54: Verwendete Oligonukleotide für das Enolase-Konstrukt.....	203
Tabelle 55: Informationen zu CipC.....	208
Tabelle 56: Verwendete Oligonukleotide für das CipC-Konstrukt.....	208
Tabelle 57: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine.....	212
Tabelle 58: Informationen zu Aspf12.....	212
Tabelle 59: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf12-Konstrukt.....	213
Tabelle 60: Informationen zu Smt1.....	216
Tabelle 61: Verwendete Oligonukleotide für das Smt1-Konstrukt.....	217
Tabelle 62: Liste aller erfolgreich hergestellten Konidienproteine.....	220
Tabelle 63: Informationen zu Pst2.....	220
Tabelle 64: Verwendete Oligonukleotide für das Pst2-Konstrukt.....	221
Tabelle 65: Informationen zu CcpA.....	225
Tabelle 66: Verwendete Oligonukleotide für das CcpA-Konstrukt.....	225
Tabelle 67: Übersicht aller geplanten Antigene.....	237
Tabelle 68: Übersicht aller erfolgreich und nicht erfolgreich hergestellten Antigene.....	245
Tabelle 69: Übersicht aller erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine.....	246
Tabelle 70: Übersicht aller erfolgreich hergestellten Zellwandproteine.....	249

Tabelle 71: Übersicht aller erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine.....	253
Tabelle 72: Übersicht aller erfolgreich hergestellten Konidienproteine.....	256
Tabelle 73: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine.....	257
Tabelle 74: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten Zellwandproteine.....	260
Tabelle 75: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine...	261

I. EINLEITUNG

Der Großteil der Schimmelpilze lebt für den Menschen unauffällig in ökologischen Nischen und ernährt sich saprophytär von verrottendem pflanzlichen Material (LATGÉ, 1999). Das Spektrum ihrer Aktivitäten umfasst ein breites Feld, so können sie sowohl als Lebensmittelveredler, als auch als Lebensmittelverderber agieren, Quelle für Antibiotika oder Cholesterinsenker sein, aber auch Infektionen, sowohl beim Menschen als auch beim Tier, hervorrufen. Durch Schimmelpilze verursachte Erkrankungen sind meist opportunistische Infektionen, das bedeutet, dass ein gesundes Individuum in der Regel nicht durch den Kontakt mit dem infektiösen Agens erkrankt. Dennoch können Schimmelpilze, ebenso wie Bakterien und Viren, teils schwere Erkrankungen hervorrufen und daher besteht noch weiterer Forschungsbedarf, vor allem in der Entwicklung zuverlässiger und frühzeitiger Diagnostik, aber auch verbesserter Therapie.

Pilze zählen zu den Eukaryonten, daher ähnelt ihr Zellaufbau eher Säugetierzellen, als den Zellen anderer Mikroorganismen. So verfügen sie über eine Zellwand, die sich vor allem aus Chitin und β -1,3-D-Glucan zusammensetzt, einen echten Zellkern in dem sich das Erbgut befindet und verschiedene Organellen wie den Golgi-Apparat oder die Mitochondrien (GROß, 2013). Weltweit gibt es circa 1,5 Millionen verschiedener Pilzarten, die nahezu im gesamten Lebensraum zu finden sind und sich an ganz unterschiedliche Bedingungen angepasst haben (HAWKSWORTH, 2001). Nur wenige von ihnen gelten als pathogen. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Gruppe zählen *Aspergillus fumigatus* und Hefen wie *Candida* spp. oder *Cryptococcus* spp.. *A. fumigatus* spielt sowohl beim Menschen als auch bei den Tieren eine Rolle als Auslöser unterschiedlicher Krankheiten (ENOCH et al., 2006). Maßgeblich an der Entstehung und dem Krankheitsverlauf beteiligt ist das Immunsystem. Beim Menschen kann es zu Überempfindlichkeitsreaktionen wie allergischem Asthma oder allergisch-bronchopulmonaler Aspergillose kommen, andererseits kommen schwere Infektionen, wie die der invasiven Aspergillose, vor allem bei immunsupprimierten Menschen vor. Die Gefahr an einer invasiven Aspergillose zu erkranken besteht vor allem für Patienten nach einer Stammzell- oder

Organtransplantation, bei schwerer Neutropenie, sowie bei chronisch granulomatösen Erkrankungen, systemischer Steroidtherapie oder fortgeschrittenen Stadien von AIDS (STRASSBURG et al., 2010; KARTHAUS & BUCHHEIDT, 2013). Prognosen zufolge soll die Anzahl an Stammzelltransplantationen weiter steigen und somit steigt auch die Größe der Risikogruppe (PASSWEG et al., 2016). Besonders problematisch ist die Tatsache, dass es aufgrund der unspezifischen Symptome oft erst zu einer gesicherten Diagnose kommt, wenn die Krankheit bereits weit fortgeschritten ist und der Behandlungserfolg deswegen oftmals nicht eintritt. Gerade die systemischen Aspergillosen haben eine hohe Letalität und stellen die häufigste tödlich verlaufende Infektion nach Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation dar (SUN et al., 2012). Hinzu kommt die aktuelle Entwicklung von Resistenzen gegen Antimykotika, die die Heilungschancen selbst bei frühzeitigem Therapiebeginn deutlich schmälern. Es gibt verschiedene Ursachen und Mechanismen für Resistenzen pathogener Pilze gegen pharmakologische Wirkstoffe. Zum einen können sie primär-intrinsisch bedingt sein, so sprechen beispielsweise bis zu 30 % aller Aspergillus-Stämme unzureichend auf Amphotericin B an (BUCHHEIDT et al., 2014). Zum anderen können sich Resistenzen auch sekundär entwickeln, hierfür können verschiedene Gründe verantwortlich sein wie Selektionsprozesse, molekulare Mechanismen oder unterschiedliche Genexpressionsmuster (DIAZ-GUERRA et al., 2003). Veränderungen der zellulären Aufnahme des Antimykotikums oder dessen Metabolisierung innerhalb der Zelle, Veränderungen von Enzymen des Pilzes oder eine verstärkte Expression von Transportproteinen, die therapeutisch wirksame Substanzen aktiv aus der Zelle transportieren gehören hierzu (BUCHHEIDT et al., 2014). Zu den Ursachen der Resistenzentwicklung gegen Triazol-Antimykotika bei *A. fumigatus* zählt vor allem der zunehmende Einsatz von Azolen zum Ernteschutz in der Landwirtschaft, sie können aber auch im infizierten Wirt durch längerfristige oder wiederholte Therapien mit einem Triazol-Antimykotikum entstehen, was jedoch seltener der Fall ist (CAMPS et al., 2012; VAN DER LINDEN et al., 2013). Aufgrund dieser Tatsachen besteht ein großer Bedarf bei der Entwicklung neuer Antimykotika, die Forschung schreitet allerdings, verglichen mit Bakterien und Viren, langsamer voran (BROWN et al., 2012).

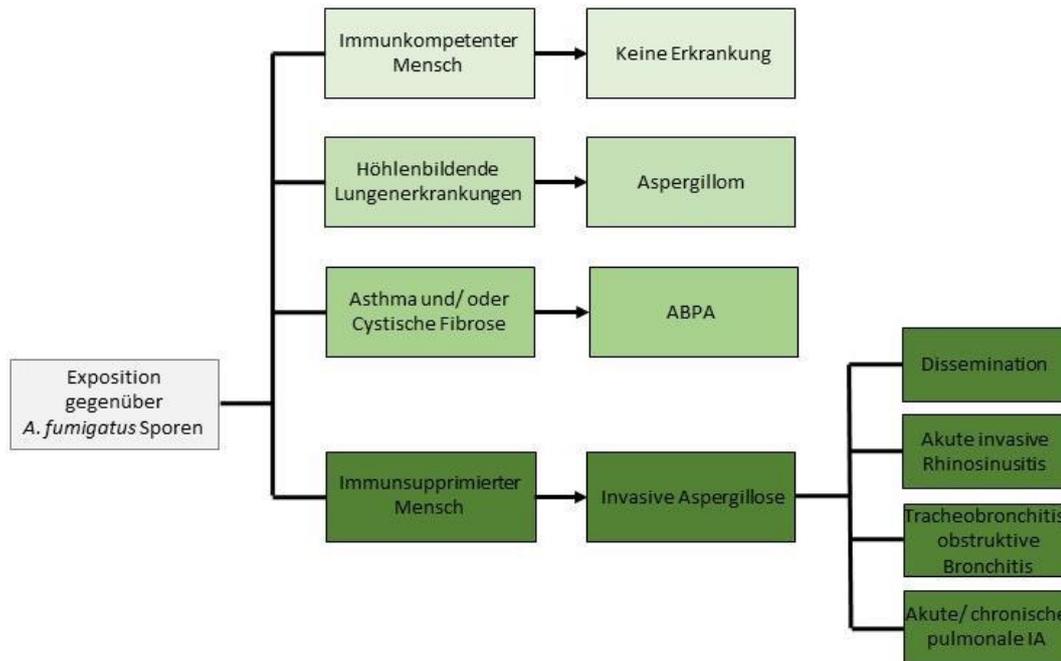


Abbildung 1: Übersicht von durch *A. fumigatus* verursachten Erkrankungen beim Menschen (BECK, 2014)

In der Veterinärmedizin kommen ebenfalls *Aspergillus*-assoziierte Erkrankungen vor, die sich tierartlich unterschiedlich darstellen. Auch hier kommt es vor allem durch prädisponierende Faktoren, wie schlechter Immunitätslage des Wirts oder ungünstigen Haltungsbedingungen, zu Erkrankungen. Die Infektion fängt dabei meistens in der Lunge an, breitet sich von dort aus und kann zu einer generalisierten Infektion führen. Das Prädilektionsgewebe ist dabei tierartlich unterschiedlich (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Als Einzeltiererkrankung tritt sie beim Pferd in Form von Luftsackmykosen auf, die jedoch auch durch *Penicillium* spp. oder Mucorales hervorgerufen werden können (COOK et al., 1968). Luftsackmykosen können auch bei Geflügel, Wildvögeln, sowie in Gefangenschaft gehaltenen Papageien und Pinguinen auftreten. Vor allem nach hoher Sporenbelastung kommt es zu vermehrten Erkrankungen mit Mortalitätsraten von bis zu 90 % (ARNÉ et al., 2011; SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Bei Hunden gilt *A. fumigatus* als dritthäufigste Ursache von chronischem Nasenausfluss und tritt meist in Form sinonasaler Infektionen auf (MELER et al., 2008; SCHULTZ et al., 2008). Rinder hingegen zeigen ein anderes Krankheitsbild, hier werden *A. fumigatus*-Infektionen in Zusammenhang mit Mastitiden, Aborten oder Pneumonien gebracht. Es wird vermutet, dass *A.*

fumigatus auch als Auslöser des *Haemorrhagic Bowel Syndrome* in Frage kommt. Die Aufnahme erfolgt meist oral über kontaminiertes Futter (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die Therapie gestaltet sich in der Tiermedizin ebenso schwierig wie in der Humanmedizin. Anfangs oft unspezifische und milde bis fehlende Symptome führen dazu, dass Erkrankungen erst spät diagnostiziert werden, was die Heilungschancen negativ beeinträchtigt. Auch hier steht nur eine sehr begrenzte Anzahl an Medikamenten zur Verfügung, die mit derselben Problematik, wie sie in der Humanmedizin auftritt, belastet sind. Hinzu kommt, dass die Behandlung oftmals langwierig und teuer ist (ZHANG et al., 2012).

Eine Diagnose setzt sich in der Regel aus unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zusammen. Berücksichtigt werden hierbei sowohl die klinischen Symptome, bildgebende Verfahren wie die Computertomographie, der serologische Nachweis von Pilzbestandteilen, die Histologie und der kulturelle Erregernachweis (OREN & GOLDSTEIN, 2002; OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Von großer Bedeutung ist die Kenntnis immunologischer Vorgänge. Aus diesem Wissen entsteht die Möglichkeit neue diagnostische Methoden oder Therapieoptionen zu entwickeln.

Bei der Auseinandersetzung mit *A. fumigatus* sind sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beteiligt. Die erste Bekämpfung aufgenommener Sporen wird dabei durch Makrophagen und Neutrophile vollzogen, Hyphen können von Neutrophilen und natürlichen Killerzellen lysiert und damit unschädlich gemacht werden (CENCI et al., 1998). Als Vermittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dienen Dendritische Zellen. Diese können, zusammen mit dem vorherrschendem Zytokinprofil, die nachfolgende Lymphozytenreaktion beeinflussen (THÉRY & AMIGORENA, 2001).

T-Lymphozyten nehmen bei der Immunität oder aber der Entwicklung einer Erkrankung eine herausragende Rolle ein. Dabei von Bedeutung ist vor allem die Art der T-Zell-Antwort (HEBART et al., 2002). So sind T_H1 -Antworten mit einem protektiven Schutz gegen eine invasive Erkrankung assoziiert, sie werden über IL-12 induziert und bewirken über die Ausschüttung von $IFN-\gamma$ eine vermehrte Aktivität von Zellen des angeborenen Immunsystems, die die Infektion

weiter bekämpfen. Kommt es jedoch zu einer über IL-4 induzierten T_H2-Antwort, nimmt die Erkrankung einen invasiven oder allergischen Verlauf ein (ROMANI & PUC CETTI, 2007; ROMANI, 2011).

Studien konnten zeigen, dass verschiedene fungale Komponenten unterschiedliche und vor allem unterschiedlich starke T-Zell-Antworten hervorrufen können. Dabei scheint vor allem die Lokalisation des Antigens von Bedeutung zu sein. So sollen sekretierte Proteine eher eine T_H2-Antwort und damit einen allergischen Verlauf auslösen, wohingegen über einen Glycosylphosphatidyl-Anker an der Zellwand befestigte Proteine eher eine T_H1-Antwort und damit einen protektiven Schutz bewirken (BOZZA et al., 2009). Dies sind aber nur Hinweise, da in den bisherigen Untersuchungen nur sehr wenige Antigene analysiert wurden.

Eine mögliche diagnostische Methode könnte die Weiterentwicklung eines ELISpot Assays gegen spezifische *Aspergillus*-Antigene darstellen. Er bietet aufgrund seiner hohen Sensitivität die Möglichkeit auch Zytokine zu erfassen, die nur in sehr kleinen Mengen produziert werden und ist dabei deutlich sensitiver als der ELISA (KABILAN et al., 1990; ELGHAZALI et al., 1993; TANGUAY & KILLION, 1994). Es gibt bereits Studien, die dank dieser Methode einzelnen *A. fumigatus*-Antigenen eine vorherrschende Zytokinproduktion zuordnen und somit ableiten konnten, zu welcher T-Zell-Antwort das jeweilige Antigen führt (CHAUDHARY et al., 2010). Die Vorhersage, ob es zu einer protektiven T_H1- oder einer allergischen und nicht-protektiven T_H2-Antwort kommt, wäre damit möglich.

Auch in der Therapie zeichnen sich Einsatzmöglichkeiten für T-Zellen ab. Vor allem der prophylaktische Einsatz spezifischer T-Zellen gegen *A. fumigatus* scheint bei der Ausbildung eines protektiven Schutzes für Risikopatienten erfolgsversprechend zu sein (CASSONE, 2008; NANJAPPA & KLEIN, 2014). Der Erfolg ist jedoch abhängig von der Generierung *Aspergillus*-spezifischer T_H1-Zellen. Hierfür könnten *A. fumigatus*-Antigene eingesetzt werden, deren Produktion sich bisher jedoch nicht immer als einfach dargestellt hat (CHAUDHARY et al., 2010).

Um herauszufinden, welche *A. fumigatus*-Antigene sich für den Einsatz bei der Generierung protektiver T_H1-Zellen eignen, wäre es daher interessant, möglichst

viele *Aspergillus*-spezifische Antigene herzustellen und Kenntnis hinsichtlich der durch sie induzierten T-Zell-Antwort zu gewinnen, aus derer sich wiederum ein möglicher Einsatz in Therapie oder Diagnose ableiten ließe.

Da die Herstellung von *A. fumigatus*-spezifischen Antigenen bisher noch wenig erfolgreich war, war Ziel dieser Arbeit eine Methode zur Herstellung von *A. fumigatus*-spezifischen Antigenen zu etablieren. Bei einem Erfolg sollten diese im Anschluss durch einen Kooperationspartner am Universitätsklinikum Würzburg, als T-Zell-Antigene evaluiert und schließlich für die Entwicklung eines ELISpot Assays eingesetzt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Taxonomie

Aufgrund ihrer Morphologie werden Aspergillen auch als Gießkannenschimmel bezeichnet, begründet wurde die Gattung *Aspergillus* im Jahre 1729. Heutzutage sind mehr als 180 Aspergillus-Arten bekannt, 40 von ihnen werden als pathogen eingestuft (KLICH, 2006). *A. fumigatus* kann sich sowohl sexuell als auch vegetativ vermehren und kann somit der Klasse der *Ascomycota* zugeteilt werden (O’GORMAN et al., 2009). Er ist ein fakultativ pathogener Erreger und kann Infektionen, die eine hohe Mortalitätsrate aufweisen, hervorrufen. Andere Spezies, die zur Gattung *Aspergillus* gezählt werden, haben ganz unterschiedliche Eigenschaften und können zum Teil sogar industriell genutzt werden. So wird beispielsweise *A. niger* für die Herstellung von Enzymen oder Zitronensäure eingesetzt (DAGENAIS & KELLER, 2009; NASCIMENTO et al., 2019). Auch *A. terreus* wird heutzutage bei der Produktion von Lovastatin, einem Cholesterinsenker, und Cyclosporin A, einem Immunsuppressivum, industriell genutzt (HAJJAJ et al., 2001). *A. flavus* hingegen kann durch die Bildung von kanzerogen wirkenden Aflatoxinen großen gesundheitlichen Schaden anrichten (LAN et al., 2019). Er kommt vor allem im Pflanzenreich vor und wird in der Landwirtschaft als Lagerpilz gefürchtet. Bei chronischer Exposition können seine Mykotoxine eine immunsupprimierende Wirkung haben und durch ihre kanzerogene Wirkung auch zur Entstehung von Leberkrebs beitragen (WILLIAMS et al., 2004).

Domäne	<i>Eucaryota</i>
Reich	<i>Fungi</i> (Pilze)
Abteilung	<i>Ascomycota</i> (Schlauchpilze)
Klasse	<i>Ascomycetes</i> (Echte Schlauchpilze)
Ordnung	<i>Eurotiales</i>
Familie	<i>Trichocomaceae</i>

Gattung	<i>Aspergillus</i> (Gießkannenschimmel)
Hauptarten	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i>

Tabelle 1: Taxonomische Klassifikation von *A. fumigatus* (DE HOOG et al., 2000)

2. *Aspergillus fumigatus*

Der Name *fumigatus* leitet sich aus dem lateinischen Wort *fumus* ab und bedeutet Rauch. Verantwortlich für diese Namensgebung ist die durch das Melanin verursachte rauchgrüne Färbung der Sporen, sowie die rauchartige Verbreitung der Sporen durch die Luft. Erstmals beschrieben wurde *A. fumigatus* 1863 von dem deutschen Botaniker und Arzt Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius (SCHMIDT, 1998)

3. Lebenszyklus und Habitat

A. fumigatus zählt zu den saprophytären Pilzen, das bedeutet, dass er seine Nährstoffe ausschließlich aus der Zersetzung organischer Substanzen im Boden bezieht. Er ist ein thermotoleranter Pilz und wurde sogar in der Sahara, der oberen Atmosphäre und der Antarktis gefunden (BARDANA & SILVA-HUTNER, 1980). Viele filamentöse Pilze können, sobald das Myzel Kontakt zu Luft hat, asexuelle Sporen ausbilden. Sie dienen als Verbreitungseinheit und stellen darüber hinaus sicher, dass der Pilz auch widrige Lebensumstände überdauern kann. Die Sporen von *A. fumigatus* werden über die Luft verbreitet und haben einen Durchmesser von etwa 2-3 µm (LATGÉ, 1999). Sie sind von einer hydrophoben Hülle, der so genannten *rodlet layer* umgeben, welche die Sporen vor Umwelteinflüssen und deren Erkennung durch Immunzellen schützt (AIMANIANDA et al., 2009). Wenn die Sporen auf eine Oberfläche treffen, können sie sich an diese anlagern und beim Vorhandensein günstiger Umweltbedingungen (Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit) mit dem Auskeimen beginnen. In einem ersten Schritt kommt es zur Spaltung von Trehalosepolymeren und deren Umwandlung in Glycerin. Dies hat Veränderung des osmotischen Druckes zur Folge, somit strömt Wasser ein und es kommt zu einem Anschwellen der Konidien (CARLILE et al., 2001). In den nächsten Stunden bilden sich daraus Keimschläuche und die Hyphe beginnt durch Verlängerung des terminalen Bereichs zu wachsen. Hyphen haben einen

Durchmesser von circa 2-4 μm und sind durch Septen in einzelne Kompartimente unterteilt (ROHDE et al., 2002; BLOEMENDAL & KÜCK, 2013). Diese Septen enthalten Poren, die einen Zytoplasmaaustausch innerhalb der Hyphen ermöglichen. Hauptbestandteile der Hyphenzellwand sind vor allem die Polysaccharide β -1,3-D-Glucan, β -1,6-D-Glucan, Chitin und Galaktomannan. Durch die Verzweigung einzelner Hyphen kommt es zur Entstehung eines Hyphengeflechts und damit eines Myzels. Sind Hyphen in Kontakt mit der Luft, beginnt die Sporulation. Hierbei wächst zunächst aus einer Fußzelle ein Konidiophor, dieser hat ein stielartiges Aussehen mit einem endständigen Vesikel. Diesem aufgelagert sind so genannte Phialiden, welche die Konidien bilden und in Ketten abschnüren. Die so entstandenen Sporen können anschließend leicht durch den Wind verbreitet werden und bei günstigen Umweltbedingungen kann dann ein neuer Lebenszyklus beginnen.

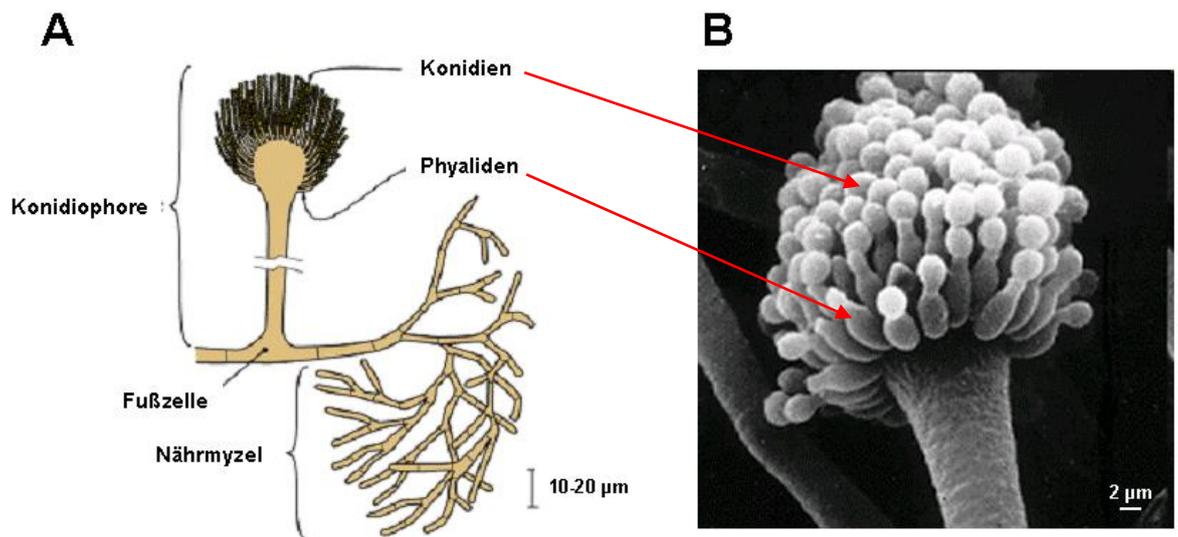


Abbildung 2 A: Morphologie von *A. fumigatus* (SCHWIENBACHER et al., 2015) B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Konidiophors
<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/105899>

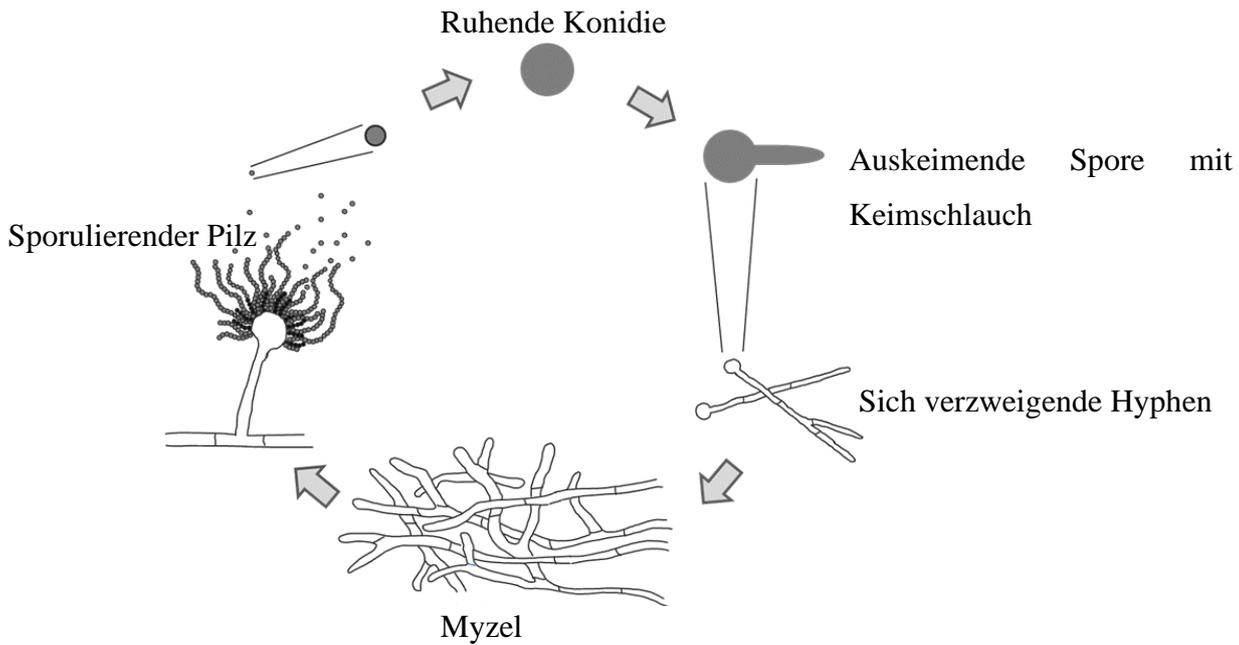


Abbildung 3: Lebenszyklus von *A. fumigatus* (KOTZ, 2010)

4. Klinische Bedeutung

4.1 Bedeutung in der Humanmedizin

Da *A. fumigatus* ubiquitär verbreitet ist, atmet jeder Mensch täglich mehrere hundert Sporen ein (LATGÉ, 1999). Besitzt der betroffene Organismus eine normale Immunitätslage, werden die inhalierten Sporen durch Alveolarmakrophagen und die mukoziliäre Clearance eliminiert. Aspergillus-assoziierte Erkrankungen können, abhängig von der Reaktion des Immunsystems, in invasive Erkrankungen, allergische Erkrankungen, sowie saprophytische Kolonisation unterteilt werden (HINSON et al., 1952; HERZOG et al., 2008). Die zwei wichtigsten Erkrankungen, die IA und die ABPA, werden im Weiteren kurz vorgestellt.

4.1.1 Die invasive Aspergillose

Die invasive Aspergillose (IA) ist eine der schwersten, durch *A. fumigatus* verursachten Erkrankungen und tritt, ausgelöst durch Immunsuppression, als

opportunistische Infektion auf (HERBRECHT et al., 2002; SUN et al., 2012). Infolge der Immunsuppression können die eingeatmeten Sporen nicht mehr durch die Alveolarmakrophagen abgetötet werden und reifen so zu Hyphen heran. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Infiltration in das Parenchym, die Blutgefäße und von anatomischen Barrieren und somit zu einer Verbreitung im gesamten Körper (KRAUß, 2015).

Mit dem Ausmaß und der Dauer der Immunsuppression steigt das Risiko an einer IA zu erkranken deutlich an. Schwere Neutropenie $<500/\mu\text{l}$, Stammzell- und Organtransplantation, fortgeschrittene AIDS-Erkrankung, systemische Steroidtherapie, sowie chronisch granulomatöse Erkrankungen gehören zu den Hauptrisikofaktoren (STRASSBURG et al., 2010). Des Weiteren zählen vorangegangene IA-Erkrankungen (OFFNER et al., 1998), Erkrankung am Zytomegalie-Virus (MARR et al., 2002), sowie HLA-Mismatch bei der Transplantation, T-Zell-Depletion der Spende und eine nicht ausreichende Filterung der Raumluft zu möglichen Risikofaktoren (WALD et al., 1997).

Vor allem im Bereich maligner hämatookologischer Grundkrankheiten wie akuter oder chronischer Leukämie, lymphoider Neoplasien, wie dem Hodgkin Lymphom und dem Non-Hodgkin Lymphom, oder dem Malignen Myelom stellt die allogene Stammzelltransplantation häufig die einzig kurative Behandlungsoption dar (BARNES et al., 2016). Nach Stammzelltransplantation kommt es jedoch häufig zu Infektionen, Organschädigungen und akuter oder chronischer *Graft-versus-Host Disease* (GvHD), welche tödlich enden können (SORROR, 2010). Die IA zählt zu den häufigsten infektiösen Komplikationen nach einer allogenen hämatologischen Stammzelltransplantation (SUN et al., 2012) und stellt somit ein großes Problem dar. Für eine erfolgreiche Therapie muss mit der Behandlung frühzeitig begonnen werden. Eine Diagnose stellt sich aufgrund der unspezifischen Symptome jedoch oftmals als schwierig dar. Die Symptome, die meistens etwa drei bis vier Monate nach der Transplantation und oft in Verbindung mit einer GvHD auftreten, sind unter anderem respiratorischer Art, wie Husten, Dyspnoe und Brustschmerzen, Fieber und neurologischen Auffälligkeiten (LATGÉ, 1999). Ein weiterer Grund für eine schwierige und verzögerte Diagnose ist, dass den Patienten oftmals hohe Dosen an Glukokortikoiden gegeben werden, welche die Symptome zusätzlich

abschwächen (JANTUNEN et al., 2002). Dabei ist die Früherkennung maßgeblich am Behandlungserfolg der invasiven Aspergillose beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass bei einer frühzeitigen Behandlung die Mortalitätsrate auf 29% gesenkt werden konnte, wohingegen die Mortalitätsrate bei verspätetem Behandlungsbeginn 80% betrug (HERBRECHT et al., 2002).

4.1.2 Die allergische bronchopulmonale Aspergillose

Die ABPA wird üblicherweise von *A. fumigatus* verursacht, seltener auch von anderen Aspergillus Spezies und ist die häufigste bronchopulmonale Mykose beim Menschen (MENZ et al., 2003). Zu den prädisponierenden Faktoren zählen unter anderem Asthma, sowie Mukoviszidose, bei denen die Prävalenz einer *A. fumigatus*-Sensibilisierung mit bis zu 23 % angegeben wird (NIKOLAIZIK et al., 1991). Die ABPA ist das Ergebnis immunologischer Entzündungsreaktionen im Bereich der Bronchien und des umliegenden Lungenparenchyms. Dabei scheinen einige Antigene, die von *A. fumigatus* produziert werden, eine entscheidende Rolle zu spielen, da es zu einer starken allergischen Reaktion gegen diese Proteine kommt, ausgelöst durch T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten (BURNIE, 1995). Durch immunologisch-entzündliche Vorgänge werden das Bronchialepithel, die bronchiale Submukosa und das umliegende Lungenparenchym zerstört, was vor allem unbehandelt zur zentralen Bronchiektasie und Fibrosierung des Lungenparenchyms, einschließlich pulmonaler Hypertonie, Cor pulmonale und im Endstadium zum Tod durch Lungenversagen führen kann (VAUGHAN, 1993). Daher ist eine frühzeitige Behandlung essentiell. Irreversible Organschädigungen können aber auch bei einer vermeintlich adäquaten Behandlung auftreten (MENZ et al., 2003).

Die klinischen Stadien können nach Patterson und Mitarbeitern eingeteilt werden (PATTERSON et al., 1982).

Stadium I bezeichnet die Erstmanifestation, zwei Drittel der Betroffenen zeigen ein akutes Auftreten von Symptomen und einen schubartigen Verlauf, bei dem anderen Drittel ist Stadium I relativ asymptomatisch und verläuft subklinisch. Zu den Symptomen der akuten Manifestation gehören eine Zunahme der bronchialen Obstruktion, Fieber, welches länger als drei Tage anhält, purulentes Sputum, Thoraxschmerzen und bräunlich verfärbtes Sputum. Selten können auch

Hämoptysen, Pleuritis sicca, Pleuraergüsse oder Pneumothorax beobachtet werden. Typisch ist ein stark erhöhtes Gesamt-IgE, sowie eine Erhöhung des spezifischen IgG gegen *A. fumigatus* (MENZ et al., 2003).

Stadium II ist gekennzeichnet durch einen Rückgang des Gehalts von IgE und IgG, es kommt zur Reduktion der Symptome sowie der Rückbildung vorübergehender radiologischer Veränderungen (PATTERSON et al., 1982).

Typisch für Stadium III ist die Exazerbation der ABPA. Durch eine gute Anamnese lässt sich dieses Stadium von Stadium I unterscheiden (PATTERSON et al., 1982).

Stadium IV wird von Patterson als kortikoidpflichtiges Asthma definiert, diese Definition ist jedoch umstritten, da viele Asthmatiker, die früher hochdosiert systemisch steroidpflichtig waren, heutzutage mit modernen inhalativen Steroiden, ohne die Zugabe systemischer Steroide auskommen (MENZ et al., 2003).

In Stadium V kommt es zur Lungenfibrose, es stellt das Endstadium der ABPA dar. Durch pulmonale Insuffizienz und Cor pulmonale kann es letztendlich zum Tod kommen (PATTERSON et al., 1982).

Seit einigen Jahren gibt es ein zusätzliches Stadium, welches unter dem Begriff „seropositive ABPA“ aufgeführt ist. Hierbei kann die zentrale Bronchiektasie in einer CT-Untersuchung noch nicht nachgewiesen werden. Es ist daher wichtig dieses frühe Stadium durch diagnostische Maßnahmen zu erkennen und eine adäquate Therapie einzuleiten bevor es zu einem Voranschreiten der Erkrankung kommt (MENZ et al., 2003).

Die Therapie richtet sich danach, in welchem Stadium sich der Patient befindet, als Basistherapie werden Kortikosteroide verwendet, auch ein adjuvanter Einsatz von Itraconazol gewinnt zunehmend an Bedeutung (MENZ et al., 2003).

4.2 Bedeutung in der Veterinärmedizin

Infektionen mit *A. fumigatus* kommen auch in der Tiermedizin bei nahezu allen domestizierten Tieren, Wildtieren und Vögeln vor. Dabei können sie ein ähnlich

breites Spektrum an Krankheiten wie in der Humanmedizin hervorrufen, welches von allergischen Reaktionen bis hin zu systemischen Aspergillosen reicht (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Ob es zu einer Erkrankung kommt oder nicht, hängt auch hier vom Immunstatus des Individuums ab. Jedoch sind nicht nur immunsupprimierte Tiere gefährdet eine Aspergillose zu entwickeln, sondern auch gesunde Tiere, die einer unhygienischen und defizitären Umgebung ausgesetzt sind oder an einer Vorerkrankung leiden (JACOBSON et al., 2000). Vor allem die Tuberkulose ist hier zu nennen (ZMEILI & SOUBANI, 2007).

Die bei Tieren vorkommenden Aspergillosen sind tierartlich unterschiedlich, zu den häufigsten zählen sinonasale Infektionen bei Hunden und Katzen, Luftsackmykosen bei Pferden, Aborte und Mastitiden bei Rindern, sowie Infektionen des Respirationstraktes bei Geflügel und anderen Vögeln (ARNÉ et al., 2011).

4.2.1 Die Aspergillose der Katzen

Bei der Katze sind zwei Formen der Aspergillose bekannt, die sinonasale und die sinoorbitale Mykose (SEYEDMOUSAVI et al., 2015), prädisponiert für eine nasale Mykose scheinen Perserkatzen oder andere brachyzephe Rassen zu sein (BARRS et al., 2013) Als Haupterreger gilt *A. felis* gefolgt von *A. udagawae* und *A. viridinutans* (KANO et al., 2008; BARRS et al., 2013). In letzter Zeit wurden vermehrt sinoorbitale Mykosen, welche sich aus einer sinonasalen entwickeln, beobachtet. Das könnte auf eine ausgeprägte virale Immunschwäche der betroffenen Tiere zurückzuführen sein (HAMILTON et al., 2000). Hat sich die sinonasale zu einer sinoorbitalen Mykose ausgeweitet, verschlechtert sich die Prognose, da die Behandlung erschwert wird (BARACHETTI et al., 2009). Gelegentlich treten auch Keratomykosen auf, diese werden mit *A. flavus* in Verbindung gebracht, welcher natürlich auf dem Auge vorkommt und erst sekundär eine Infektion bewirkt. Als Erreger einer Primärinfektion werden hier vor allem Feline Herpesviren vermutet (LABELLE et al., 2009).

Die Diagnose wird in der Regel über die klinischen Symptome, eine Rhinoskopie, Röntgen oder eine Computertomographie gestellt, dennoch wird zur Absicherung auch eine kulturelle Anzucht empfohlen. Weiterführende Maßnahmen wie Serologie, Zytologie und Histopathologie sollten ebenfalls mit einbezogen werden

(HARTMANN & HEIN, 2008).

4.2.2 Die Aspergillose der Hunde

Zu den drei Hauptformen der Aspergillose beim Hund zählen die sinonasale, die bronchopulmonale sowie die disseminierte Aspergillose.

Die am häufigsten vorkommende Form ist die sinonasale Aspergillose, gerade Deutsche Schäferhunde und Rottweiler scheinen hier eine Rasseprädisposition zu besitzen. Hunde aller Altersklassen können betroffen sein, 40 % sind drei Jahre alt oder jünger, 80 % von ihnen sind unter sieben Jahre alt (SEYEDMOUSAVI et al., 2018). Die Aspergillose ist nach nasalen Neoplasien die häufigste Ursache für nasalen Ausfluss beim Hund (TASKER et al., 1999). Neben *A. fumigatus* wurden auch *A. niger*, *A. nidulans* und *A. flavus* als Erreger berichtet, diese treten jedoch deutlich seltener auf. Zu den klinischen Symptomen einer fortgeschrittenen Erkrankung zählen nasale Schmerzen, Ulzerationen, sowie intermittierendes bilaterales Nasenbluten. In einigen Fällen konnte auch eine Destruktion der Siebbeinplatte beobachtet werden. Auch wenn die sinonasale Aspergillose die am häufigsten vorkommende Form beim Hund ist, ist die Therapie oftmals nicht erfolgreich (SHARMAN & MANSFIELD, 2012).

Die bronchopulmonale Aspergillose ist eine beim Hund selten auftretende Erkrankung (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2011). Die klinischen Symptome sind meist unspezifisch und treten in Form von Abgeschlagenheit, Husten und Fieber auf. Im zytologischen Befund einer bronchoalveolaren Spülprobe sind in der Regel Neutrophile und Makrophagen aufzufinden, nur selten lassen sich Pilzbestandteile nachweisen (BILLEN et al., 2009).

Die disseminierte Aspergillose tritt beim Hund nicht häufig auf, sie nimmt jedoch oft einen schweren Verlauf und endet tödlich. Sie tritt vermehrt bei Deutschen Schäferhunden auf. Zu ihren Haupterregern zählen vor allem *A. terreus* und *A. deflectus*, weniger häufig sind *A. fumigatus*, *A. niger* oder *A. flavipes* (SCHULTZ et al., 2008). Zu den klinischen Symptomen einer disseminierten Aspergillose zählen Lethargie, Anorexie, Lahmheiten, Gewichtsverlust, Fieber, Hämaturie, Inkontinenz, generalisierte Lymphadenopathie und neurologische Ausfälle. Dazu kann es noch zu Schädigungen an Leber und Nieren sowie Diskospondylitis kommen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Der erste beschriebene Fall einer

disseminierten Aspergillose beim Hund wurde durch *A. versicolor* verursacht. Dieser Hund litt an Diskospondylitis, Osteomyelitis und Pyelonephritis (ZHANG et al., 2012).

Die Diagnose erfolgt meist aus einer Kombination verschiedener Verfahren, um sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Empfohlen werden unter anderem Serologie, Röntgen und Endoskopie, aber auch Computertomographie, Pilzkultur, Histologie und DNA-basierte Methoden zählen zu den gängigen Untersuchungen (BILLEN et al., 2009).

4.2.3 Die Aspergillose der Wiederkäuer

Infektionen mit *Aspergillus* spp., insbesondere *A. fumigatus*, kommen weltweit bei Wiederkäuern vor und können Erkrankungen wie mykotische Pneumonie, Gastroenteritis, Mastitis, Planzentitis und Aborte auslösen (PUNTENNEY et al., 2003). Geschwächte Kühe, wie beispielsweise in der frühen Laktation oder solche, die am *hemorrhagic bowel syndrome* leiden, scheinen hierfür am anfälligsten zu sein. Gesunde Kühe sind dagegen normalerweise resistent gegenüber *A. fumigatus* Infektionen, der Erreger kommt zwar nahezu überall in Heu und Silage vor, löst aber keine Erkrankungen aus (COLE et al., 1977; PUNTENNEY et al., 2003).

Die bronchopulmonale Aspergillose ist eine zumeist schnell auftretende und schwer verlaufende Erkrankung (JENSEN et al., 1994). Die klinischen Symptome beinhalten Fieber, nasalen Ausfluss, feuchten Husten, sowie eine flache und röchelnde Atmung (PUNTENNEY et al., 2003). Die Lungen der Tiere sind hart und schwer und kollabieren nicht. Bei Voranschreiten der Erkrankung, vom subakuten bis hin zum chronischen Verlauf, entwickeln sich, der Tuberkulose sehr ähnliche, multiple Granulome (PICKETT et al., 1985). In der Histologie dieser Lungen finden sich zahlreiche Hyphen, sowie Oxalatkristalle (SEVERO et al., 1989; MUNTZ, 1999). Die Entstehung dieser Oxalatkristalle ist noch nicht vollständig geklärt, aber von vielen *Aspergillus* Spezies ist bekannt, dass sie Oxalsäure produzieren, welche toxische Effekte auf Gewebe ausübt und Gewebnekrosen hervorbringt (LEE et al., 1986; KIMMERLING et al., 1992).

Bei der gastrointestinalen Mykose erfolgt die Infektion über die

Nahrungsaufnahme und manifestiert sich am häufigsten im Blättermagen. Pansen, Netz- und Labmagen können jedoch auch betroffen sein (JENSEN et al., 1994). Oftmals wurden die Tiere über eine längere Zeitspanne mit Breitspektrumantibiotika behandelt, litten an Durchfall oder Meläna und zeigten herabgesetzte Pansenkontraktionen. Über Läsionen und hämatogene Streuung kann die gastrointestinale Aspergillose zu Sekundärinfektionen in anderen Organen führen (HILL et al., 1971; SARFATI et al., 1996).

Die durch *A. fumigatus* ausgelöste Mastitis tritt vor allem beim kleinen Wiederkäuer auf, insbesondere bei vor der Geburt antibiotisch behandelten Milchschaafen (LAS HERAS et al., 2000). Es können jedoch auch bei Milchkühen mykotische Mastitiden auftreten (PÉREZ PÉREZ et al., 1999).

Die mykotische Plazentitis tritt sekundär in Folge einer disseminierten Aspergillose, über hämatogene Streuung aus dem Verdauungstrakt, auf (SARFATI et al., 1996). Oftmals äußert sie sich in einem Abort im dritten Trimester der Trächtigkeit oder ab dem dritten Monat, nicht selten gefolgt von Nachgeburtsverhalten, ansonsten sind erkrankte Kühe jedoch symptomlos. Bei einer hohen Belastung der Umwelt mit *A. fumigatus* Konidien können sich die Abortszahlen innerhalb einer Herde erhöhen, gelegentlich gefolgt von Symptomen einer Pneumonie oder Endometritis; darauffolgende Trächtigkeiten verlaufen in der Regel jedoch unproblematisch (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

4.2.4 Die Aspergillose der Pferde

Beim Pferd treten durch *Aspergillus* spp. ausgelöste Erkrankungen vor allem in Form einer Luftsackmykose oder einer Pneumonie auf (BLOMME et al., 1998; DOBESOVA et al., 2012).

Luftsackmykosen verlaufen in der Regel asymptomatisch, betroffen ist meist der dorsale Teil der medianen Luftsackbucht. Dort kommt es zu gelb-braunen, nekrotischen Läsionen, welche über Endoskopie bildlich dargestellt und zur Diagnose herangezogen werden können (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Problematisch wird es, wenn die Arteria maxillaris oder die Arteria carotis interna beziehungsweise externa befallen werden und es dort zu Läsionen kommt, welche

starke Blutungen und im schlimmsten Fall den Tod durch Verbluten nach sich ziehen können (LANE, 1989). Bei einem Befall der kranialen Nerven, kann es zu Kehlkopfpfeifen, dem Horner-Syndrom, Fazialispareesen oder Dysphagien mit Nasenausfluss kommen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Prädisponierende Faktoren für eine Infektion sind unter anderem Immunsuppression, über einen längeren Zeitraum gehende antibiotische Behandlung, Endokrinopathien, sowie Enteritiden und Neoplasien (HATTEL et al., 1991; CARRASCO et al., 1996). Eine Geschlechts- oder Rassedisposition konnte bisher noch nicht festgestellt werden (LEPAGE et al., 2004).

Eine pulmonale Aspergillose äußert sich beim Pferd in der Regel mit Fieber und eher milden respiratorischen Symptomen wie Tachypnoe in Verbindung mit Atemgeräuschen (JOHNSON et al., 1999). Eine Diagnose der invasiven pulmonalen Aspergillose ist äußerst schwierig, darum sollten bei oben genannten klinischen Symptomen unklarer Ursache epidemiologische Gesichtspunkte, die eine Entstehung einer Aspergillose begünstigen, miteinbezogen werden (SWEENEY & HABECKER, 1999).

Insgesamt gestaltet sich die Diagnose einer pulmonalen Aspergillose oder einer Luftsackmykose als kompliziert und sollte die Evaluierung des klinischen Verlaufs in Kombination mit der Endoskopie beinhalten (LUDWIG et al., 2005; DOBESOVA et al., 2012). Darüber hinaus sollten zusätzlich eine kulturelle Anzucht des Erregers, sowie ein histologischer Nachweis der Hyphen im Gewebe erfolgen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Differentialdiagnostisch kommen sowohl virale oder bakterielle Erreger für eine Infektion der retropharyngealen Lymphknoten oder Pneumonie in Frage, als auch pharyngeale lymphoide Hyperplasie oder pharyngeale Polypen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

4.2.5 Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel

Beim Vogel wird zwischen der akuten und chronischen Aspergillose, sowie der Mykotoxikose unterschieden. Die unterschiedlichen Krankheitsverläufe werden vor allem von der Verteilung der Sporen, der Infektionsdosis, dem Immunstatus und Vorerkrankungen beeinflusst (SEYEDMOUSAVI et al., 2015)

Die akute Aspergillose äußert sich bei jungen Vögeln klinisch in der Regel eher

unspezifisch, zu den Symptomen zählen Anorexie, Kümmeren, Bewegungsstörungen, Polyurie, Polydypsie, respiratorische Veränderungen, Lethargie. Es können aber auch plötzliche Todesfälle auftreten. Morbidität und Mortalität sind als hoch einzustufen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Ältere Tiere können ausgeprägtere respiratorische Symptome zeigen, darunter Dyspnoe mit Schnabelatmung, Zyanosen, Schwanzwippen, nicht produktiver Husten und Keuchen oder pfeifenden Atem (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die chronische Aspergillose betrifft meist ältere Tiere und tritt nur sporadisch auf. Grundlage für eine Erkrankung ist oft eine, durch schlechte Haltungsbedingungen hervorgerufene, Immunsuppression (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Zu den meist unspezifischen Symptomen gehören Gewichtsabnahme, verringerte Belastbarkeit und Dyspnoe nach Aktivität, sowie ein reduziertes Allgemeinbefinden. Die Mortalität ist in der Regel eher gering. Bei Befall des Nervensystems kann es aber auch zu Ataxien, Torticollis, Opisthotonus, Paresen oder auch Erblindung kommen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die Mykotoxikose kann nach oraler Aufnahme toxischer Metaboliten entstehen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Vor allem die Fähigkeit von *A. fumigatus* in der Lunge des Wirtes große Mengen an Gliotoxin zu produzieren, spielt hierbei eine entscheidende Rolle (RICHARD et al., 1996). Gliotoxin ist in der Lage, die Phagozyten zu beeinträchtigen und somit eine Immunsuppression hervorzurufen, wodurch die Entstehung einer Aspergillose begünstigt wird (SCHLAM et al., 2016).

5. Diagnostik und Therapie in der Humanmedizin

5.1 Diagnostische Methoden

Eine Diagnose einer durch *Aspergillus* ausgelösten Erkrankung gestaltet sich aufgrund der unspezifischen und oft erst spät einsetzenden Symptome als schwierig (LATGÉ, 1999). Der Therapieerfolg ist jedoch in großem Maße vom Zeitpunkt abhängig, denn ohne Behandlung kann die Erkrankung ungehindert voranschreiten und zu irreversiblen Schädigungen bis hin zum Tod führen

(HERBRECHT et al., 2002). In der Regel setzt sich die Diagnose aus Klinik, bildgebender Verfahren, Kultur, Histologie und Serologie, sowie molekularbiologischer Methoden zusammen (DE PAUW et al., 2008).

5.1.1 Diagnose der ABPA

Die Diagnose der ABPA erfolgt aus einer Kombination verschiedener Parameter und muss anhand einzelner Kriterien gestellt werden. Hierzu zählen laborchemische und radiologische Methoden, sowie die Einbeziehung klinischer Symptome (MENZ et al., 2003). Der Zeitpunkt der Diagnose spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg einer Therapie. Aufgrund der unspezifischen Symptome wird diese jedoch häufig erst in einem späteren Krankheitsstadium gestellt (HERBRECHT et al., 2002). Dabei wäre eine frühzeitige Diagnosestellung, aufgrund des potenziell schweren, progredienten Verlaufs, wichtig, da sie unbehandelt zu schwerer Destruktion der Lunge führt (MENZ et al., 2003). Zur Diagnose werden Faktoren wie beispielsweise das Vorhandensein von bronchialem Asthma, einer Erhöhung des Gesamt-IgE-Gehalts im Serum und einer Erhöhung der Konzentrationen spezifischer IgE und IgG gegen *Aspergillus*-Antigene, sowie unmittelbare positive Hautreaktionen auf injizierte *Aspergillus*-Antigene herangezogen (ROSENBERG et al., 1977).

Auch Hauttests zählen zu den etablierten Screeningverfahren. IgE-vermittelte allergische Sofortreaktionen werden bei ABPA beobachtet, kutane Spätreaktionen sind jedoch auch möglich. Wie Prick- und Intrakutantest, sind auch serologische Untersuchungsmethoden stark abhängig von Standardisierung und Konstanz der verwendeten Allergene (CRAMERI et al., 1998). So basiert die In-vitro-Immundiagnostik auf dem Nachweis zirkulierender Antikörper gegen spezifische Antigene. Die Konzentrationen verschiedener Immunglobulin-Isotypen spiegeln dabei die immunologische Antwort des Patienten gegenüber der Exposition wider (MENZ et al., 2003). Jedoch eignen sich nicht alle Antigene für solche serologischen Untersuchungsverfahren. Das Schweizer Institut für Asthma- und Allergieforschung untersuchte die Antwort auf das bekannte Allergen Asp f1 auf ihre diagnostische Aussagefähigkeit. Eine sichere Unterscheidung zwischen ABPA und *A. fumigatus*-Sensibilisierung ist alleine mit Asp f1 nicht möglich, da sowohl Seren von ABPA-Patienten, als auch Nicht-ABPA-Patienten IgE-Antikörper gegen Asp f1 enthalten können (MOSER et al., 1992). Dagegen lassen Asp f4 und Asp f6, weitere Hauptallergene von *A. fumigatus*, eine Differenzierung

von ABPA und *A. fumigatus*-sensibilisierten Allergikern mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von über 90 % zu (HEMMANN et al., 1999). Spezifisches Serum-IgE gegen beide Allergene konnte nur bei den ABPA-Patienten nachgewiesen werden (CRAMERI et al., 1996). Auch bei Mukoviszidose, bei der eine Unterscheidung zwischen ABPA und *A. fumigatus*-Sensibilisierung (ohne ABPA) von besonderer Bedeutung ist, kann mithilfe von Asp f4 und Asp f6 eine serologische Diagnose mit nahezu 100 %iger Sensitivität gestellt werden (MENZ et al., 2003). Des Weiteren sind typische radiologische Veränderungen zur Diagnostik mit ein zu beziehen. Diese kann man in akute (vorübergehende) und bleibende einteilen (MENZ & VIRCHOW, 1987). Zu den akuten zählen beispielsweise erweiterte und mit Sekret gefüllte Bronchien, die nach Behandlung mit systemischen Steroiden wieder verschwinden können. Typisch für bleibende Veränderungen ist die zentrale Bronchiektasie, sie gilt als pathognomisch für die ABPA und tritt bevorzugt in den mittleren und besonders den oberen Etagen der Lunge auf (MENZ & VIRCHOW, 1987). Wenn Hauttest und Serologie negativ sind, das klinische und radiologische Bild jedoch eine ABPA vermuten lassen, dann muss an eine allergische bronchopulmonale Mykose gedacht werden, die durch einen anderen Pilz verursacht wird (MATTHIESSON, 1981).

5.1.2 Diagnose der IA

Meist setzt sich die Diagnose invasiver Schimmelpilzkrankungen aus mehreren Untersuchungsmethoden zusammen. Letztendlich gehören dazu die Ermittlung klinischer Symptome, der kulturelle Erregernachweis, die Histologie, der serologische Nachweis von Pilzbestandteilen, sowie bildgebende Verfahren (OREN & GOLDSTEIN, 2002; OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Zusätzlich werden aber auch Risikofaktoren, ob beispielsweise eine Neutropenie vorliegt oder es hohe und über einen längeren Zeitraum anhaltende Gaben von Kortikosteroiden gab, bei der Diagnose berücksichtigt (ASCIOGLU et al., 2002).

Eine Diagnose alleine über die klinischen Symptome des Patienten ist nicht möglich, da diese sehr unspezifisch sind und auch andere Ursachen in Betracht gezogen werden müssen (DE PAUW et al., 2008).

Eine Diagnose kann auch über molekularbiologische Methoden wie die PCR erfolgen, sie liefert schnelle Ergebnisse und weist eine hohe Sensitivität auf. Doch obwohl spezifische *Aspergillus*-Gene mit vielversprechenden Ergebnissen amplifiziert werden können, sollte eine Diagnose nicht ausschließlich aufgrund dieses Kriteriums gestellt werden, da es durch die hohe Sensitivität auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Eine Unterscheidung zwischen einer Erkrankung und einer Kolonisierung ist mit dieser Methode kaum möglich (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Des Weiteren ist sie bisher weder kommerziell erhältlich noch standardisiert, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist daher nicht immer gegeben (DONNELLY, 2006; TUON, 2007; DE PAUW et al., 2008).

Die *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) veröffentlichte 2002 erstmals Standarddefinitionen für invasive Pilzinfektionen, laut derer man die Wahrscheinlichkeit eine invasive Pilzinfektion zu diagnostizieren in drei Abstufungen einteilt: Bewiesen (*proven*), wahrscheinlich (*probable*) und möglich (*possible*) (ASCIUGLU et al., 2002).

Als wahrscheinlich gilt ein Fall, wenn der Patient zu den Risikopatienten zählt und spezifische klinische Symptome zeigt (DE PAUW et al., 2008). Ein Nachweis pilzspezifischer Antikörper ist aufgrund der Immunsuppression des Großteils der Patienten nicht geeignet (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Galaktomannan ist ein Zellwandbestandteil des Pilzes und wird bei seinem Wachstum freigesetzt. Das Galaktomannan-Antigen kann schon früh nach einer Infektion, vor dem Auftreten klinischer Symptome, in BAL-Flüssigkeit, Liquor, Blut oder Serum nachgewiesen werden (BARNES & MARR, 2007). Dafür gibt es ein kommerziell erhältliches Galaktomannan Assay, welches auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs beruht (Platelia™ *Aspergillus Galactomannan EIA*, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Frankreich) (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Da die Pilzbürde des Patienten mit der Galaktomannan-Menge im Serum korreliert, eignet sich somit der Nachweis des Antigens zur Diagnose einer IA (MARR et al., 2004). Obwohl er gut standardisierbar ist und sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität aufweist, kann es trotzdem zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommen (PFEIFFER et al., 2006). Falsch negative Ergebnisse sind bei zuvor erfolgten antifungalen Therapien oder einer zu niedrigen Pilzbürde des Patienten möglich. Zu falsch positiven Ergebnissen kann es durch Kreuzreaktionen mit *Fusarium*-Antigenen oder auch

nach dem Einsatz von beta-Lactam-Antibiotika kommen (NUCCI et al., 2014; WIEDEMANN, 2017).

Für einen bewiesenen Fall werden zusätzliche Kriterien herangezogen, dazu zählen Auffälligkeiten in der Computertomographie, bei denen es jedoch auch andere Auslöser geben kann und die daher durch eine histologische Untersuchung abgeklärt werden müssen (GREENE et al., 2007). Zu den typischen sichtbaren Veränderungen zählen hierbei sogenannte Halo-Zeichen in der Lunge. Sie stellen sich milchglasartig trüb um noduläre Massen dar und können einen Hinweis auf eine IA liefern. Auch umgekehrte Halo-Zeichen können vorkommen, diese äußern sich in einer rundlichen, milchglasartigen Masse, welche von sichelförmigen oder vollständigen Ringen umgeben ist (GEORGIADOU et al., 2011). Eine frühe Diagnose mithilfe des Röntgens wird nicht empfohlen, da Veränderungen durch die IA erst spät zu erkennen sind und auch hier andere mögliche Auslöser in Betracht gezogen werden müssen (BARNES & MARR, 2007).

Die diagnostische Aussagekraft von Kulturen ist von der Probeentnahme abhängig. Wurde die Probe nicht steril entnommen, besteht die Gefahr, dass es sich bei einer positiven Kultur um eine normale Kolonisierung oder eine Kontamination handeln kann. Hinzu kommt, dass eine Entnahme oftmals ein Risiko für den Patienten darstellt. Gerade neutropenische Patienten haben oftmals eine Thrombozytopenie, welche das Blutungsrisiko nach einer Gewebeentnahme deutlich erhöht und somit eine gefürchtete Komplikation darstellt (BARNES & MARR, 2007). Blutkulturen sind bei *A. fumigatus* in der Regel negativ (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

5.2 Therapie

Momentan gibt es drei Wirkstoffgruppen, die bei einer invasiven Mykose zum Einsatz kommen: Polyene, Echinocandine und Azole. Die Sterblichkeitsrate der IA ist hoch, was zum einen an der geringen Auswahl an Therapeutika liegt und zum anderen daran, dass diese Substanzen nur zwei Strukturen im Pilz angreifen, Zellwand und Zellmembran (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass *A. fumigatus* ein Eukaryont ist und daher Ähnlichkeiten zu menschlichen Zellen bestehen, was dazu führt, dass bei längerer

Einnahme antimykotischer Medikamenter Nebenwirkungen auftreten können (ODDS et al., 2003).

Polyene:

Der genaue Wirkmechanismus der Polyene ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch weiß man, dass sie an das Ergosterol der Zellmembran binden, es so zur Bildung von Ionenkanälen kommt, die eine Permeabilitätsstörung und dadurch letztendlich den Zelltod hervorruft (ODDS et al., 2003). Das Amphotericin B zählt zu den Polyenen und war lange Zeit das Mittel der zur Behandlung von invasiven Mykosen, es hat ein breites Wirkspektrum und kann intravenös verabreicht werden (JANTUNEN et al., 2000). Allerdings kann es bei der Gabe von Amphotericin B zu teils schweren Nebenwirkungen kommen, problematisch ist vor allem die Nephrotoxizität des Wirkstoffs, da es zur Zerstörung der renalen Tubuluszellen und einer damit verbundenen Nekrose dieser kommen kann. Weitere Nebenwirkungen können unter anderem Fieber, Schüttelfrost, Myalgien oder Gelenkschmerzen sein (BATES et al., 2001). Um diese Problematik zu lösen, wurde ein liposomales Amphotericin B hergestellt. Es lindert zwar die Nebenwirkungen, muss jedoch in größeren Mengen verabreicht werden, da es zuerst aus dem Phospholipidverband gelöst werden muss (THOMPSON & PATTERSON, 2008; TRAUNMÜLLER et al., 2011).

Azole:

Die Gruppe der Azole lassen sich in zwei Untergruppen aufteilen: die Imidazol-Derivate und die Triazol-Antimykotika. Sie hemmen die fungale Cytochrom P450 Enzyme und verhindern so die Ergosterolbiosynthese, was schließlich zu einer Fehlfunktion der Zellmembran führt. Dies wiederum verhindert ein Wachstum und führt zum Zelltod (THOMPSON & PATTERSON, 2008).

Imidazol-Derivate finden bei der Therapie einer durch *Aspergillus* verursachten Erkrankung keine Anwendung.

Zu den Triazol-Antimykotika zählen das Itraconazol, das Posaconazol und das Voriconazol. Das Itraconazol kann oral und intravenös verabreicht werden und wirkt häufig gut bei Patienten, die keine Besserung bei einer Amphotericin B Behandlung zeigten (LATGÉ, 1999). Problematisch bei Itraconazol ist, dass es ein Inhibitor einiger Subtypen der Cytochrom P450 Familie ist, die bei der

Verstoffwechslung von Medikamenten benötigt werden (TRAUNMÜLLER et al., 2011). Die Azidität des Magens beeinflusst die Aufnahme des Wirkstoffes bei oraler Einnahme in Kapselform, außerdem sollte es nicht bei schwer oder lebensbedrohlich Erkrankten eingesetzt werden. Es wird nur bei allergischen oder nicht-invasiven Aspergillosen empfohlen, da Bioverfügbarkeit und Toxizität nicht vorhersehbar sind. Das Voriconazol zeigt sowohl bei pulmonalen als auch bei tracheobronchalem Befall eine gute Wirkung und kann entweder oral oder intravenös verabreicht werden (DENNING et al., 2002). Es wird als Mittel der Wahl bei der IA empfohlen (BOHME et al., 2003). Da es gut ins Nervensystem gelangt, kann es prinzipiell auch dort wirken, dennoch sind bei einem Befall des zentralen Nervensystems die Überlebenschancen schlecht (JANTUNEN et al., 2002). Das Posaconazol ist ein lipophiles Triazol und stammt vom Itraconazol ab, bisher ist es nur in oraler Form verfügbar (TRAUNMÜLLER et al., 2011). Da der Wirkspiegel jedoch nicht für längere Zeit aufrecht erhalten wird, kommt es eher zum Einsatz, wenn andere Behandlungen nicht erfolgreich waren, außerdem wird es in den Richtlinien der *Infectious Diseases Society of America* als antimykotische Prophylaxe bei Risikopatienten empfohlen (WALSH et al., 2008).

Echinocandine:

Ihre Wirkung beruht auf ihrer Funktion als nicht kompetitiver Inhibitor des Enzyms β -1,3-D-Glucan-Synthase, welches für die Herstellung des β -1,3-D-Glucans benötigt wird. Dies befindet sich in der Zellwand des Pilzes und bei einer gestörten Synthese, kommt es so zur Schwächung des Pilzes (KRAUß, 2015). Zu der Gruppe der Echinocandine zählen das Caspofungin, das Anidulafungin und das Micafungin. Sie wirken fungistatisch und es konnte bisher nur selten eine komplette Remission der Erkrankung bei alleiniger Gabe erzielt werden. Daher wird eine Gabe eher als Kombination mit anderen antifungalen Medikamenten empfohlen (THOMPSON & PATTERSON, 2008).

Die Therapie in der Tiermedizin gestaltet sich aufgrund der schlechten Effektivität und der hohen Kosten der Antikmykotika oftmals als problematisch.

Aspergillosen bei Vögeln werden oft mit Einzel- oder Kombinationspräparaten behandelt. Hierfür hat sich eine Kombination von einem Azol und Amphotericin, systemisch oder topisch verabreicht, bewährt. Auch das Haltungsmanagement

sollte optimiert werden, vor allem der Luftfeuchtigkeitsgehalt sollte entsprechend angepasst werden. Chirurgische Entfernungen von Granulomen können ebenfalls in Betracht gezogen werden (XAVIER et al., 2007). Die Therapie bei Geflügel ist aus wirtschaftlicher Gründen nahezu unmöglich, auch Impfstoffe sind nicht verfügbar (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Für die Therapie der sinonasalen Aspergillose beim Hund wird eine operative Entfernung der Plaques mit anschließender topischer Behandlung mit Azolen empfohlen (SHARMAN & MANSFIELD, 2012). Für Spülungen der Nasenneben- und der Nasenhöhle eignen sich Miconazol oder Enilconazol, dies kann abhängig von der Schwere der Erkrankung auch mehrmals erfolgen. Die Prognose der disseminierten Aspergillose ist leider oftmals ungünstig, da Erkrankungen aufgrund der oft unspezifischen Symptome spät diagnostiziert werden und bereits weit vorangeschritten sind (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Eine Langzeitbehandlung bis zu drei Jahren mit Itraconazol oder anderen Azolen kann eine Infektion eindämmen und ein verlängertes Überleben bewirken, ist jedoch sehr teuer (ZHANG et al., 2012).

Für die Behandlung der Luftsackmykose beim Pferd wird ein chirurgischer Eingriff in Kombination mit einer systemischen oder topischen Gabe von Azolen empfohlen. Kritisch wird es bei einem Befall der dort verlaufenden Arterien. Wenn diese rupturieren, kann es zu tödlichen Blutungen kommen (LEPAGE & PICCOT-CREZOLLET, 2005). Dies sollte daher durch möglichst ursprungsnahe Ligationen verhindert werden. Am besten geeignet sind hierfür Coil-Embolisationen oder Ballonkatheterisierungen, wobei erstere die besseren Ergebnisse liefern (TELL, 2005).

Beim Wiederkäuer findet in der Regel aufgrund der hohen Kosten und den Rückständen in der Milch keine Therapie der Aspergillose statt. Die Therapie besteht hier aus einer unterstützenden Behandlung und Optimierung der Haltungsbedingungen, um prädisponierende Faktoren zu eliminieren (SARFATI et al., 1996).

6. Immunreaktionen

6.1 Allgemeines

Bei einem Kontakt von einem Pathogen mit einem Wirt sind zwei wichtige Mechanismen erforderlich, die eine Antwort des Immunsystems überhaupt erst ermöglichen: Zum einen muss der Wirt in der Lage sein, die Pathogene zu erkennen, zum anderen muss der Wirt in der Lage sein entsprechend zu reagieren (ROMANI, 2004). Dafür nötig sind Rezeptoren und Zytokine.

6.2 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine mit einer Größe von etwa 25kDa, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren (BAUER, 2011). Zum einen können sie Einfluss auf die Zelle nehmen, die sie produziert hat, sie können aber auch zur Kommunikation zwischen Zellen dienen. Vor allem bei Infektionen und Verletzungen spielen Zytokine als Mediatoren eine wichtige Rolle (HEINRICH et al., 1998). Unterteilen lassen sie sich in fünf Hauptgruppen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine und kolonie-stimulierende Faktoren.

Zu den bekanntesten Vertretern der Zytokine zählt TNF- α , es wird größtenteils von Monozyten, Dendritischen Zellen (*dendritic cell*, DC) und alveolaren Makrophagen produziert und teilt sich viele seiner Funktionen mit IL-1 β und IL-6 (DINARELLO et al., 1986).

Auch IL-12 zählt zu den pro-inflammatorischen Zytokinen, welche nach einem Kontakt mit *A. fumigatus* von DCs gebildet werden. Zu seinen Aufgaben gehören die Aktivierung natürlicher Killerzellen und die Differenzierung von CD4⁺-T-Lymphozyten zur T_H1-Subpopulation (T-Helferzellen).

Chemokine sind in der Lage Zellen des angeborenen Immunsystems zum Infektionsherd zu locken und können Lymphozyten aktivieren, die wiederum eine adaptive Immunantwort auslösen. Durch die Anordnung der zwei N-terminalen Cysteine werden sie in zwei Gruppen unterteilt (BAUER, 2011). Die eine Gruppe besitzt eine Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen (CXC), bei der anderen hängen die ersten beiden Cysteine direkt aneinander (CC) (ZLOTNIK &

YOSHIE, 2000). Zwei dieser Chemokine sind bei *A. fumigatus* von Bedeutung: Ligand 10 (CXCL10) und Ligand 20 (CCL20). So wird das Risiko an invasiver Aspergillose zu erkranken, von dem Vorkommen von *single nucleotide polymorphism* im CXCL10-Gen beeinflusst (MEZGER et al., 2008b). Dieses Chemokin ist ein chemischer Lockstoff für Monozyten, löst eine T_H1-Antwort aus und bewirkt eine Erhöhung der T-Zell-Adhäsion an Endothelzellen (LUSTER & LEDER, 1993; TAUB et al., 1993). Als Mediator der inflammatorischen Immunantwort wird es sowohl durch IFN- γ als auch durch Lipopolysaccharide (LPS) induziert (OHMORI & HAMILTON, 1990). Unterdrückt wird seine Synthese durch das Zytokin IL-10, welches wiederum durch LPS und IFN induziert werden kann. CXCL10 ist das nach einer Konfrontation mit *A. fumigatus* am stärksten hochregulierte Gen (MEZGER et al., 2008a) und hat vor allem chemotaktische Effekte auf die CD4⁺, CD8⁺, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2006).

6.3 Rezeptoren zur Erkennung von *A. fumigatus*

Von großer Bedeutung sind bei der Erkennung von *A. fumigatus* Toll-like-Rezeptoren (TLR). Toll wurde ursprünglich in der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo es eine Funktion in der Entwicklung hat. Seine Entdecker, die Forschungsgruppe um Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard, waren darüber so begeistert, dass sie dieses Protein humorvoll nach dem deutschen Wort für *toll* benannt haben. Der Toll Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Immunität gegen Pilze. Es konnte festgestellt werden, dass Toll-defiziente *Drosophila* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* aufweisen (LEMAITRE et al., 1996). Das erste Homolog von Toll im Menschen wurde 1997 entdeckt, welches heute unter dem Namen TLR4 bekannt ist (MEDZHITOV et al., 1997). Inzwischen wurden beim Menschen aufgrund von Sequenzhomologien 10 verschiedene TLRs identifiziert (AKIRA & TAKEDA, 2004). Bei Infektionen mit *A. fumigatus* wird die inflammatorische Immunantwort über die Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR9 ausgelöst. So konnte nachgewiesen werden, dass TLR4 und CD14 in humanen Monozyten wichtig für die Erkennung von *A. fumigatus* sind. Interessanterweise wird über diese beiden Rezeptoren auch LPS erkannt (WANG et al., 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe bestätigte dies und konnte zusätzlich zeigen, dass auch TLR2 bei der Erkennung von *A. fumigatus*

eine Rolle spielt, nicht jedoch TLR1 und TLR5-10 (MEIER et al., 2003).

Als weiterer Rezeptor konnten C-Typ Lektine auf DCs und Makrophagen identifiziert werden. So wird Galaktomannan von DC-SIGN (*dendritic-cell specific*) gebunden (SERRANO-GÓMEZ et al., 2004). Dectin-1, ein TypII Transmembranrezeptor, welcher eine einzige Kohlenhydraterkennungsdomäne besitzt, ist ein Rezeptor für β -1,3-D-Glucan (BROWN, 2006). Dass Dectin-1 spezifisch an das β -1,3-D-Glucan bindet, konnte über ein Oligosaccharidmicroarray gezeigt werden (PALMA et al., 2006).

Daneben gibt es noch den Komplementrezeptor 3 (CD11/CD18), dessen Lectindomäne an das β -Glucan des *A. fumigatus* bindet. Er ist auch unter dem Name CR3 bekannt (THORNTON et al., 1996). Es ist in der Lage Einfluss auf die Chemotaxis von Neutrophilen und den *oxidativen burst* zu nehmen (TSIKITIS et al., 2004; LEBLANC et al., 2006); (LAVIGNE et al., 2006).

6.4 Ablauf von Immunreaktionen

Bei der ersten Reaktion des Immunsystems während einer Pilzinfektion spielt vor allem die unvermittelte Reaktion des angeborenen Immunsystems eine bedeutende Rolle, erst später kommen auch die adaptiven Mechanismen hinzu. Von Bedeutung sind Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, T-Zellen und dendritische Zellen, deren Rezeptoren und verschiedene humorale Faktoren, des Weiteren aber auch Epithel- und Endothelzellen (ROMANI, 2004).

Eine Infektion beginnt, in dem sich die Konidien an die tracheobronchalen Epithelzellen anlagern. Diese Zellen sind mit Zilien ausgestattet und bilden ein Flimmerepithel. Durch den Wimpernschlag der Zilien werden Staub, Schleimstoffe und Schmutz kontinuierlich aus der Lunge abtransportiert und bilden somit die erste wichtige Barriere bei der Vermeidung von Infektionen (KOTZ, 2010). Ist dieser Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien jedoch gestört, können sich die Konidien, welche normalerweise durch eben diesen Wimpernschlag eliminiert werden, anlagern und es kann zu einer Infektion kommen. Gründe für einen herabgesetzten oder kompletten Ausfall der Zilienbewegungen können unter anderem Medikamente sein, die beispielsweise in

der Chemotherapie eingesetzt werden oder aufgrund einer übermäßigen Schleimproduktion, die bei einer Erkrankung an Cystischer Fibrose vorkommt (TRONCHIN et al., 2008).

Die Sporen, die die Bronchien passieren, gelangen in den Alveolarraum, den vor allem Typ I- und Typ II-Epithelzellen auskleiden. Typ I-Epithelzellen sind wichtig für den Gasaustausch, sehr dünn und bilden 95 % der alveolaren Oberfläche aus. Typ II-Zellen hingegen machen die restlichen 5 % der Oberfläche aus. Ihre Aufgabe ist es, Komplement- und *surfactant*-Protein, sowie Zytokine herzustellen, somit sind sie Teil der angeborenen Immunantwort (HERZOG et al., 2008). Hervorzuheben sind die *surfactant*-Proteine A und D, da sie eine Agglutination von *A. fumigatus*-Konidien sowie deren Bindung an Neutrophile und alveolare Makrophagen bewirken und somit deren Abtöten begünstigen (PARK & MEHRAD, 2009). Es konnte in In-vitro-Experimenten gezeigt werden, dass Konidien sehr effizient an A549-Zellen, Typ II-ähnlichen Zellen einer humanen Lungenkarzinom-Epithelzelllinie, binden. Außerdem adhärieren die Konidien an Typ I- und Typ IV- Kollagen, Laminin und Fibrinogen, welche von Fibroblasten hergestellt werden (KOTZ, 2010). Dies spricht dafür, dass an den Konidienoberflächen Rezeptoren für diese Matrix-Proteine sitzen, die die Adhäsion an das Epithel ermöglichen (BROMLEY & DONALDSON, 1996). Filler und Sheppard haben herausgefunden, dass die Sporen ihre Endozytose durch alveolare Epithelzellen über einen Zipper-Mechanismus induzieren können (FILLER & SHEPPARD, 2006). In der Zelle befinden sich die aufgenommenen Sporen innerhalb der Lysosomen, dort wird ihre Auskeimung verlangsamt, beziehungsweise zum Teil vollständig inhibiert (BAUER, 2011). Gelingt dies nicht und es kommt zur Auskeimung der Sporen, können diese das Lysosom verlassen und die Plasmamembran der Epithelzelle penetrieren. Durch diesen Vorgang kann *A. fumigatus* die durch das Lungenepithel geschaffene Barriere überwinden und sich somit in der Lunge ausbreiten (WASYLNKA & MOORE, 2003).

In frühen Phasen der Infektion spielen vor allem alveolare Makrophagen eine wichtige Rolle. Sie können die Sporen phagozytieren, abtöten und durch die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen locken sie weitere Zellen an (MCCORMICK et al., 2010a). Für die Erkennung von Pathogenen besitzen die Makrophagen Rezeptoren auf ihren Oberflächen, sogenannte *pattern-recognition*-

receptors (PRRs). Diese PRRs erkennen für Pathogene spezifische Struktur motive (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), die im Allgemeinen hoch konserviert sind und beim Wirt nicht vorkommen (BAUER, 2011). Die ruhenden Konidien von *A. fumigatus* exponieren jedoch keine PAMPs und sind zusätzlich durch eine hydrophobe Proteinschicht vor der Erkennung durch Phagozyten geschützt (AIMANIANDA et al., 2009). Die Exponierung des wichtigen pilzlichen PAMPs β -1,3-Glucan, beginnt erst bei Abwurf der Proteinhülle während der Auskeimung (BAUER, 2011). Dies ermöglicht es dem klassischen C-Typ-Lektin-Rezeptor Dectin-1 das PAMP auf angeschwollenen Sporen oder des Keimlings zu erkennen und somit die Phagozytenrate zu erhöhen (STEELE et al., 2005). Die Sporen gelangen nach der Aufnahme durch alveolare Makrophagen in ein Phagolysosom. Bisher ist der genaue Prozess des Abtötens der Spore noch nicht vollständig geklärt, reaktive Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) scheinen dabei aber eine Rolle zu spielen. Sie sollen vor allem an der Signaltransduktion zur Aktivierung von Immunzellen beteiligt sein (BRAKHAGE et al., 2010). So schaffen Makrophagen es, die Konidien mit einer zeitlichen Verzögerung von drei bis sechs Stunden nach der Phagozytose zu töten und den Pilz mit einer hohen Erfolgsrate auszulöschen. Auf diese Weise können innerhalb von 30 Stunden 90% der Konidien abgetötet werden (SCHAFFNER et al., 1983). Ein weiterer Mechanismus, der bei Antreffen eines Makrophagen auf eine Spore ausgelöst wird, ist die Ausschüttung von Chemokinen und Cytokinen, was zur Folge hat, dass weitere Zellen angelockt werden und eine Entzündungsreaktion entsteht. Dazu zählen TNF- α , IL-1 α , IL-2 β , IL-6, MIP-1, MIP-2, G-CSF und GM-CSF (MEIER et al., 2003). Des Weiteren vermutet man, dass *A. fumigatus* unterschiedliche Mechanismen besitzt, die ihn vor Abtötung durch Makrophagen schützen. So weiß man inzwischen, dass es vier Gene gibt, die für Superoxid-Dismutasen kodieren (SCHWIENBACHER et al., 2005). Durch diese Superoxid-Dismutasen soll der ROS-Stress reduziert werden können (BAUER et al., 2005). Diese Hypothese wird von Ergebnissen von Lambou unterstützt, der herausfand, dass eine Deletion von drei der vier Superoxid-Dismutasen dazu führte, dass es zu einer verstärkten Abtötung von Sporen durch alveolare Makrophagen kam (LAMBOU et al., 2010). Zu den Zellen, die durch die Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen angelockt werden, zählen Granulozyten, welche maßgeblich am Entzündungsprozess beteiligt sind. Neutrophile spielen bei der

Elimination des Pilzes eine herausragende Rolle (BAUER, 2011). Daher ist vor allem die Abwesenheit von Neutrophilen von Bedeutung, wie sie bei starker Immunsuppression mit einhergehender Neutropenie zu finden ist. Neutrophile gehören in die Gruppe der polymorphkernigen Granulozyten. Der Name Granulozyt geht aus ihrer im Zytoplasma enthaltenen Granula und den unregelmäßig geformten Zellkern zurück. Aufgrund unterschiedlichen Färbeverhaltens ihrer Granula werden drei Arten unterschieden: Eosinophile, Basophile und Neutrophile. Eosinophile dienen vor allem zur Abwehr von Parasiten. Neutrophile bilden die größte Gruppe der Granulozyten und sind in der Lage Mikroorganismen durch unterschiedliche Mechanismen zu eliminieren. Sie erkennen die Konidien mithilfe derselben Rezeptoren wie Makrophagen, Dectin-1, TLR2 und TLR4, und können die Konidien mittels Phagozytose aufnehmen und abtöten. Außerdem können sie durch Degranulation antimikrobielle Stoffe freisetzen, die Konidien an ihrer Auskeimung hindern und Hyphen angreifen (BRAKHAGE et al., 2010). Diese Fähigkeit ermöglicht es den Neutrophilen den Pilz somit intra- als auch extrazellulär anzugreifen, was vor allem bei der Bekämpfung von längeren Keimlingen und Hyphen, die nicht internalisiert werden konnten, eine wichtige Rolle spielt (BALLOY & CHIGNARD, 2009). Durch diese Internalisierung werden die Degranulation und die Freisetzung von ROS ausgelöst (LEVITZ & FARRELL, 1990). Es wurde beobachtet, dass Neutrophile bei einer Konfrontation mit Pathogenen vermehrt Wasserstoffperoxid bilden (IYER et al., 1961). Man spricht hierbei auch von respiratorischer Entladung oder oxidativem Burst. Eine zentrale Rolle bei diesem oxidativen Burst spielt das membranassoziierte Enzym NADPH-Oxidase (SCHWIENBACHER et al., 2005). Es kann durch Elektronenübertragung molekularen Sauerstoff in das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) umwandeln. Dieses wiederum kann in andere Oxidantien umgesetzt werden, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, hypochlorige Säure, Nitrylchlorid oder Peroxynitrit, welche hoch reaktiv sind und somit in der Lage sind DNA, Lipide und Proteine des Pilzes zu schädigen (BAUER et al., 2005). Vor allem das β -Glucan, ein wichtiger Zellwandbestandteil von *A. fumigatus*, induziert den oxidativen Burst (SCHWIENBACHER et al., 2005). Interessant ist, dass nicht das im Aufbau der Zellwand vorherrschende β -1,3-Glucan für die Stimulation der Neutrophilen hauptsächlich verantwortlich ist, sondern das seltener vorkommende β -1,6-Glucan (RUBIN-BEJERANO et al., 2007). Ein weiterer Mechanismus, den Neutrophile bei der Bekämpfung nützen, ist die

Ausbildung sogenannter NETs (*neutrophil extracellular traps*) (MCCORMICK et al., 2010a). Die Hauptaufgabe dieser NETs ist es, die Verlängerung der Hyphen zu hemmen, indem sie mit Zink-Ionen eine Chelatbildung eingehen und so das Zink, welches *A. fumigatus* benötigt, binden und damit für den Pilz unbrauchbar machen (MCCORMICK et al., 2010a). NETs sind aus extrazellulären Fasern bestehende Netzwerke, die sich aus einem DNA-Grundgerüst und ihnen angelagerten cytoplasmatischen und Granula-Proteinen zusammensetzen (URBAN et al., 2009). Unter den cytoplasmatischen Proteinen befindet sich das Calprotectin, welches für die Chelatbildung verantwortlich ist, da es in der Lage ist Zink und Mangan zu binden (MCCORMICK et al., 2010b). Es hat somit eine ausgeprägte antimikrobielle Wirkung. Im Zytosol neutrophiler Granulozyten macht Calprotectin etwa 60% der dort gelösten Proteine aus (JOHNE et al., 1997).

In der hier beschriebenen Phase erfolgt die Immunantwort auf *A. fumigatus*-Konidien durch das angeborene Immunsystem. Dies geschieht tagtäglich und es kommt dabei in der Regel zu keinen Infektionen. Kommt es aufgrund einer abgeschwächten Antwort jedoch zu einer weitergehenden Infektion, muss das adaptive Immunsystem hinzukommen. Als vermittelnde Instanz agieren hierbei DCs. DCs sind Phagozyten mit langen, fingerförmigen Fortsätzen und erinnern vom Aussehen an die Dendriten der Nervenzellen (BAUER, 2011). In den meisten Geweben kommen sie dauerhaft vor und sind sehr langlebig. Die Fähigkeit von Dendritischen Zellen das Immunsystem zu regulieren wurde erstmals 1973 von Steinman und Cohn beschrieben und ist rezeptorvermittelt (STEINMAN & COHN, 1973). Sobald sie auf lösliche Antigene oder einen Mikroorganismus treffen, werden diese von den DCs prozessiert und präsentiert (BAUER, 2011). Dies bewirkt die Ausreifung der DCs, was dazu führt, dass sich ihre Expression an Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteinen (MHC) und kostimulatorischen B7-Molekülen (CD80/CD86) erhöht (GARRETT et al., 2000). Die Antigene werden als sogenannte Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert, daher werden DCs, zusammen mit Makrophagen und B-Lymphozyten, zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) gezählt. Diese Antigenpräsentation regt die Proliferation von T-Lymphozyten an. Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, werden von CD8+-T-Lymphozyten erkannt, während CD4+-T-

Lymphozyten Peptide erkennen, die von MHC-Klasse-II-Molekülen der DCs präsentiert werden (BAUER, 2011). Außerdem werden auf der Oberfläche von ausgereiften DCs kostimulatorische Moleküle exprimiert, welche für die Aktivierung der naiven T-Lymphozyten, zusätzlich zur Antigenpräsentation, essentiell sind (THÉRY & AMIGORENA, 2001). Eine weitere Reaktion, die durch den Kontakt zum Antigen ausgelöst wird, ist die Aktivierung des *nuclear factor* κ B (NF- κ B). Diese wiederum bewirkt die Ausschüttung von Zytokinen, die als Botenstoffe sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflussen. Das Zytokinprofil steuert zudem die Ausdifferenzierung der CD4+-T-Lymphozyten in eine der CD4+-Untergruppen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{reg}) (NI & O'NEILL, 1997).

Aufgrund ihres Ursprungs, des Phänotyps, des Vorkommens und ihrer Aufgaben werden DCs in zwei Subpopulationen unterteilt (BAUER, 2011). Die kleinere Gruppe ist die der plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Sie exprimieren unter anderem die Marker IL-3R, BDCA-2 und TLR7, sowie TLR9 (LIU, 2005). Die Aufgabe der pDCs ist die Freisetzung großer Mengen an Typ I Interferone nach Kontakt mit dem Pathogen. Da sie sich auf Virusinfektionen spezialisiert haben, regen sie außerdem Virus-spezifische T-Lymphozyten zur Proliferation an. TLR7 und TLR9 werden beide intrazellulär exprimiert und erkennen Nukleinsäuren (COLONNA et al., 2004). Die größere der beiden DC-Gruppen wird von myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) gebildet, welche wiederum in nicht-lymphoide und lymphoide mDCs unterteilt werden können (BAUER, 2011). Sie exprimieren unter anderem TLR2, TLR3 und TLR4, sowie die Oberflächenmarker CD1c und CD11c (O'DOHERTY et al., 1994). Nicht-Lymphoide mDCs befinden in verschiedenen Geweben, wie Lunge, Nieren oder Herz. Lymphoide mDCs zirkulieren im Blut, wo sie bei Antreffen eines Pathogens ausreifen und ins Lymphknotengewebe einwandern. Dort regen sie Pathogen-spezifische T-Lymphozyten zur Proliferation an (BAUER, 2011).

6.5 T-Zell-Antwort auf *A. fumigatus*-Antigene

Makrophagen und Granulozyten sind wichtige Effektorzellen bei der Abwehr von *Aspergillus* Infektionen, aber auch T-Zellen spielen eine wichtige Rolle. Sie sind vor allem für die Regulation der Balance zwischen toleranzbildenden oder

inflammatorischen Immunantworten verantwortlich (KRUHM, 2014).

Ein protektiver Schutz gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* wird über eine **TH1**-Immunantwort vermittelt. Diese Resistenz und die Entwicklung einer schützenden Immunität sind mit einem hohen Level von TNF- α und IL-12 assoziiert, die die Ausbildung von **TH1**-Zellen bewirken. Diese wiederum schütten IFN- γ und koloniestimulierenden Faktoren (CSF) aus (CENCI et al., 1999; ROMANI, 2008). IFN- γ und CSF stimulieren das angeborene Immunsystem, welches über eine vermehrte Produktion von Makrophagen, Neutrophilen und natürlichen Killerzellen in der Lage ist, Konidien und Hyphen zu eliminieren und damit die Infektion zu bekämpfen (ROMANI, 2011).

Im Gegenzug dazu kann eine hohe Ausschüttung von IL-4 und IL-10, und damit eine Differenzierung zu **TH2**-Zellen, zu einer fungalen Allergie oder einer Verstärkung der Infektion führen (CENCI et al., 1998). Zusätzlich unterdrückt eine durch *A. fumigatus* ausgelöste erhöhte **TH2**-Immunantwort die **TH1**-Antwort, was wiederum zur Folge hat, dass das Voranschreiten invasiver Erkrankungen weiter gefördert wird (HEBART et al., 2002; ROMANI, 2011). Im Maus-Model konnte gezeigt werden, dass IL-4 defiziente Mäuse gegenüber Infektionen mit *A. fumigatus* resistenter als Wildtyp-Mäuse waren. Die Resistenz zeigte sich mit einer verringerten Entzündung der Lunge, außerdem war die **TH2**-Zellantwort herabgesetzt und dem gegenüber eine erhöhte IL-12 abhängige **TH1**-Zellantwort zu beobachten (CENCI et al., 1999).

Die Differenzierung von **TH17** wird durch IL-23 induziert und löst eine Produktion von IL-17 aus, welches wiederum eine starke inflammatorische Immunantwort hervorruft. Dabei entsteht jedoch keine protektive Immunität (ZELANTE et al., 2007). Im Tiermodel führt eine Neutralisierung von IL-17 zu einer erhöhten Elimination von *A. fumigatus*, sowie zu einer Verbesserung der entzündlichen Prozesse und einer Wiederherstellung der **TH1** Immunität (ROMANI & PUC CETTI, 2007). Bei einer erhöhten **TH17** Produktion kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Neutrophilen und der Auslösung einer hyperinflammatorischen Immunantwort (WÜTHRICH et al., 2012).

Auch regulatorische T-Zellen, **T_{reg}**, gehören zu einer der Untergruppen, in welche sich CD4⁺-T-Lymphozyten ausdifferenzieren können. Indem sie die

regulatorischen Zytokine IL-10 und *transforming growth factor*- β (TGF- β) produzieren, unterdrücken T_{reg} eine erhöhte inflammatorische Immunantwort und verhindern damit eine Zerstörung des Gewebes (ROMANI & PUC CETTI, 2007; ROMANI, 2011).

Bei der Antigenpräsentation über die MHC-Klasse-I-Moleküle kommt es zur Differenzierung zu CD8+-T-Zellen (THÉRY & AMIGORENA, 2001; DE LUCA et al., 2012). Dies tritt bei der Abwesenheit von CD4+-Zellen auf und kann vor einer Infektion schützen. CD8+-T-Zellen aktivieren das angeborene Immunsystem über die Ausschüttung von IFN- γ , außerdem sollen sie in der Lage sein durch ihre zytotoxischen Eigenschaften Hyphen zu lysieren. Dabei besitzen sie die Möglichkeit zur Bildung eines Gedächtnisses, welches unabhängig von den CD4+-T-Zellen ist (CARVALHO et al., 2012; DE LUCA et al., 2012; NANJAPPA & KLEIN, 2014).

6.6 T-Zellen und ihr Einsatz in der Therapie

Vor allem Impfungen gegen invasive Pilzinfektionen scheinen sehr vielversprechend zu sein (CASSONE, 2008). So konnten in einer Studie T-Zell-Klone gegen spezifische *A. fumigatus*-Antigene erzeugt und erst kürzlich transplantierten Patienten verabreicht werden. Dabei handelte es sich um CD4+-Zellen, die eine hohe Produktion von IFN- γ und eine geringe von IL-10 aufwiesen. Bei den behandelten Patienten konnte eine hohe T-Zell-Antwort und eine damit verbundene hohe Ausschüttung von IFN- γ beobachtet werden. Somit konnte durch die Injektion der T-Zell-Klone ein protektiver Schutz erreicht werden. Bei der Kontrollgruppe hingegen zeigte sich noch 9 bis 12 Monate nach der Transplantation eine niedrige Anzahl Pathogen-spezifischer T-Zellen, die eine geringe Ausschüttung von IFN- γ und eine hohe von IL-10 aufwiesen. Die Ausbildung eines protektiven Schutzes gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* blieb bei ihnen also aus und es bestand das Risiko eine invasive Erkrankung zu entwickeln (PERRUCCIO et al., 2005).

Einer weiteren Arbeitsgruppe gelang es mithilfe einer Impfung einen protektiven Schutz bei immunsupprimierten Mäusen vor einer Infektion mit *A. fumigatus* herzustellen. Dafür nutzten sie eine verkürzte allergisch-inaktive Version von rekombinantem Asp3, welches die Aktivierung von T_H1-Zellen förderte und

somit den Schutz aufbaute (DIAZ-AREVALO et al., 2011).

Eine andere Möglichkeit stellt der Einsatz von CD8+-Zellen, ebenfalls in der Immuntherapie, dar. Gerade bei immunsupprimierten Patienten, die einen Mangel oder eine funktionelle Beeinträchtigung ihrer CD4+-Effektorzellen besitzen, besteht der Bedarf an alternativen Methoden zur Vermeidung einer Infektion mit *A. fumigatus* (WÜTHRICH et al., 2003). In mehreren Studien konnte bereits bewiesen werden, dass es zur Ausbildung eines protektiven Schutzes mithilfe der CD8+-T-Zellen kommen kann, wenn die normalerweise diese Funktion einnehmenden CD4+-T-Zellen dies nicht können (KOLLS et al., 1999; LINDELL et al., 2005). Somit stellt die Entwicklung eines impf-induzierten Schutzes auf Basis der CD8+-T-Zellen für gesunde Individuen vermutlich keine Option dar, doch gerade bei Risikopatienten könnte dies zum Einsatz kommen, um durch *A. fumigatus* ausgelöste invasive Erkrankungen zu vermeiden (CASTELLINO & GERMAIN, 2006).

Für den Einsatz spezifischer T-Zellen gegen *A. fumigatus* ist allerdings die erfolgreiche Generierung dieser T-Zellen entscheidend (JOLINK et al., 2013). Jedoch ist es schwierig eine spezifische T-Zelllinie durch Stimulation mit Hyphenextrakten zu etablieren. Das liegt zum einen daran, dass es abhängig vom Zeitpunkt der Wachstumsphase von *A. fumigatus* zur Expression unterschiedlicher Proteine kommt, zum anderen daran, dass die Proteine bei verschiedenen Wachstumsbedingung unterschiedlich stark exprimiert werden und es somit zu großen Schwankungen bei der Zusammensetzung des Hyphenextraktes kommt. Um diese Problematik zu vermeiden, besteht eine Option für die Generierung *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen rekombinante *A. fumigatus*-Proteine einzusetzen (JOLINK et al., 2013).

6.7 Nachweismethoden über die Funktionalität immunkompetenter Zellen

Grundsätzlich lassen sich die Nachweismethoden über die Funktionalität immunkompetenter Zellen in zwei Kategorien einteilen. Die eine Möglichkeit besteht darin, die Zellen anhand ihrer Größe, Teilungsfähigkeit oder Oberflächenstruktur zu identifizieren, zum anderen kann man die produzierten

Zytokine nachweisen und damit einen Rückschluss auf die T-Zell-Population ziehen.

Eine Option ist der Einsatz des *fluorescence-activated cell scanning* (FACS). Es basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie und ermöglicht einen Nachweis von Immunzellen und ihre Charakterisierung anhand ihrer Größe und Morphologie. Eine Identifizierung welcher Population sie angehören wird über den Einsatz fluoreszenzgefärbter Antikörper gegen hochspezifische Zelloberflächenantigene ermöglicht. Eine Aussage welcher spezifischen Subpopulation sie angehören, ist damit jedoch nicht möglich und daher ist diese Methode nur bedingt als Nachweisverfahren geeignet.

Eine präzisere Aussage bezüglich der vorherrschenden T-Zell-Subpopulation lässt die Bestimmung der Zytokine zu. Dafür kommen der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Luminex oder *Enzyme-linked immuno-spot* (ELISpot) Assay in Frage. Durch die Weiterentwicklung des ELISAs zum sogenannten Vollblut-ELISA bietet auch dieser eine gute Methode T-Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion direkt aus dem klinischen Material zu identifizieren.

Eine sehr genaue Methode ist die ELISpot-Methode, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität auch die Produktion von Zytokinen erfassen kann, die nur in sehr geringen Mengen produziert werden. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass die ELISpot-Methode im Vergleich zum ELISA sensitiver ist (KABILAN et al., 1990; ELGHAZALI et al., 1993; TANGUAY & KILLION, 1994). Durch die Möglichkeit, die Zytokinproduktion von nur wenigen Zellen sichtbar zu machen, entsteht die Chance, praktisch auf Einzelzellniveau zu arbeiten (LEVITE, 1998).

6.7.1 Prinzip des ELISpot Assays

Der ELISpot Assay basiert auf dem Grundprinzip eines „Sandwich-Komplexes“, er dient dem Nachweis sezernierter Zytokine, die von einzelnen Immunzellen nach einer Stimulation mit Antigenen sezerniert und an einer Membran immobilisiert werden.

Dabei befindet sich in den Wells einer 96-Well-Platte eine Nitrozellulosemembran auf dem sich der immobilisierte zytokinspezifische Antikörper befindet (*coating antibody* oder *capture antibody*) (MÖLLER &

BORREBAECK, 1985). Die zu untersuchende Probe wird gleichmäßig in den Wells verteilt, in der Regel handelt es sich hierbei um Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Die aktivierten Zellen beginnen Zytokine zu sezernieren, welche an den *capture antibody* binden. Nach einer erschütterungsfreien Inkubationszeit werden die Zellen entfernt und die Detektion beginnt, in dem der zweite, zytokinspezifische Antikörper hinzugegeben wird. An diesen kann ein Enzym gekoppelt werden, welches durch eine Farbreaktion einen Farbumschlag bewirkt und als Verfärbung auf der Membran beobachtet werden kann. Anhand dieser punktuellen Verfärbung kann nach dem Trocknen der Platte die Anzahl und die Größe der einzelnen Spots (aus dem Englischen: Punkte) unter dem Mikroskop quantifiziert werden. Jeder einzelne Spot bildet die Aktivierung einer einzelnen T-Zelle und deren Zytokinproduktion ab. Über die Größe, beziehungsweise die Gesamtfläche aller Spots, kann die Menge an ausgeschüttetem Zytokin abgeleitet werden. Mit Hilfe einer nicht-stimulierten Platte wird das Ergebnis validiert.

6.7.2 Prinzip des Vollblut-ELISAs

Das Prinzip des Vollblut-ELISAs ähnelt dem ELISpot Assay sehr. Auch hier werden zuvor stimulierte Zellen in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben, deren Boden zuvor mit einem zytokinspezifischen Antikörper überzogen worden ist. Ist das Zytokin im Plasma vorhanden, bindet es an diesen Antikörper. Darauf folgt die Zugabe eines spezifischen Sekundärantikörpers, an den ein Enzym gekoppelt ist und die zuvor gebundenen Zytokine durch eine Farbreaktion markiert. Der Vorteil gegenüber dem ELISpot Assay ist, dass das entnommene Vollblut nicht unmittelbar nach der Entnahme weiterverarbeitet werden muss und der Vollblut-ELISA somit in der Praxis eher geeignet ist.

7. Ziel dieser Arbeit

Aufgrund der bereits beschriebenen Möglichkeiten *A. fumigatus*-Antigene sowohl in der Therapie als auch in der Diagnostik einzusetzen, war es Ziel dieser Arbeit eine Methode für die Herstellung von *A. fumigatus*-Antigenen zu etablieren und so deren späteren Einsatz bei der Entwicklung diagnostischer oder therapeutischer

Methoden zu ermöglichen. Die funktionellen Tests sollten dabei von einer kooperierenden Arbeitsgruppe in Würzburg durchgeführt werden. Einer früheren Arbeitsgruppe gelang nur die Herstellung von sieben rekombinanten Proteinen von ursprünglich 17 geplanten Antigenen (CHAUDHARY et al., 2010). Daher war davon auszugehen, dass das bisherige Herstellungsverfahren noch modifiziert werden sollte und wir nicht damit rechnen konnten, alle geplanten Antigene auch erfolgreich herzustellen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemein

1.1 Plasmide

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid ist der pQE30 der Firma Qiagen

1.2 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 2 aufgeführt.

Stamm	Firma
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Qiagen
<i>E. coli</i> Rosetta	Qiagen
<i>E. coli</i> ClearColi™-K12	Lucigen

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

1.3 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion hergestellt

1.4 Chemikalien

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

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Medien

2.1.1 Medien für *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB (Luria-Bertani)A.-Medium mit folgender Zusammensetzung

Tryptone Peptone (Difco-Becton Dickinson)	10g
Hefeextrakt granuliert (Merck)	5g
NaCl (Merck)	5g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml; autoklavieren

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 7,2-7,4 eingestellt. Zur Selektion wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Endkonzentration von 1mM zugegeben. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 12g Bacto Agar (Difco-Becton Dickinson) pro Liter zugeführt.

2.1.2 Medien für *A. fumigatus*

Die Anzucht von *A. fumigatus* erfolgte in *Aspergillus*-Minimalmedium (HILL & KAFER, 2001)

AMM + D-Glucose

Salt-Mix	50 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 ml
Spurenelemente	1 ml
40 % D-Glucose	25 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml; steril filtrieren

Der pH-Wert liegt in etwa bei 6,6, ein Einstellen ist nicht erforderlich.

Salt-Mix (20x) ohne N-Quelle

KCL	10,4 g
KH ₂ PO ₄	16,3 g
K ₂ HPO ₄	20,9 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml; autoklavieren

Spurenelemente

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
Na ₄ EDTA x 4 H ₂ O	6,0 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,2 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	500 mg
H ₃ BO ₃	1,1 g
COCl ₂ x 6 H ₂ O	160 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	160 mg
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	110 mg
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml; autoklavieren

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien bei 121° C und 3 Bar für 20 min autoklaviert

2.2 Anzucht von *E. coli*

Als Kulturgefäße dienten für Kulturen bis zu einem Volumen von 4 ml 15ml-Röhrchen, ansonsten wurden Erlenmeyerkolben entsprechender Größe verwendet. Die Anzucht erfolgte über Nacht aerob bei 37° C in einem Schüttelinkubator (140 rpm) in LB-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 1mM.

2.3 Anzucht und Ernte von *A. fumigatus*

Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben entsprechender Größe. Die Anzucht erfolgte je nach Wachstumsverhalten über 1 bis 2 Nächte bei 37° C aerob in einem Schüttelinkubator (140 rpm). Die Ernte des Myzels erfolgte über sterile, mit Miracloth ausgekleidete Filter.

3. Molekularbiologische und genetische Methoden

3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *A. fumigatus*

Die DNA Isolierung erfolgte mittels *MasterPure Yeast DNA Purification Kit* (Lucigen)

50 ml AMM + D-Glucose wurden mit 50 µl Sporensuspension über Nacht in einem 250 ml Erlenmeyerkolben bei 37° C aerob in einem Schüttelinkubator (140 rpm) inkubiert. Die Ernte des am nächsten Tag entstandenen Myzels erfolgte über sterile, mit Miracloth ausgekleidete Filter. Es wurden 225µl *Yeast Cell Lysis Solution* in eine *DNA-Lysing Matrix Tube* vorgelegt, dazu wurden ca. 100 mg des geernteten Myzels hinzugegeben. Der Aufschluss des Myzels erfolgte im Fast Prep 24 (MP Biomedicals) bei 6 m/s für 40 s. Danach wurde es für 30 min bei 65° C im Heizblock inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Als nächstes wurden 112,5µl *MCP Protein Precip Reagent* hinzugegeben und für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 375 µl Isopropanol dazugegeben und einige Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis die DNA ausgefallen ist. Schließlich wurde es bei 4° C für 15 min zentrifugiert (13000 g), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 70% Ethanol resuspendiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4° Grad für 15 min und 13000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei geöffnetem Deckel ca. 30 min im Heizblock (50° C) getrocknet. Daraufhin wurde 0,2 µl RNase in 100 µl Nuklease-freies H₂O zum getrockneten Pellet gegeben, vorsichtig gemischt und anschließend bei -20° C eingefroren.

3.2 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit (10)* der Firma Qiagen verwendet.

100 mg Myzel (Stamm: AfS 35) wurden aus einer über Nacht Anzucht in Sabouraud in ein 2 ml Röhrchen (*Lysing Matrix A, 2ml Tube*, MP Biomedicals) gegeben. Dazu kam 1 ml Trizol. Das Röhrchen wurde anschließend drei Mal für je 40 Sekunden bei 10 m/s im Fastprep 24 (MP Biomedicals) homogenisiert. Daraufhin wurde die Probe für 5 min bei 4° C und 12000 g abzentrifugiert. Um die vollständige Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu ermöglichen, wurde die Probe danach für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und kurz gemischt. Daraufhin erfolgte eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 3 min. Danach wurde die Probe bei 4° C für 15 min abzentrifugiert (12000 g). Die Mischung bildete 3 Phasen aus: Die untere Phase enthielt die Proteine (die sogenannte Phenol-Chloroform Phase), die mittlere die DNA (die Interphase) und die obere, wässrige Phase die RNA. Die obere Phase wurde vorsichtig mittels einer Pipette abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 4° C für 10 min (12000 g) bei der ein weißes Pellet, mit der darin enthaltenen RNA, entstand. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zum Pellet wurde 1 ml 75% Ethanol gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das Gemisch für 5 min bei 4° C und 7500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 45 min trocknen gelassen. Anschließend wurde das Pellet in 35 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und für 12 min bei 60° C im Heizblock inkubiert. Die nächsten Schritte erfolgten auf Eis. Zur Elimination genomischer DNA wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 6 µl der RNA 2 µl *gDNA Wipeout Buffer 7x* und 6 µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Diese Mischung wurde bei 42° C für 7 min im Heizblock inkubiert und unmittelbar danach auf Eis gekühlt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 µl *Quantiscript Reverse Transkriptase*, 4 µl *Quantiscript RT Buffer 5x* und 1 µl *RT Primer Mix*. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 42° C im Heizblock und

einer darauffolgenden Kühlung auf Eis für einige Minuten. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte eine 3minütige Inkubation bei 95° C. Die cDNA wurde bei -20° C gelagert.

3.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

E. coli-Bakterien wurden über Nacht in 20 ml LB-Medium bei 37° C im Schüttelinkubator bei 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit dieser Kultur eine 1:20 Verdünnung mit frischem LB-Medium angesetzt und diese für 2 h bei 37° C und 140 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,56 bis 0,6 hatte, wurde diese für 5 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4° C für 15 min zentrifugiert (3000 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2/5 des Ausgangsvolumens in Tfb-I-Puffer resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Darauf folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 3000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den darin enthaltenen Zellen mit 2/25 des Ausgangsvolumens mit Tfb-II-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Je 100 µl der Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock-gefrostet und bei -80° C gelagert.

Tfb-I-Puffer

Kaliumacetat	0,30 g
Rubidiumchlorid	1,21 g
Calciumchlorid	0,15 g
Manganchlorid	1,00 g
Glycerol	15 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
pH-Wert auf 5,8 einstellen	

Tfb-II-Puffer

MOPS	0,12 g
Calciumchlorid	0,55 g
Rubidiumchlorid	0,06 g
Glycerol	7,5 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 50 ml

pH-Wert auf 6,5 einstellen

3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten wurde die Polymerase Kettenreaktion eingesetzt. Als erstes wurden synthetisch hergestellte Primer der Firma Metabion eingesetzt, die komplementär zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens waren und sich an diese anlagern konnten. Von den Primern ausgehend konnte die Taq-DNA Polymerase eine Kettenverlängerung durchführen. Als Template wurde chromosomale DNA oder cDNA von *A. fumigatus* eingesetzt. Ein Zyklus der Polymerase Kettenreaktion setzt sich aus einer Abfolge von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strangverlängerung zusammen. Ein Ansatz (50 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

<i>DreamTaq PCR Master Mix (2x)</i>	25 µl
Primer FOR	1,25 µl
Primer REV	1,25 µl
Template	1 µl
Nuklease-freies H ₂ O	21,5 µl

Die PCR-Reaktionen wurden im MastercyclerPro der Firma Eppendorf durchgeführt

First Delay	95° C, 1 min
Denaturierung	95° C, 30 s

Primer-Anlagerung	variabel, 30 s
Strangverlängerung	72°, 1 min/kb
Last Delay	72° C, 5 min

Die Temperatureinstellung der Primer-Anlagerung wurde mittels des Onlinetools *Tm Calculator* der Firma New England Biolabs ermittelt. Es wurden 30 Zyklen gefahren.

3.5 Fusions-PCR

Da zu Anfang des Projekts keine Möglichkeit bestand, cDNA für Klonierungen intronenthaltender Gene einzusetzen, wurde auf die Methode der Fusions-PCR zurückgegriffen.

Hierfür nötig waren insgesamt vier Primer. Die Primer der äußeren Randbereiche waren dabei komplementär mit den Randbereichen der gesamten genomischen Sequenz. Ein interner *forward-primer* war komplementär mit den letzten 21 Basen des vorderen DNA-Fragments, sowie zu den ersten 18 Basen des hinteren DNA-Fragments. Ein interner *reverse-primer* war komplementär mit den letzten 18 Basen des vorderen DNA-Fragments, sowie zu den ersten 21 Basen des hinteren DNA-Fragments. Die Amplifikation des vorderen DNA-Fragments wurde mit dem äußeren *forward-primer* und dem internen *reverse-primer* durchgeführt, die des hinteren DNA-Fragments mit dem internen *forward-primer* und dem äußeren *reverse-primer*. So entstand bei der Amplifikation des vorderen DNA-Fragments an dessen C-Terminus ein Bereich, der komplementär mit dem 5'-Ende des hinteren DNA-Fragments war. Nach Analyse über die Agarosegelelektrophorese wurden die beiden Fragmente gereinigt und die Konzentrationen im NanoDrop bestimmt.

Daraufhin erfolgte die eigentliche Fusions-PCR, welche in zwei Phasen eingeteilt werden kann. In der ersten, kürzeren, Phase wurden die beiden DNA-Fragmente (jeweils 100 ng) bei 98°C für 30 s initial denaturiert. Daraufhin erfolgten neun Wiederholungen der folgenden drei Schritte: 98°C für 10 s (Denaturierung), 30 s bei 72°C und schließlich eine Kettenverlängerung für 1 min bei 72°C.

Danach folgte Phase zwei, in der die äußeren Primer hinzugegeben und eine PCR

nach dem Standard-Protokoll durchgeführt wurde.

3.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die dabei verwendete Standard-Agarosekonzentration betrug 1% (w/v) (SERVA) in TAE-Puffer (1mM EDTA, 20mM Essigsäure, 40mM Tris). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Ladepuffer (*6x Loading Dye*, ThermoScientific), zur farblichen Markierung und Erhöhung der Dichte der Lösung, versetzt. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*, ThermoScientific) zur Längenbestimmung aufgetragen. Die beladenen Gele wurden in Kammern entsprechender Größe bei 140 Volt für 70 min mit TAE als Laufpuffer gefahren. Die DNA wurde anschließend in einem UV-Transilluminator (*UVP GelStudio*, Analytik Jena) sichtbar gemacht und fotografiert.

3.7 Aufreinigung der DNA

Für die Aufreinigung der DNA wurde das *Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) verwendet.

Eine *Wizard[®]SV Minicolumn* wurde in ein *2 ml Collection Tube* gesteckt. Zu der DNA wurde das gleiche Volumen *Membrane Binding Solution* hinzugegeben. Diese Mischung wurde auf die *Wizard[®]SV Minicolumn* gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1minütige Zentrifugation bei 16000 g. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 700 µl *Membrane Wash Solution* auf die *Wizard[®]SV Minicolumn* gegeben. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 16000 g für 1 min, nach welcher der Überstand abermals verworfen wurde. Es wurden 500 µl *Membrane Wash Solution* auf die *Wizard[®]SV Minicolumn* gegeben und anschließend wieder für 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die *Wizard[®]SV Minicolumn* bei 16000 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die *Wizard[®]SV Minicolumn* in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und es wurden 50 µl Nuklease-freies Wasser hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei

Raumtemperatur für eine Minute. Im Anschluss wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß mit der darin enthaltenen *Wizard[®] SV Minicolumn* für 1 min bei 16000 g zentrifugiert und die *Wizard[®] SV Minicolumn* anschließend verworfen. Die gereinigte DNA wurde anschließend bei -20° C gelagert.

3.8 Schneiden des gereinigten Gens

Schnittenzyme und die dazu passenden Puffer stammten von der Firma ThermoScientific.

Ein Ansatz (50 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

Gereinigtes PCR-Produkt bzw. Vektor	15 µl
Restriktionsenzym	2 µl
Entsprechender Puffer	5 µl
Nuklease-freies Wasser	28 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37° C inkubiert, am darauffolgenden Tag mit Hilfe des *Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) gereinigt und mit dem passenden 2. Schnittenzym und dem dazugehörigen Puffer unter gleichen Bedingungen verdaut. Nach diesem 2. Verdau wurde das nun zweimal geschnittene PCR-Produkt bzw. der Vektor erneut mittels *Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) gereinigt.

3.9 Ligation des Gens in einen Vektor

Das geschnittene Gen wurde in einen Expressionsvektor (pQE30, Qiagen), der mit denselben Schnittenzymen verdaut wurde, ligiert. Die hierfür benötigten Reagenzien stammen von der Firma ThermoScientific.

Dazu diente folgender Ansatz:

Gereinigtes, geschnittenes Gen	7 µl
Gereinigter, geschnittener Vektor	1,5 µl
ATP	0,4 µl

Buffer T4 DNA Ligase	0,4 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16° C oder für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.10 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Die bei -80° C gelagerten chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 μ l des Ligationansatzes in 100 μ l Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 90 sek im Heizblock (*Thermomixer comfort*, Eppendorf) bei 42° C und 300 rpm inkubiert. Darauf erfolgte eine Inkubation für 2 min auf Eis. Zu dem Ansatz wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und für 60 min bei 37° C im Heizblock (300 rpm) inkubiert. Vom Ansatz wurden anschließend 100 μ l auf eine LB-Amp-Platte gegeben und mit einem zuvor abgeflammt Spatel gleichmäßig verteilt. Die restlichen 900 μ l wurden bei Raumtemperatur für 2 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte eine Resuspendierung des Pellets mit 100 μ l frischem LB-Medium. Das resuspendierte Pellet wurde auf eine weitere LB-Amp-Platte gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden bei 37° C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

3.11 Überprüfung der Klone per PCR

Die aus der Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen entstandenen Klone wurden per PCR mit den dazu gehörigen Primern überprüft. Hierzu wurde pro Klon die Hälfte (25 μ l) eines normalerweise üblichen PCR-Ansatzes verwendet.

3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte mittels *PureYield™ Plasmid MidiPrep System* der Firma Promega.

Von Klonen, welche erfolgreich auf Expression getestet wurden, wurden 50 ml Kulturen in LB-Medium über Nacht bei 37° C aerob mit einer Ampicillinkonzentration von 1mM im Schüttelinkubator (140 rpm) in einem geeigneten Erlenmeyerkolben inkubiert. Diese 50 ml wurden am nächsten Tag in ein 50 ml Reaktionsgefäß umgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 5000 g im Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml *Cell Resuspension Solution* resuspendiert. Dazu wurden 3 ml *Cell Lysis Solution* hinzugegeben und einige Male geschwenkt bis sich die Lösungen vermischt haben. Daraufhin erfolgte eine 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine anschließende Zugabe von 5 ml *Neutralization Solution*. Damit sich die Lösungen gut vermischen, wurde das Reaktionsgefäß einige Male geschwenkt und danach für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (10000 g). Eine *Lysate Clearing Column* wurde auf eine *DNA Binding Column* gesteckt und diese Kombination wurde auf eine Vakuumpumpe (Promega, VacMan) gesetzt. Der Überstand der zentrifugierten Probe wurde vorsichtig in die *Lysate Clearing Column* gegeben und mittels Vakuum durch die Membranen gezogen. Die *Lysate Clearing Column* wurde anschließend abgenommen und verworfen. Es wurden 20 ml *Column Wash Solution* in die *DNA Binding Column* gegeben und wieder mittels Vakuum durch die Membran gezogen. Die Säule wurde daraufhin von der Vakuumpumpe abgenommen und in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Schließlich wurden 600 µl H₂O_{dest.} (steril) auf die *DNA Binding Column* gegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 min bei 3200 g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Filtrat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, am NanoDrop vermessen und anschließend bei -20° C eingefroren.

3.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (www.eurofinsgenomic.eu), hierfür musste die Plasmid-DNA auf 80-100 ng/µl eingestellt werden. Folgender Ansatz wurde eingeschickt:

Primer (1:5 vorverdünnt) 1,25 µl

Plasmid-DNA 5 µl

Nuklease-freies Wasser 3,75 µl

3.14 Sequenzanalysen und Datenbanken

Die Sequenzierungen von DNA-Fragmenten erfolgten über den *GATC Service* der Firma Eurofins Genomics. Die schematische Darstellung von Plasmidsequenzen erfolgte mithilfe der Programme *SeqBuilder Pro* der Firma DNASTAR und *Chromas* (Version 2.6.5) der Firma Technelysium.

Sequenz-Alignments wurden mithilfe des Onlinetools *Multiple Sequence-Alignment – Clustal Omega* des European Bioinformatics Institute erstellt (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Die Markierungung lauten wie folgt:

- . ähnliche Aminosäure
- : sehr ähnliche Aminosäure
- * identische Aminosäure

Vorhersagen über mögliche Expressionsprobleme rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgten über den *graphical codon usage analyser* (<http://gcu.schoedl.de/>). Es wurde die *Aspergillus* Sequenz mit der *codon usage* Tabelle von *E. coli* verglichen, um Codons zu identifizieren, die in *E. coli* zu Expressionsprobleme führen können. Putative problematische Codons sind grau wiedergegeben. Expressionsprobleme sind dann zu erwarten, wenn zwei oder mehr solcher Codons aufeinanderfolgen.

Die Benennung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine sowie der ihnen zugehörigen Gene basiert auf der Nomenklatur der *Aspergillus Genome Database* (AspGD) (<http://www.aspergillusgenome.org/>).

4. Proteinchemische Methoden

4.1 Herstellung von Induktionskulturen

Klone, welche laut Polymerase Kettenreaktion die richtige Größe hatten, wurden mittels Induktionskulturen auf Expression getestet. Um die rekombinanten His₆-

Proteine in *E. coli* zu exprimieren, musste der Regulationsmechanismus des lac-Repressors des Vektors überwunden werden. Hierfür diente die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalaktosidase (IPTG), welches an das lac-Repressor-Protein bindet und somit inaktiviert. Dadurch ist die Transkription des klonierten Gens möglich. Für die Herstellung kleiner Induktionskulturen wurden *E. coli* in 3 ml LB-Medium mit einer Ampicillin - Konzentration von 1mM über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator (140 rpm) angezogen. Am nächsten Tag erfolgte das Umsetzen eines Milliliters der über Nacht bebrüteten Kultur in 3 ml LB-Medium, welches eine Endkonzentration von 1 mM Ampicillin und eine Endkonzentration von 1 mM IPTG enthielt. Dabei wurde zu Kontrollzwecken jeweils eine Kultur zusätzlich ohne IPTG parallel angesetzt. Nach 4stündiger Inkubation, aerob, bei 37° C und unter schütteln (180 rpm) wurden 1,5 ml dieser Kulturen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf überführt und bei Raumtemperatur für 5 min und 14800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 150 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Der Probenpuffer dient der Erhöhung der Dichte, damit die Proben in die Taschen des SDS-Gels absinken, sowie zur Denaturierung der Proteine und der farblichen Kennzeichnung während der Wanderung durch das Gel. Danach wurden die Proben für 5 min in einem Heizblock mit 94° C und 300 rpm geschüttelt, anschließend bei Raumtemperatur mit 15800 g für 5 Minuten zentrifugiert und hinterher im SDS-Gel aufgetrennt.

2x Laemmli-Probenpuffer

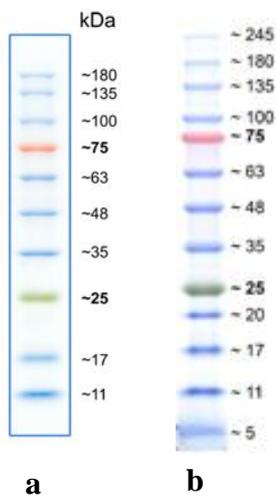
500 mM Tris-Puffer (pH 6,8)	10 ml
Glycerin	10 ml
SDS (10%)	5 ml
Bromphenolblau	10 mg
β -Mercaptoethanol	1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 10 ml

4.2 Eindimensionale SDS-PAGE

Für die Elektrophorese wurde das Bio-RAD MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY

Elektrophoresesystem und Glasplatten mit fixen Spacern (1 mm) für Minigel und Minigel Twin der Firma Biometra verwendet. Als Puffer diente das Puffersystem nach Laemmli. Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die anionischen Natriumdodecylsulfat-Moleküle (SDS) lagern sich proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide an diese, welche zuvor durch Hitzeeinwirkung denaturiert wurden. Daher ist eine Auftrennung im elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht durch das netzartige Polyacrylamidgel möglich. Dafür wurde zwischen zwei fixierten Glasplatten zuerst das Trenngel gegossen und mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser abgeschüttet und das Sammelgel gegossen. Dieses besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel und ermöglicht so eine Fokussierung der Probe. Die Proteine trennen sich erst durch den Eintritt ins Trenngel nach dem Molekulargewicht auf. In das Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, wodurch sich die Taschen, in welche die Proben aufgetragen wurden, ausbilden konnten. Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer, die mit SDS-Puffer befüllt war, gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für circa 60 Minuten. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2xLaemmli-Probenpuffer verdünnt und für 5 Minuten bei 94° C erhitzt. Vor dem Eingeben in die Taschen des Gels wurden die Proben bei Raumtemperatur bei 148000 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Als Marker wurden der *SERVA Triple Color Protein Standard II*, sowie der *SERVA Triple Color Protein Standard III* der Firma Serva verwendet.



Darstellung der Molekulargewichtsstandards *Triple Color Protein Standard II* (a) und *Standard III* (b) (rechts sind die Molekulargewichte in kDa angegeben)

Trenngel (Rezept für 2 Gele)

T*	12 %	15 %
H ₂ O	5,1 ml	3,6 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml
30 % Acrylamid	6,0 ml	7,5 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl
25 % APS**	20 µl	20 µl

Tabelle 3: Inhaltsstoffe des Trenngels

Sammelgel (Rezeptur für 2 Gele)

H ₂ O	2,9 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml
30 % Acrylamid	1,85 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl
TEMED	10 µl
25 % APS**	10 µl

Tabelle 4: Inhaltsstoffe des Sammelgels

* = Gehalt an Acrylamid und Bisacrylamid im fertigen Gel

** = Ammoniumpersulfat

10x SDS-Laufpuffer

SDS 10 g

Tris 30,3 g

Glycin	144 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Die Proteine müssen nach der Elektrophorese mittels Färbung sichtbar gemacht werden. Sie lagern sich an Farbstoffe an und werden als gefärbte Komplexe detektiert. Zur Färbung wurde das *Coomassie*® *Brilliant Blue R250* der Firma Serva genommen. Dafür wurden die Gele direkt im Anschluss an die Elektrophorese in die Coomassie-Färbelösung gegeben und für mindestens 2 Stunden auf einem Taumler unter langsamen Schwenken inkubiert. Die Entfärbung erfolgte im Anschluss für mindestens eine Stunde in einer Entfärbelösung, für optimale Kontraste sorgte eine Inkubation des Gels über Nacht in destilliertem Wasser.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie	200 mg
Isopropanol	65 ml
Eisessig	25 ml
H ₂ O _{dest.}	150 ml

Entfärbelösung

Eisessig	100 ml
Methanol	400 ml
H ₂ O _{dest.}	500 ml

4.3 Western Blot

Für die Western Blots wurde die *Semidry* Methode mit einem kontinuierlichem Puffersystem angewendet und der *Fastblot*TM *Semi-Dry Blotter* der Firma Biometra verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein alkalische Phosphatase konjugierter polyklonaler anti-Maus-IgG+IgM-Antikörper (Dianova) verwendet.

Das Elektroblothing ist eine Methode zum Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose. Der schnelle und homogene Transfer von Proteinen erfolgt zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden. Zur Vorbereitung wurden insgesamt 4 Lagen 1,2 mm dickes Blottingpapier (Whatman GB005) auf die passende Größe zugeschnitten und für 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Ebenso wurde die Nitrocellulosemembran, auf welche der Transfer erfolgen sollte, passend zugeschnitten und zum Blottingpapier in den Blotpuffer gegeben und dort für 5 Minuten belassen. Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt. Zwei Lagen des in Blotpuffer getränkten Blottingpapiers wurden auf die Anode, welche die Elektrode am Gerätekorpus ist, gelegt. Die Nitrocellulosemembran kam auf diese zwei Lagen und wurde vorsichtig glattgestrichen, um Luftblasen zu entfernen. Darauf wurde das Elektrophoresegel gelegt und ebenfalls vorsichtig glattgestrichen. Anschließend wurden die anderen beiden Lagen Blottingpapier aufgelegt und der Deckel, welcher die Kathode ist, aufgesetzt. Geblottet wurde bei 50 V 2,5 Stunden lang.

Der Blot wurde anschließend für eine halbe Stunde in 1,5 prozentiger BSA-Absättigungslösung geblockt und anschließend über Nacht im Primärantikörper auf einem Taumler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBS-T wurde der Blot in den zweiten Antikörper (anti-Maus-IgG+IgM, 1:1000) für circa 1 Stunde gegeben. Im Anschluss erfolgte ein weiteres dreimaliges Waschen in TBS-T. Um den pH-Wert auf 10 anzuheben, wurde der Blot für wenige Sekunden in Glycinpuffer geschwenkt und anschließend mit der BCIP-Färbelösung gefärbt. Dieser Schritt dauerte zwischen 10 sec und 25 min.

Blotpuffer

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	300 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

25xTBS

Tris	60,5 g
NaCl	199,75 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

TBS-T

25xTBS	40 ml
Tween20	1 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

BSA-Absättigungslösung

BSA	1,5 mg
25xTBS	4 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

Glycin 1M

Glycin	7,51 g
H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml

pH-Wert auf 10,0 einstellen

Glycin-Puffer

Glycin 1M	100 ml
MgCl ₂ 1M	1 ml
ZnCl ₂ (250mM)	4 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

BCIP-Färbelösung

1 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in Glycinpuffer lösen

4.4 Aufschluss der Bakterien

Für den Aufschluss und die anschließende Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurden jeweils 4 Erlenmeyerkolben mit je 50 ml LB-Medium, darin enthalten Ampicillin mit einer Konzentration von 1mM, mit den entsprechend transformierten *E. coli*-Stämmen angesetzt. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37° C, aerob und unter Schütteln (140 rpm) bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurde jede 50 ml-Kultur in je einen 2 Liter Erlenmeyerkolben umgesetzt, welcher bereits 500 ml LB-Medium, mit einer Ampicillin-Endkonzentration von 1 mM, und einer IPTG-Endkonzentration von 1 mM enthielt. Nach einer vierstündigen Inkubation unter den gleichen Bedingungen wurden die Kulturen in 50 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und für 20 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden mit insgesamt 20 ml denaturierendem Wasch- und Extraktionspuffer resuspendiert, in ein einzelnes 50 ml Reaktionsgefäß umgefüllt und bei -20° C eingefroren. Um den Aufschluss zu erleichtern, wurden die Proben in den darauffolgenden 2 bis 3 Tagen mehrmals bei 50°C aufgetaut und anschließend erneut bei -20° C eingefroren. Schließlich wurde die Probe für 20 min bei 15000 g im Festwinkelrotor zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden in der SDS-PAGE analysiert. Die Fraktion, welche das rekombinante Protein enthielt, wurde anschließend steril durch einen 0,2 µl Filter filtriert und im Kühlschrank zur Aufreinigung am darauffolgenden Tag gelagert.

Denaturierender Wasch- und Extraktionspuffer (4 M Harnstoff)

Na₂HPO₄ 4,45 g

NaCl 8,76 g

Harnstoff 240,24 g

H₂O_{dest.} ad 1000 ml

pH-Wert auf 7,0 einstellen

4.5 Aufreinigung der Proteine

Die Aufreinigung der Probe erfolgte über 1 ml *HisTALON™ Gravity Columns* der Firma TaKaRa.

Die Matrix der *HisTALON™ Gravity Columns* enthält Kobalt-Ionen, an welche die Polyhistidine der rekombinanten Proteine über einen Chelatkomplex binden und sich anschließend über Imidazol wieder herauslösen lassen. Die Reinigung über die *HisTALON™ Gravity Columns* erfolgte über unterschiedliche aufeinanderfolgende denaturierende Puffer mit einer Harnstoffkonzentration von 4 M. Zu beachten war hierbei, dass die Matrix der Säule nicht trocken laufen durfte und daher rechtzeitig der entsprechende Puffer nachgegeben werden musste. Die an die Säule angeschlossene Pumpe (*Peristaltic Pump, PP1080*, VWR) arbeitete zu jeder Zeit auf langsamster Stufe, was einer Durchtropfgeschwindigkeit von circa 0,7 ml/min entsprach. Als erstes wurde die Säule austropfen gelassen. Anschließend wurden 5 ml steriles Wasser auf die Säule gegeben. Danach folgte eine Zugabe von 5 ml *Binding Buffer I*. Anschließend wurde die Probe 3 Mal durchlaufen gelassen, dieser Durchlauf wurde im Kühlschrank gelagert, die Konzentration bestimmt und ein Teil im SDS-PAGE-Gel analysiert. Nach Durchlauf der Probe wurden 2 ml *Binding Buffer I* auf die Säule gegeben. Danach erfolgte der eigentliche Waschschrift mit insgesamt 65 ml Waschpuffer, welcher 1% Triton X114 enthielt, um mögliches LPS zu eliminieren. Im Anschluss wurden 20 ml *Binding Buffer II*, mit einer Konzentration von 20 mM Imidazol, hinzugegeben. Die ersten 5 ml wurden in 1 ml Fraktionen aufgefangen, die Protein-Konzentrationen gemessen und ein Teil im SDS-PAGE-Gel analysiert. Diese geringe Menge Imidazol sollte nur schwach an die Matrix gebundene, nicht-rekombinante Proteine herauslösen, um sicherzustellen, dass bei der darauffolgenden Zugabe von 5 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) nur noch gereinigtes rekombinantes Protein ausgewaschen wurde. Die Elutionen wurden in 1 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, die Konzentrationen wurden bestimmt und ein Teil im SDS-PAGE-Gel analysiert.

Binding Buffer I

Harnstoff	120,12 g
NaCl	14,61 g
Na ₂ HPO ₄	1,78 g
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen

Binding Buffer II (20 mM Imidazol)

Harnstoff	120,12 g
NaCl	14,61 g
Na ₂ HPO ₄	1,78 g
Imidazol	0,68 g
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen

Waschpuffer

Harnstoff	120,12 g
NaCl	14,61 g
Na ₂ HPO ₄	1,78 g
Triton X114	5 ml
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen

Elutionspuffer (250 mM Imidazol)

Harnstoff	120,12 g
-----------	----------

NaCl	14,61 g
Na ₂ HPO ₄	1,78 g
Imidazol	13,51 g
H ₂ O _{dest.}	ad 500 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen

Das destillierte Wasser, das verwendet wurde, war LPS-freies *Ampuwa*® Wasser für Injektionszwecke der Firma Fresenius Kabi. Die verwendeten Erlenmeyerkolben und sämtliche für die Herstellung der Puffer benötigten Utensilien wurden für 16 Stunden bei 180° C sterilisiert. Diese Behandlung führt auch zur Zerstörung von LPS-Resten in den Glasgefäßen.

4.6 Reinigung der Proteine mit Hilfe der Endotoxinsäule

Für die LPS-Entfernung aus der Probe nach erfolgter Reinigung über die Talonsäule wurden *Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Wash Columns* der Firma ThermoScientific verwendet.

Die Säule besteht aus einem porösen Zellulosekern, an den Polylysinketten kovalent gebunden sind. Die Oberflächen der Polylysinketten sind so verändert, dass sie eine hohe Affinität zu LPS besitzen und der Endotoxingehalt dadurch um 99% gesenkt werden soll. Dafür musste zuerst der Verschluss der Säule entfernt werden und anschließend die Säule in ein 15 ml Falcon gegeben werden. Danach erfolgte eine 1minütige Zentrifugation bei 500 g, der Überstand wurde verworfen. Es wurden 3,5 ml Regeneration Buffer auf die Säule gegeben und gemischt. Darauf folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule für 1 Minute bei 500 g zentrifugiert, der Überstand wurde abermals verworfen und die Matrix der Säule nach Zugabe von 3,5 ml 2 M NaCl aufgewirbelt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute und 500 g. Nach Verwerfen des Überstands wurden 3,5 ml LPS-freies Wasser hinzugegeben und vermischt. Daraufhin erfolgte erneut eine Zentrifugation für 1 Minute bei 500 g. Der Überstand wurde verworfen, auf die Säule wurden 3,5 ml *Endotoxin Free Buffer* gegeben und anschließend vermischt. Daraufhin wurde die

Säule für 1 Minute bei 500 g zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen und der Waschgang mit *Endotoxin Free Buffer* und anschließender Zentrifugation mit Verwerfung des Überstands noch weitere 2 Mal wiederholt. Danach erfolgte der Auftrag der zu reinigenden Probe und einer Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Die Säule wurde anschließend für 1 Minute bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgefangen, in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und über SDS-PAGE analysiert.

Regeneration Buffer

0,2 N BaOH in 95 % Ethanol

Endotoxin Free Buffer

25 mM Na₂HPO₄

pH-Wert auf 7,0 einstellen

4.7 Dialyse der gereinigten Proteine

Für die Dialyse wurden *Slide-A-Lyzer®10K Dialysis Cassettes* der Firma ThermoScientific verwendet

Für die weitere Verwendung der gereinigten Proteine mussten diese aus dem 4 M Harnstoff-Puffersystem in einen 1 M Harnstoff-Puffer überführt werden. Dies erfolgte für 4 Stunden bei 4°C.

1 M Harnstoffpuffer

Harnstoff 60,06 g

NaCl 29,22 g

Na₂HPO₄ 3,56 g

H₂O_{dest.} ad 1000 ml

pH-Wert auf 7,4 einstellen

IV. ERGEBNISSE

1. Auswahl und Einteilung der Proteine

Bei der Auswahl der Proteine galt es zu berücksichtigen, dass sie sich für eine Klonierung in *E. coli* eignen. Daher durften die Proteine nicht viel größer als 40 kDa sein und zu Anfang des Projektes keine Introns enthalten. Wenn Proteine eine Größe von 40 kDa überschritten, wurden nur Fragmente des Gens kloniert. Daneben erfolgte eine Einteilung der Proteine in drei Hauptgruppen anhand der Lokalisation des jeweiligen Proteins: Sekretierte Proteine, Zellwandproteine und cytosolische Proteine. Ziel war es, aus jeder dieser Gruppen möglichst drei bis vier Vertreter herzustellen. Im weiteren Verlauf kam noch die Gruppe der Konidienproteine hinzu.

Im Laufe des Projektes entwickelte sich die Möglichkeit intronenthaltende Gene mittels Fusions-PCR herzustellen. Diese Methode wurde jedoch abgelegt, nachdem die Möglichkeit entstand, cDNA herzustellen und für die Amplifikation intronenthaltender Gene einzusetzen.

Die Herstellung wurde als positiv angesehen, wenn ein exprimierender Klon identifiziert werden konnte, da aus Zeitgründen nicht bei allen Proteinen eine Reinigung stattfinden konnte. Von 27 geplanten Antigenen gelang eine Herstellung von 19, aufgeführt in der folgenden Tabelle:

Antigen	Genbank-ID	Lokalisation	Herstellung
Aspf1/Mitogillin	Afu5g02330	sekretiert	erfolgreich
Aspf4	Afu2g03830	sekretiert	erfolgreich
Aspf13/Alp1	Afu2g12630	sekretiert	erfolgreich
CsnB	Afu4g01290	sekretiert	erfolgreich
Hly	Afu3g00590	sekretiert	erfolgreich
FG-GAP	Afu1g04130	sekretiert	erfolgreich
Aspf5/Mep1	Afu8g07080	sekretiert	negativ
Aspf7	Afu4g06670	sekretiert	negativ
Aspf10/Pep1	Afu5g13300	sekretiert	negativ
Aspergillopepsin	Afu7g01200	sekretiert	negativ
Aspf2	Afu4g09580	Zellwand	erfolgreich
Aspf9/Crf1	Afu1g16190	Zellwand	erfolgreich
Ecm33	Afu4g06820	Zellwand	erfolgreich
Gel1	Afu2g01170	Zellwand	erfolgreich

Cat1(N-term.)	Afu3g02270	Zellwand	erfolgreich
Aspf17/mp1	Afu4g03240	Zellwand	negativ
CspA	Afu3g08990	Zellwand	negativ
Aspf3/Pmp	Afu6g02280	cytosolisch	erfolgreich
Aspf6/MnSOD	Afu1g14550	cytosolisch	erfolgreich
Aspf8	Afu2g10100	cytosolisch	erfolgreich
Aspf11	Afu2g03720	cytosolisch	erfolgreich
Aspf22/EnoA	Afu6g06770	cytosolisch	erfolgreich
CipC	Afu5g09330	cytosolisch	erfolgreich
Aspf12/Hsp90	Afu5g04170	cytosolisch	negativ
Smt1	Afu3g09320	cytosolisch	negativ
Pst2	Afu1g02820	Konidienprotein	erfolgreich
CcpA	Afu1g13670	Konidienprotein	erfolgreich

Tabelle 5: Übersicht aller geplanten Antigene

Im folgenden Text werden die Ergebnisse für die einzelnen Proteine beschrieben

2. Erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte sekretierten Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf1/Mitogillin	Afu5g02330
Aspf4	Afu2g03830
Aspf13/Alp1	Afu2g12630
CsnB	Afu4g01290
Hly	Afu3g00590
FG-GAP	Afu1g04130

Tabelle 6: Liste aller erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine

2.1 Aspf1/Mitogillin (Afu5g02330)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	176 AS / 19,6 kDa
Signalsequenz	1-26
Größe des His ₆ -Proteins	20 kDa

Tabelle 7: Informationen zu Aspf1

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 4).

Das Gen besitzt eine Gesamtgröße von 583 bp. Da das erste Exon fast ausschließlich aus der Signalsequenz besteht, wurde der *forward-primer* so gewählt, dass das Fragment nur aus dem zweiten Exon bestehen sollte (Abb. 5). Dieses sollte eine Größe von 447 bp haben und konnte mit den in Tab. 8 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 54°C erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 6). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Alle der acht getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 447 bp (Abb. 7). Diese acht Klone wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass alle Klone eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 20 kDa zeigten (Abb. 8). Das rekombinante Protein wurde stark exprimiert.

Aspf1-BamHI-FOR	GCAGGATCCACCTGGACATGCATCAAC
Aspf1-HindIII-REV	GCAAAGCTTCTAATGAGAACACAGTCT

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf1-Konstrukt

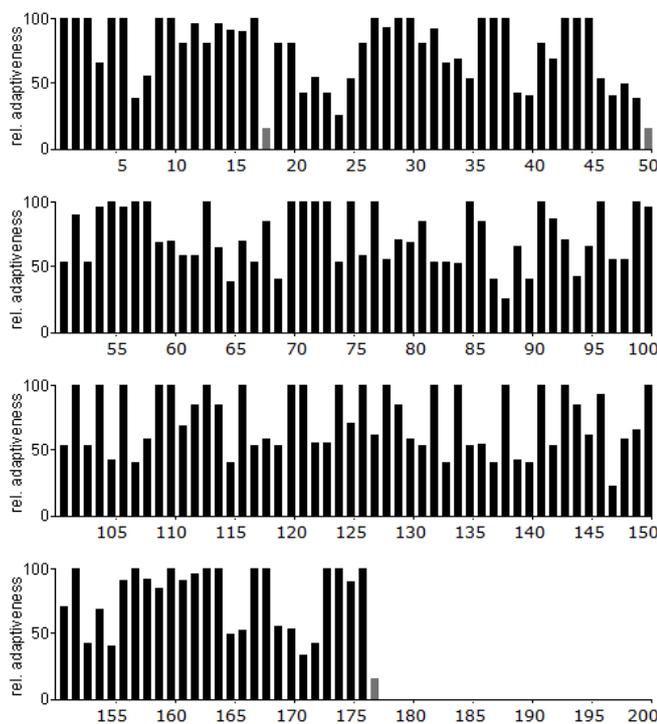


Abbildung 4: Analyse der Sequenz des Aspf1-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

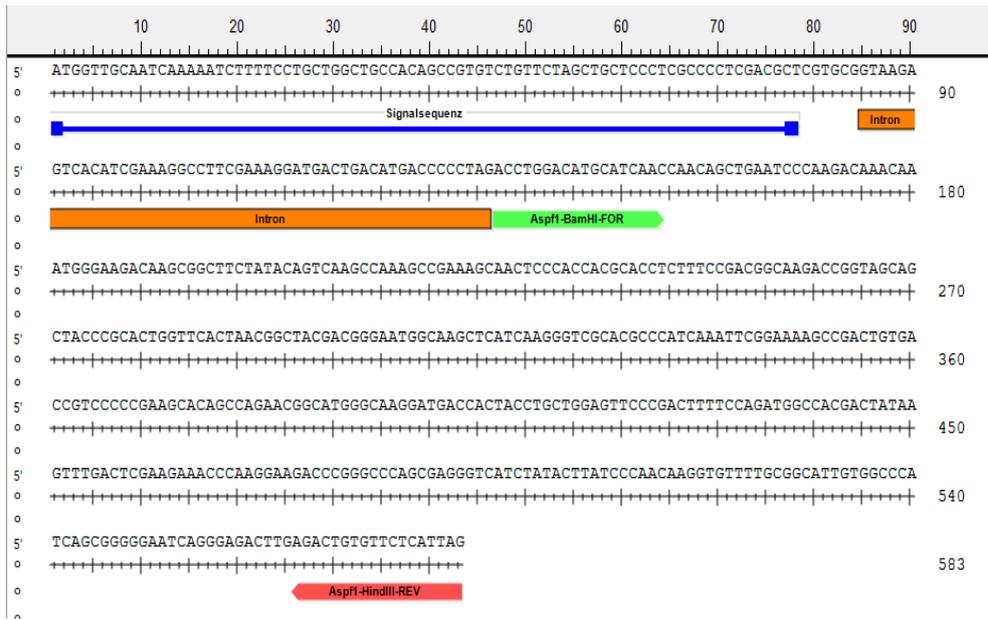


Abbildung 5: Genomische Sequenz des Asp1-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, das Intron orange. Der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt.

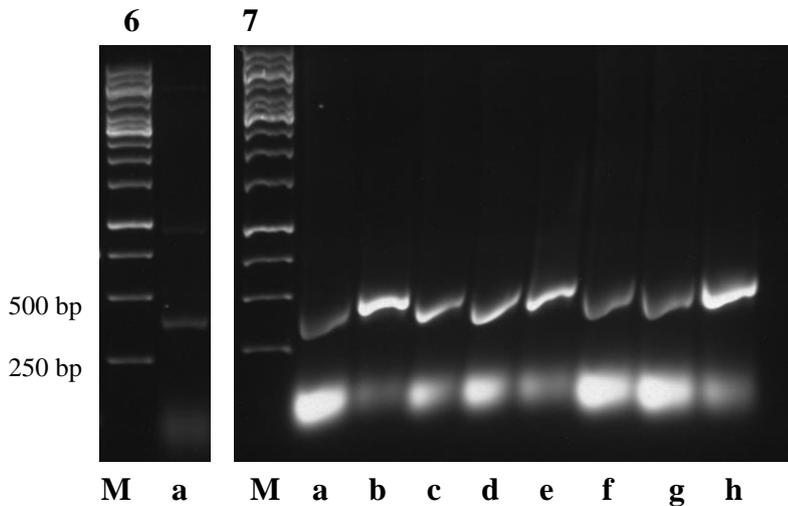


Abbildung 6: Amplifikat der PCR von Asp1, die Größe stimmt mit der erwarteten von 447 bp überein

Abbildung 7: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation entstandenen Asp1 Klonen im Agarosegel, alle der acht getesteten Klone zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 447 bp.

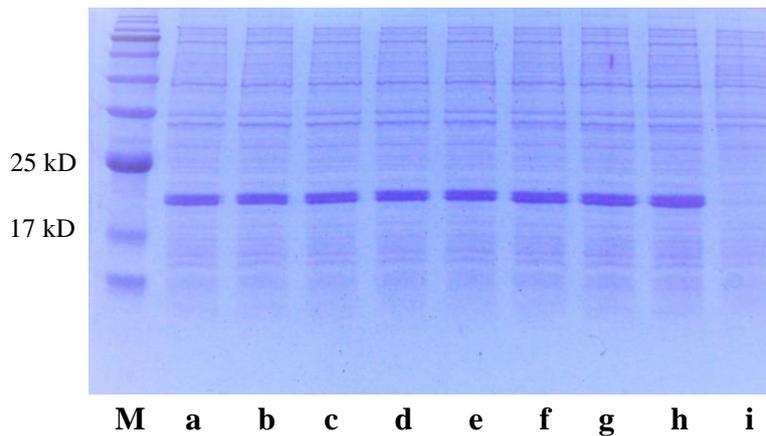


Abbildung 8: Coomassie-Gel der Aspfl Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten. Alle Klone (Spuren a-h) haben eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 20 kDa, was der erwarteten Größe entspricht. Bei der Kontrolle ohne IPTG ist keine induzierte Bande zu beobachten (Spur i)

Anschließend erfolgte eine Überprüfung mittels Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer*, bei der gezeigt werden konnte, dass das Aspfl-Gen erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte. Eine Gegebenüberstellung der Proteinsequenz aus der Datenbank und der aus der Plasmid-Sequenzierung abgeleiteten Proteinsequenz ist in Abb. 9 dargestellt. Es wurde zusätzlich ein Western Blot mit dem α -Mitogillin #129-45 Antikörper durchgeführt, der das Aspfl erfolgreich färbte (Abb. 10).

Bei der darauffolgenden Reinigung über die Talonsäule war der Großteil des Proteins bereits in den ersten beiden Elutionen aufzufinden. Bei der Analyse im SDS-PAGE war eine weitere Bande auf Höhe der Größe von ca. 50 kDa zu beobachten, dabei handelte es sich um ein Dimer (Abb. 11). Da im Coomassie-Gel zu sehen war, dass nicht alles Protein an die Säule gebunden hatte, wurde der Durchlauf der Probe ein weiteres Mal auf die Talonsäule aufgetragen und eluiert. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie im ersten Durchgang, so erfolgte die Elution mit dem größten Anteil an Protein in den ersten zwei Fraktionen. Im Durchlauf war nun kein Protein mehr zu finden (Abb. 12).

Für die späteren Tests mit T-Zellen mußte im letzten Schritt die Harnstoffkonzentration der Proben durch Dialyse auf 1M reduziert werden. Das rekombinante Aspfl konnte ohne große Verluste dialysiert werden und war auch in dem Puffer mit 1M Harnstoff noch gut löslich (Abb. 13). Nach Dialyse wurde

die LPS-Konzentration mit 3,95 EU/ml gemessen. Somit stand dieses Protein für den Einsatz im ELISpot Assay zur Verfügung.

```

Proteinseq.      -----HHHHHGSATWTCINQQLNPKTNKWEDKRLLYSQAKAESNS      41
Aspf1           MVAIKNLFLLAATAVSVLAAPSPLDARATWTCINQQLNPKTNKWEDKRLLYSQAKAESNS      60
                .. *****

Proteinseq.      HHAPLSDGKTGSSYPHWFTNGYDGNGLIKGRTPIKFGKADCDRPPKHSQNGMGKDDHYL      101
Aspf1           HHAPLSDGKTGSSYPHWFTNGYDGNGLIKGRTPIKFGKADCDRPPKHSQNGMGKDDHYL      120
                *****

Proteinseq.      LEFPTFPDGHDYKFDKSKPKEDPGPARVIYTYPNKVFCGIVAHQQRGNQGDRLRLCSH      157
Aspf1           LEFPTFPDGHDYKFDKSKPKEDPGPARVIYTYPNKVFCGIVAHQQRGNQGDRLRLCSH      176
                *****
    
```

Abbildung 9: Gegenüberstellung der Aspf1-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf1) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das His-tag ist grün gekennzeichnet, die Signalsequenz rot, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

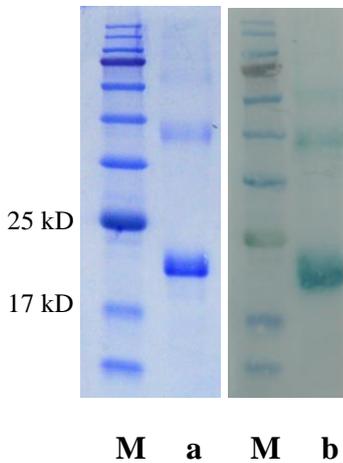


Abbildung 10: Coomassie-Gel und Western Blot von Aspf1. Spur a zeigt das rekombinante Aspf1, Spur b den Western Blot von His₆-Aspf1 mit dem monoklonalen α -Mitogillin Antikörper #129-45

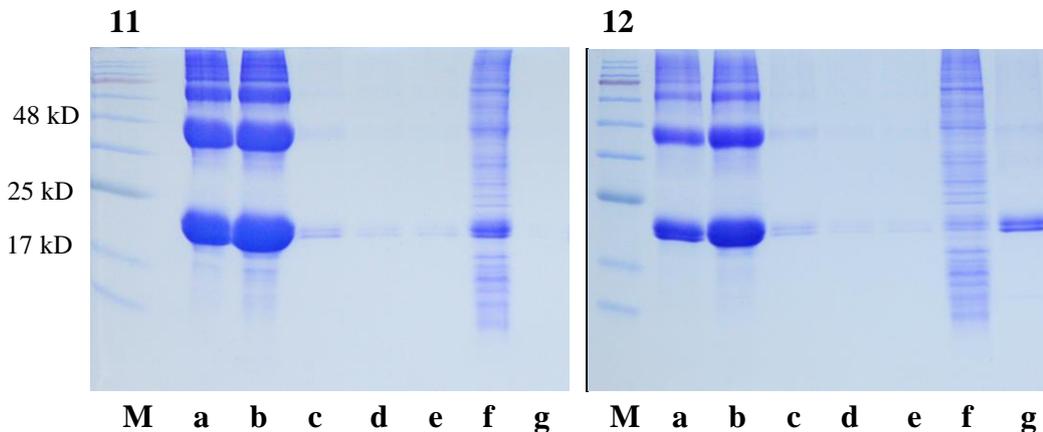


Abbildung 11: Talonreinigung von Aspf1, Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, der Durchlauf der Probe ist in Spur f zu sehen, Spur g zeigt die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule löste

Abbildung 12: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf1, die

Elutionen 1 bis 5 sind in den Spuren a-e zu sehen, Spur f zeigt den Durchlauf, in Spur g ist die Fraktion, die sich mit dem *Binding Buffer II* löste

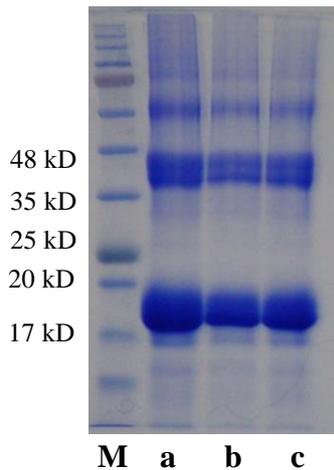


Abbildung 13: Dialyse von Aspf1, Aspf1 vor der Dialyse (a), nach der Dialyse (b), dialysiertes und zentrifugiertes Aspf1 (c)

2.2 Aspf4 (Afu2g03830)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	322AS / 34,1 kDa
Signalsequenz	1-20
Größe des His ₆ -Proteins	37 kDa

Tabelle 9: Informationen zu Aspf4

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 14).

Das Gen besitzt, einschließlich der Signalsequenz, eine Größe von 969 bp, ohne Signalsequenz besitzt es eine Größe von 897 bp (Abb. 15) und konnte, mit den in Tab. 10 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 59°C, erfolgreich amplifiziert werden. Diese PCR wurde mit chromosomaler DNA durchgeführt. Eine Bande mit der erwarteten Größe von 897 bp war im Agarosegel zu sehen (Abb. 16). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Drei der getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 897 bp (Abb. 17). Diese drei wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass alle eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 37 kDa hatten (Abb. 18). Das

Expressionslevel war als gut einzustufen.

Aspf4-BamHI-FOR	GCAGGATCCCACGAGCGCCGCCACCTCCAC
Aspf4-HindIII-REV	GCAAAGCTTCTACTCCTTGATGTCGAGGTT

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf4-Konstrukt

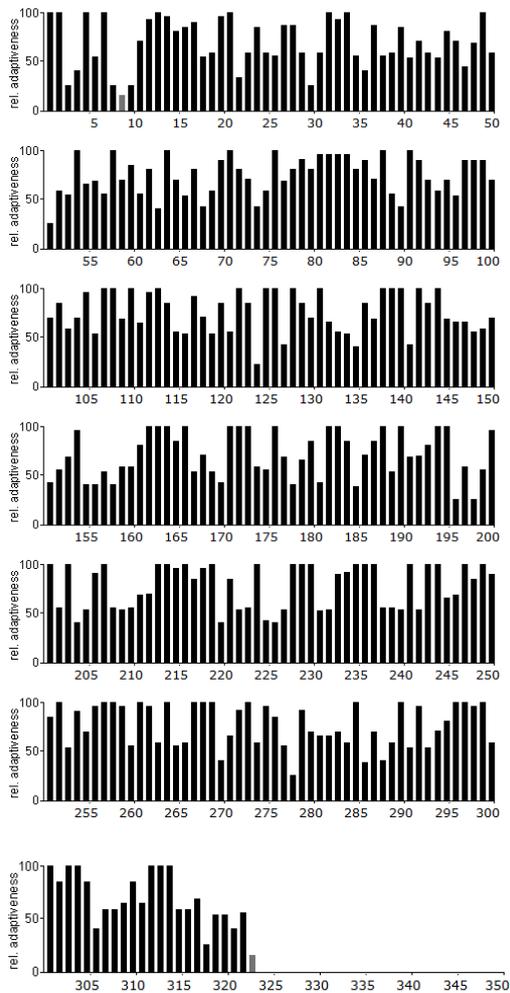


Abbildung 14: Analyse der Sequenz des Aspf4-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

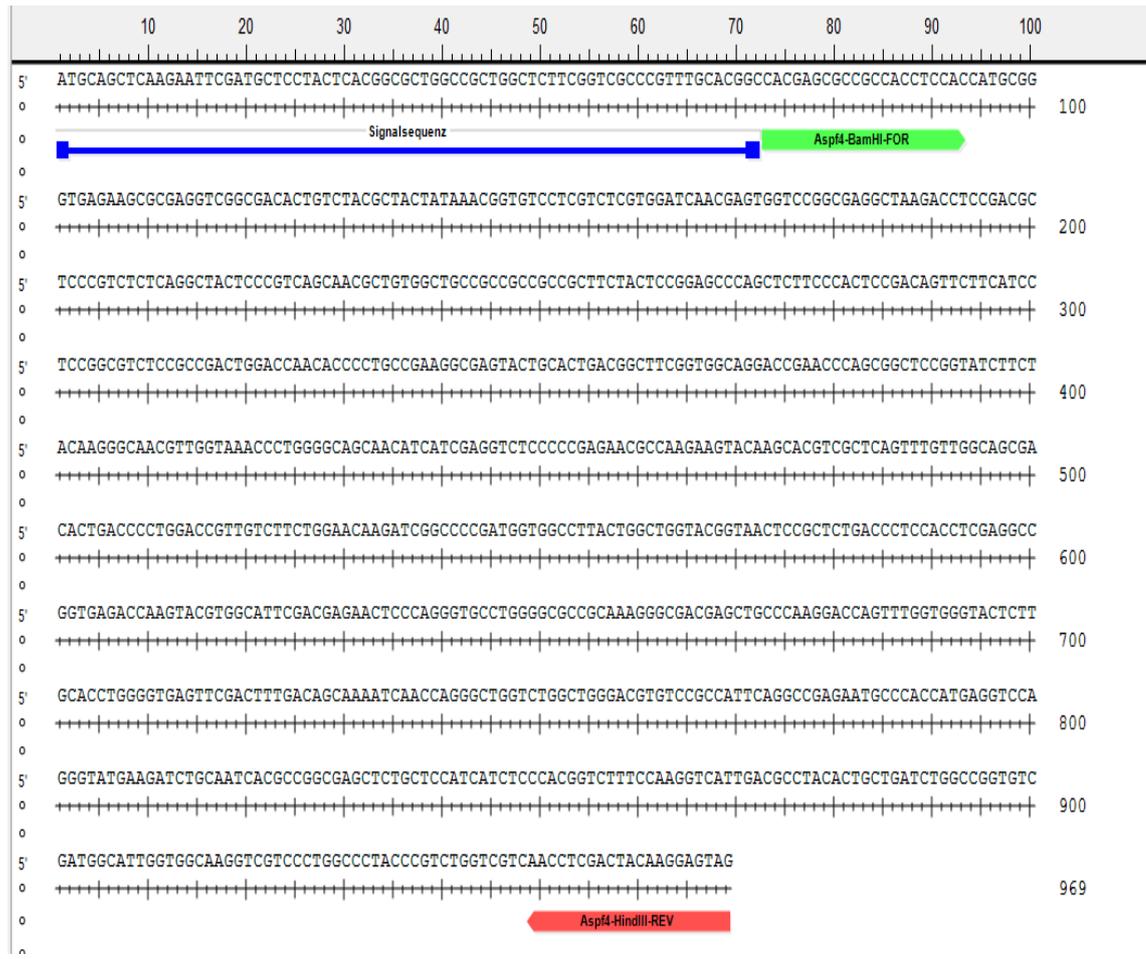


Abbildung 15: Genomische Sequenz des *Aspf4*-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

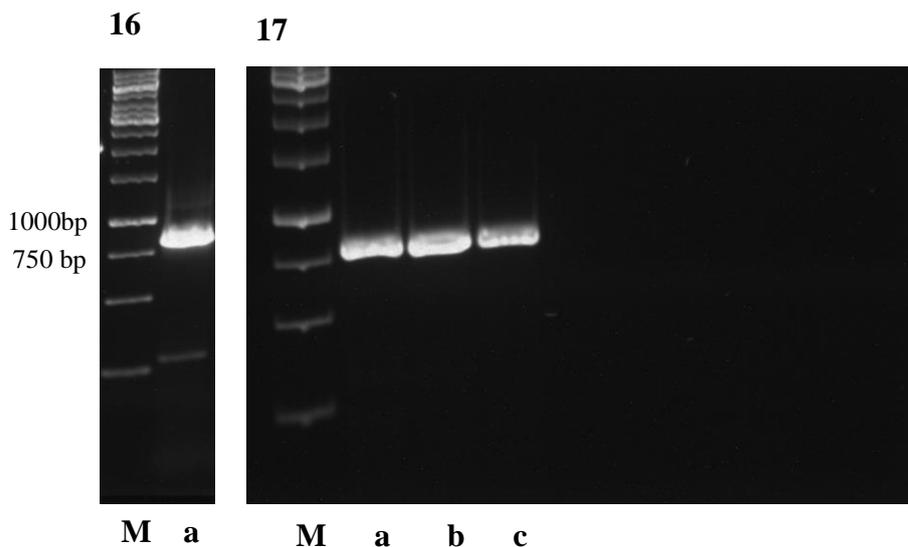


Abbildung 16: Amplifikat der PCR von *Aspf4*. Die Größe des Amplifikats stimmt mit der erwarteten Größe von 897 bp überein

Abbildung 17: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der

Transformation entstandenen Aspf4 Klone im Agarosegel, drei zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 897 bp (Spuren a-c)

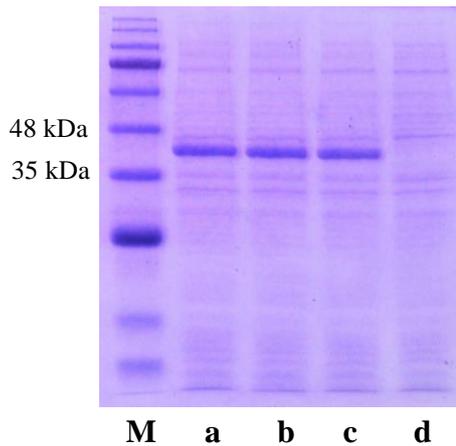


Abbildung 18 A: Coomassie-Gel der drei Aspf4 Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten. Alle drei zeigten bei der erwarteten Größe von 37 kDa eine induzierte Bande (Spuren a-c), in Spur d ist die Kontrolle ohne IPTG zu sehen

Anschließend erfolgte eine Überprüfung mittels Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer*, bei der gezeigt werden konnte, dass das gesamte Aspf4 erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 19). Zusätzlich wurde ein Western Blot mit dem spezifischen α Aspf4 - Antikörper N176 H8 durchgeführt, der das His₆-Aspf4 erfolgreich färbte (Abb. 18).

Daraufhin erfolgte die Reinigung des Proteins über die Talonsäule. Bei der Analyse im SDS-PAGE konnten Multimere von Aspf4 beobachtet werden (Abb. 20). In den Elutionen 1 und 2 konnte eine sehr hohe Konzentration von Aspf4 erreicht werden. Der Durchlauf zeigte, dass noch viel Protein in ihm enthalten war, deswegen wurde er erneut auf die Säule aufgetragen und eluiert. Es zeigte sich eine etwas gleichmäßigere Verteilung der Konzentrationen über die gesamten Elutionen (Abb. 21). Auch in diesem Durchlauf war anschließend noch sehr viel Protein vorhanden. Da jedoch bereits genug gereinigtes Protein gewonnen werden konnte, wurde zunächst auf einen dritten Durchgang verzichtet.

Nach dem Umpuffern auf 1 M Harnstoff ergab die LPS-Messung einen Wert von 0,45 EU/ml (Abb. 22). Auch bei späteren Reinigungen konnten Werte von < 1 EU/ml erreicht werden, somit stand dieses Protein für den Einsatz im ELISpot Assay und dem Vollblut-ELISA zur Verfügung.

Proteinseq. Aspf4	-----HHHHHHSRLHGHERRHLHHAGEKREVGDTVYATINGVLVSWINEWSG MQLKNSMLLLTALAAGSSVRLHGHERRHLHHAGEKREVGDTVYATINGVLVSWINEWSG :*****	48 60
Proteinseq. Aspf4	EAKTSDAPV SQATPVSNAVA AAAAAASTPEPSSSHSDSSSSSGVSADWTNTPAEGEYCTDG EAKTSDAPV SQATPVSNAVA AAAAAASTPEPSSSHSDSSSSSGVSADWTNTPAEGEYCTDG *****	108 120
Proteinseq. Aspf4	FGGRTEPSGSGIFYKGNVGPWGSNIIEVSPENAKKYKHVAQFVGS DTD PWT VVFWNKIG FGGRTEPSGSGIFYKGNVGPWGSNIIEVSPENAKKYKHVAQFVGS DTD PWT VVFWNKIG *****	168 180
Proteinseq. Aspf4	PDGGLTGWYNSAL TLHLEAGETKYVAFDENSQGA WGA AKGDEL PKDQFGGYSCTWGEFD PDGGLTGWYNSAL TLHLEAGETKYVAFDENSQGA WGA AKGDEL PKDQFGGYSCTWGEFD *****	228 240
Proteinseq. Aspf4	FDSKINQGWSGWDVSAIQAENAHHEVQGMKICNHAGELCSII SHGLSKVIDAYTADLAGV FDSKINQGWSGWDVSAIQAENAHHEVQGMKICNHAGELCSII SHGLSKVIDAYTADLAGV *****	288 300
Proteinseq. Aspf4	DGIGGKVVPGPTRLVVNLDYKE DGIGGKVVPGPTRLVVNLDYKE *****	310 322

Abbildung 18 B: Gegenüberstellung der Aspf4-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf4) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot. Das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

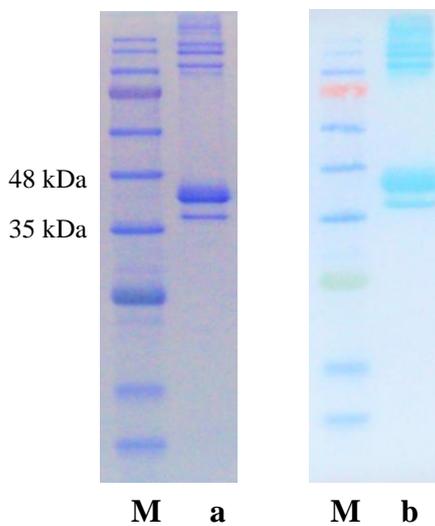


Abbildung 19: Coomassie-Gel und Western Blot von Aspf4. Spur a zeigt das rekombinante Aspf4, Spur b den Western Blot von Aspf4 mit dem spezifischen α Aspf4 - Antikörper N176 H8

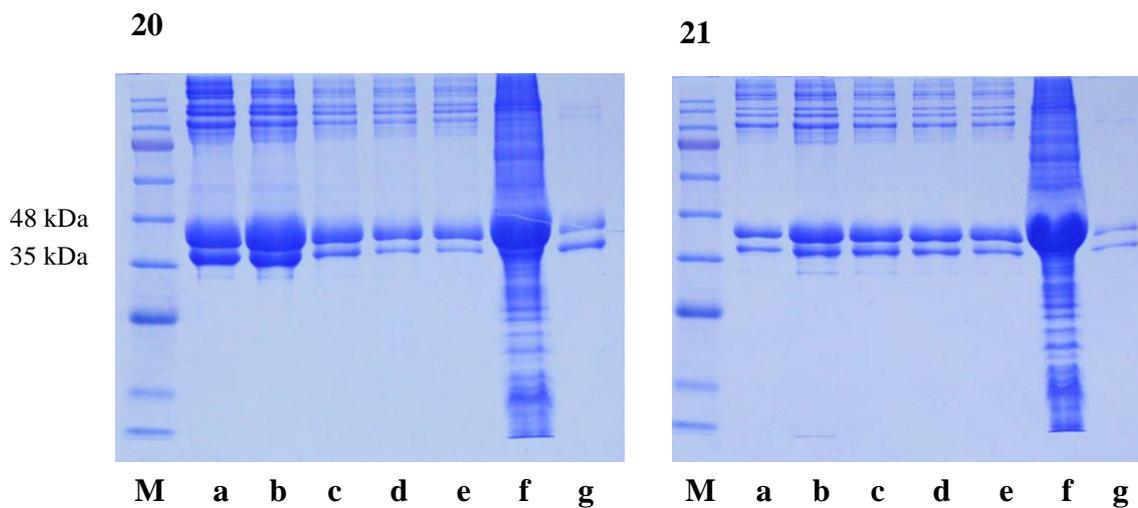


Abbildung 20: Talonreinigung von Aspf4. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer. Spur f zeigt den Durchlauf der Probe, Spur g die Fraktion, welche sich mit *Binding Buffer II* aus der Säule löste

Abbildung 21: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf4. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer. Spur f zeigt den Durchlauf der Probe, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* aus der Säule löste

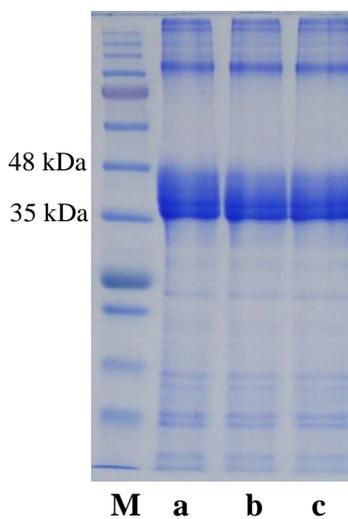


Abbildung 22: Dialyse von Aspf4, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

2.3 Aspf13 (Afu2g12630)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	152AS/17kDa
Signalsequenz	1-19
Größe des His ₆ -Proteins	17kDa

Tabelle 11: Informationen zu Aspf13

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 23).

Dieses Gen besitzt eine Größe von 459 bp, und sollte ohne den Teil, der für die Signalsequenz kodiert, kloniert werden (Abb. 24). So sollte dieses Gen eine Größe von 403 bp besitzen. Es konnte mit den in Tab. 12 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 57°C erfolgreich amplifiziert werden. Da dieses Gen kein Intron enthält, konnte diese PCR mit chromosomaler DNA durchgeführt werden. Eine Bande bei der erwarteten Größe von 403 bp war im Agarosegel zu sehen (Abb. 25). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Vier der getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 403 bp (Abb. 26). Diese vier wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass drei eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 17 kDa zeigten, wobei bei zwei Klonen ein etwas höheres Expressionslevel vorlag (Abb. 27).

Aspf13-FOR-BamHI	GTAGGATCCGCCCGACGCCAGAGAACGAG
Aspf13-REV-HindIII	GTAAAGCTTCTATACACCAGAGGCACAGTG

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf13-Konstrukt

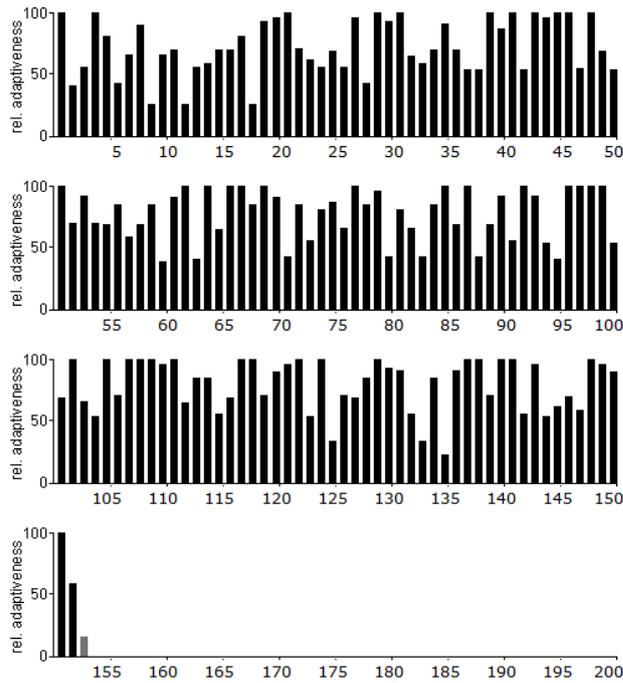


Abbildung 23: Analyse der Sequenz des Aspf13-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

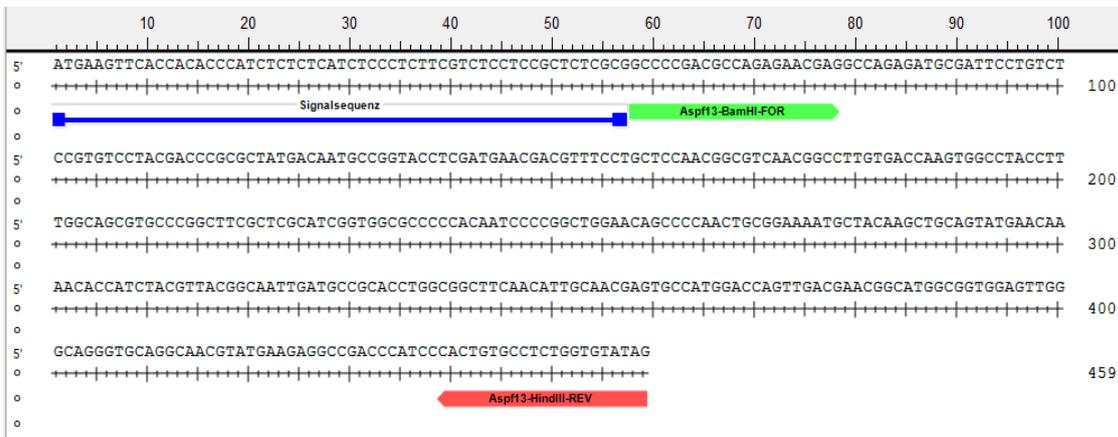


Abbildung 24: Genomische Sequenz des Aspf13-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

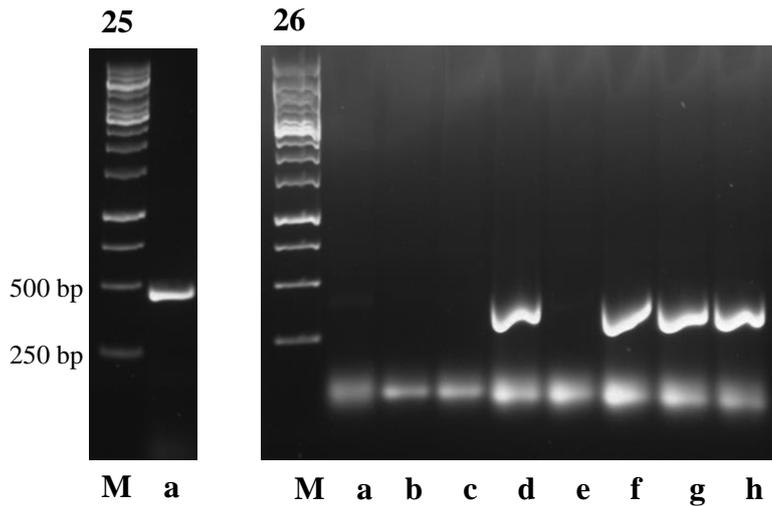


Abbildung 25: Amplifikat der PCR von AspF13. Spur a zeigt das Amplifikat, die Größe stimmt mit der erwarteten von 403 bp überein

Abbildung 26: Auftrennung der PCR-Prdoukte aus den bei der Transformation entstandenen AspF13 Klonen im Agarosegel, vier zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 403 bp (Spur d, Spuren f-h)

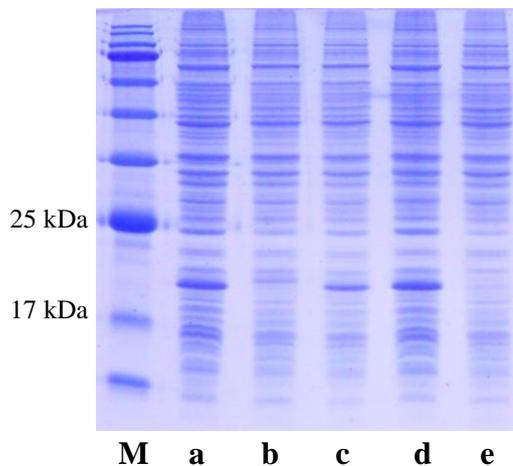


Abbildung 27: Coomassie-Gel der AspF13 Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten, drei (Spuren a,c,d) zeigen eine induzierte Bande bei der erwarteten Größe von 17 kDa, bei zweien ist diese deutlicher (Spuren a und d). Spur e zeigt die Kontrolle ohne IPTG

Eines der Expressionsplasmide mit dem höheren Expressionsniveau wurde im Anschluss mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Diese konnte bestätigen, dass das Gen erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 28).

Die Reinigung über die Talonsäule verlief positiv, es konnte ausreichend gereinigtes und konzentriertes AspF13 gewonnen werden, auch bei diesem Protein

war ein Multimer bei der Analyse im SDS-PAGE sichtbar. Auffällig war, dass im Lysat nur eine Bande auf Höhe von 17 kDa gesehen werden konnte, bei der Reinigung aber mehrere kleinere Banden erkennbar waren. Hierbei handelte es sich vermutlich um einen partiellen proteolytischen Abbau am C-Terminus (Abb. 29). Es wurde nur eine Aufreinigung durchgeführt, da im Coomassie-Gel zu erkennen war, dass bereits alles rekombinantes Protein aus dem Lysat an die Säulenmatrix gebunden und anschließend wieder gelöst werden konnte.

Die Probe wurde umgepuffert (Abb. 30), aber die Daten der LPS-Messung lagen am Ende dieser Arbeit noch nicht vor.

Proteinseq.	-----HHHHHGS	APTENEARDAI	PVSVSYDPRYDNAGTSMNDVSCSNGVNL	49		
Aspf13	MKFTTPI	SLISL	LVSSALAA	APTENEARDAI	PVSVSYDPRYDNAGTSMNDVSCSNGVNL	60
			:*****			
Proteinseq.	VTKWPTFGSVPGFARIGGAPTIPGWNSPNCGKCYKLQYEQNTIYVTAIDAAPGGFNIATS				109	
Aspf13	VTKWPTFGSVPGFARIGGAPTIPGWNSPNCGKCYKLQYEQNTIYVTAIDAAPGGFNIATS				120	

Proteinseq.	AMDQLTNGMAVELGRVQATYEEADPSHCASGV	140				
Aspf13	AMDQLTNGMAVELGRVQATYEEADPSHCASGV	150				

Abbildung 28: Gegenüberstellung der Aspf13-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf13) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.), die Signalsequenz wurde rot dargestellt, das His-tag grün. Das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

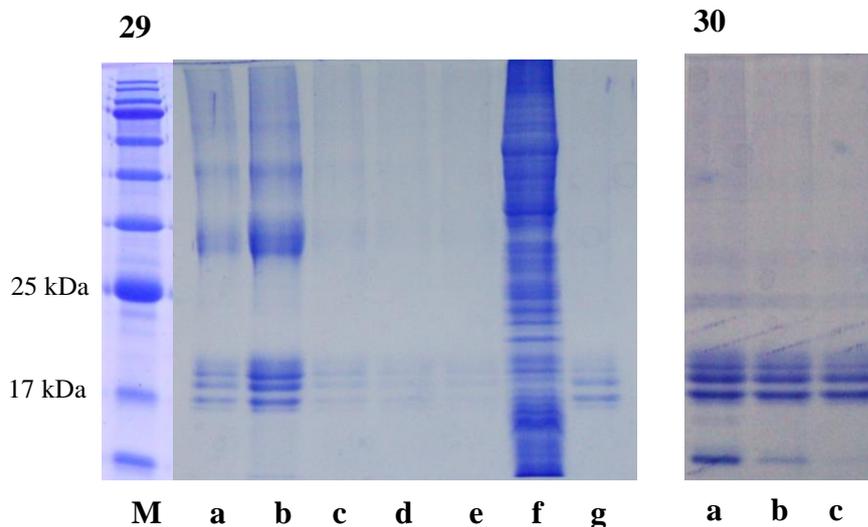


Abbildung 29: Talonreinigung von Aspf13. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer. Spur f zeigt den Durchlauf, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule löste

Abbildung 30: Dialyse von Aspf13, Spur a zeigt die Probe vor der Dialyse, Spur b hinterher, Spur c zeigt die dialysierte Probe nach der Zentrifugation

2.4 CsnB (Afu4g01290)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	238AS/27kDa
Signalsequenz	1-17
Größe des His ₆ -Proteins	27kDa

Tabelle 13: Informationen zu CsnB

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 31).

Das Gen besitzt, einschließlich der beiden Introns und dem Teil, der für die Signalsequenz kodiert, eine Größe von 866 bp. Das gewünschte DNA-Fragment sollte ohne den Teil, der für die Signalsequenz kodiert, amplifiziert werden und sollte, ohne Introns, eine Größe von 717 bp umfassen (Abb. 32) und konnte, mit den in Tab. 14 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 52°C, erfolgreich amplifiziert werden. Aufgrund der Introns wurde cDNA als Template verwendet. Parallel wurde ein Ansatz mit chromosomaler DNA durchgeführt. Im Agarosegel konnte eine Bande mit der erwarteten Größe von 717 bp sichtbar gemacht werden (Abb. 33). Das von der cDNA amplifizierte PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft, dabei konnten alle acht als positiv identifiziert werden (Abb. 34). Die anschließende Überprüfung auf Expression lieferte drei Klone mit jeweils einer induzierten Bande bei der erwarteten Größe von 27 kDa (Abb. 35).

CsnB-BamHI-FOR	GTAGGATCCTATAATTTGCCCAACAAC
CsnB-HindIII-REV	GTAAAGCTTCTATGCTTTCAAACCAGC

Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide für das CsnB-Konstrukt

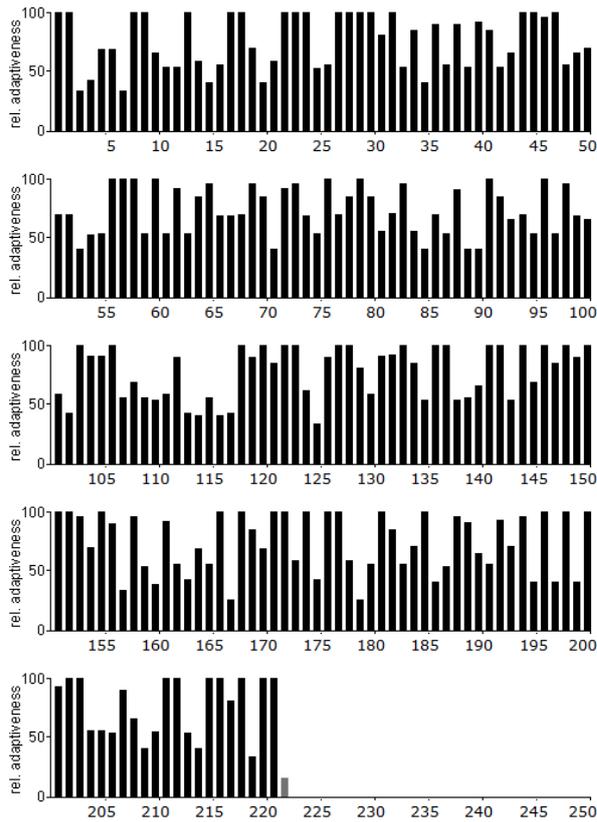


Abbildung 31: Analyse der Sequenz des CsnB-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

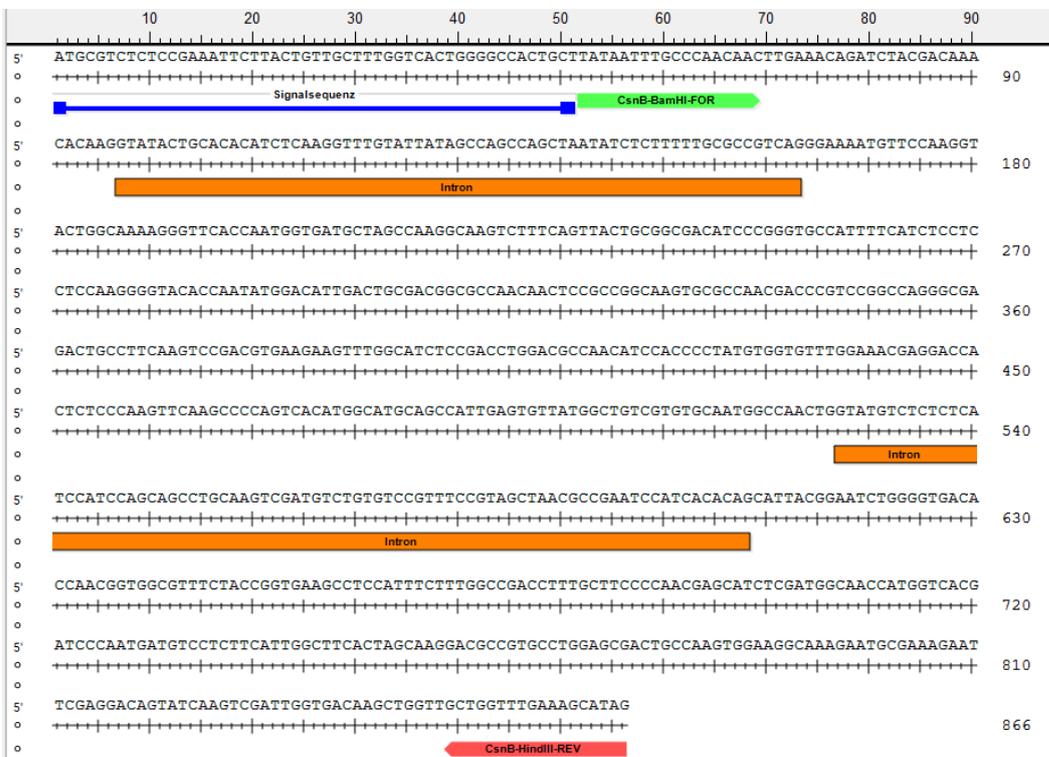


Abbildung 32: Genomische Sequenz des CsnB-Gens, die Introns sind orange dargestellt, die Signalsequenz blau, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

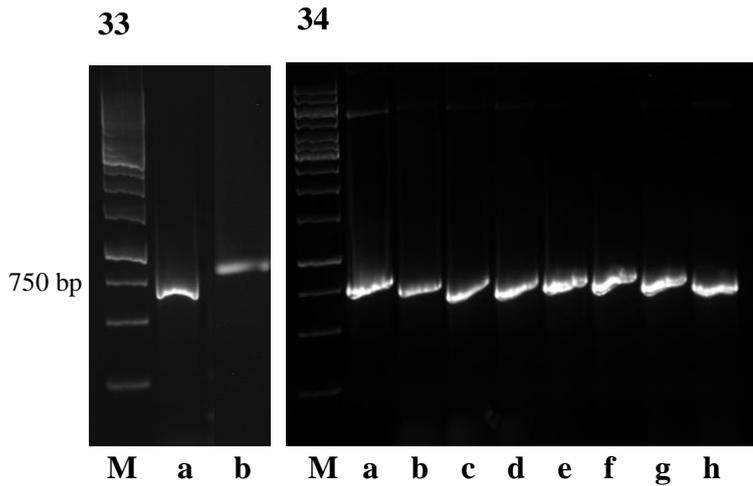


Abbildung 33: Amplifikat der PCR von CsnB. Spur a zeigt das PCR-Produkt der cDNA, Spur b das Amplifikat aus der PCR mit der chromosomalen DNA. Beide Banden stimmen mit der erwarteten Größe überein (717 bp, bzw. 866 bp)

Abbildung 34: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CsnB Klonen im Agarosegel, alle Klone (Spuren a-h) zeigen Banden bei der erwarteten Größe von 717bp.

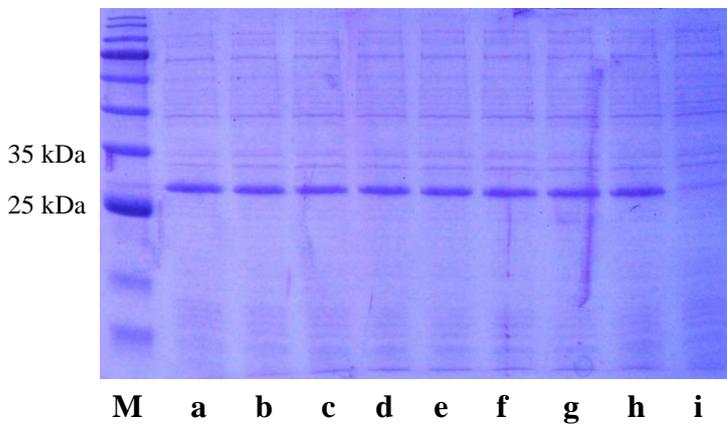


Abbildung 35: Coomassie-Gel der CsnB Klone, welche laut Agarosegel die passende Größe hatten, alle zeigen induzierte Banden mit der erwarteten Größe von 27 kDa (Spuren a-h), Spur i zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Die anschließende Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das gewünschte Fragment erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 36).

Auch ein Western Blot mit dem CsnB-spezifischen Antikörper F79-C10 konnte dies bestätigen (Abb. 37).

Bei der Reinigung über die Talonsäule konnte im ersten Durchgang in den ersten beiden Elutionen eine sehr hohe Menge an gereinigtem Protein gewonnen werden. Auch hier waren Multimere des Proteins vorhanden (Abb. 38). Da im Durchlauf dennoch viel Protein auffindbar war, wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und neu eluiert. Auch hier war in den ersten beiden Elutionen eine sehr hohe Menge an Protein vorhanden (Abb. 39). Da bereits eine ausreichende Menge an gereinigtem und sehr hoch konzentrierten CsnB gewonnen werden konnte, wurde auf ein weiteres Auftragen des Durchlaufs auf die Säule verzichtet.

Nach Dialyse wurde ein LPS-Gehalt von 180,79 EU/ml gemessen, deswegen wurde das Protein erneut über die Talonsäule gereinigt. Bei der anschließenden Messung kam ein Wert von 0,23 EU/ml heraus (Abb. 40). Die rekombinante CsnB eignete sich somit für den Einsatz im Vollblut-ELISA.

Proteinseq.	-----HHHHHGSYNLPNNLKQIYDKHKGKCSKVLAKGFTNGDASQGKSFYSYCGDI	51
CsnB	MRLSEILTVLVTGATAYNLPNNLKQIYDKHKGKCSKVLAKGFTNGDASQGKSFYSYCGDI	60
	:*****	
Proteinseq.	PGAIFISSKGYTNMDIDCDGANNAGKCANDPGQGETAFKSDVKKFGISDLLDANIHPY	111
CsnB	PGAIFISSKGYTNMDIDCDGANNAGKCANDPGQGETAFKSDVKKFGISDLLDANIHPY	120

Proteinseq.	VVFGNEDHSPKFKPQSHGMQPLSVMVAVVNCQQLHYGIWGDVTGGVSTGEASISLADLCFP	171
CsnB	VVFGNEDHSPKFKPQSHGMQPLSVMVAVVNCQQLHYGIWGDVTGGVSTGEASISLADLCFP	180

Proteinseq.	NEHLDGNHGHDPNDVLFIGFTSKDAVPGATAKWKAKNAKEFEDSIKSIKDLVAGLKA	229
CsnB	NEHLDGNHGHDPNDVLFIGFTSKDAVPGATAKWKAKNAKEFEDSIKSIKDLVAGLKA	238

Abbildung 36: Gegenüberstellung der CsnB-Proteinsequenz aus der Datenbank (CsnB) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Rot gekennzeichnet ist die Signalsequenz, gelb unterlegt das rekombinante Protein, das His-tag aus dem Vektor ist grün dargestellt

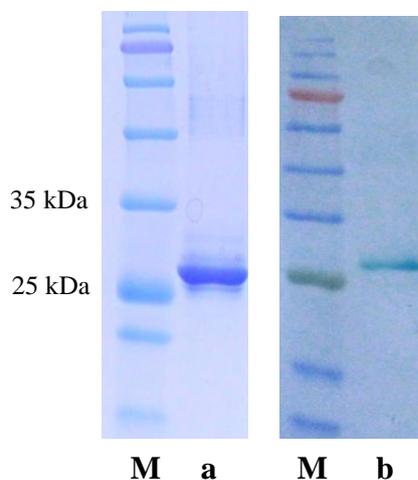


Abbildung 37: Coomassie-Gel und Western Blot von CsnB. Coomassie-Gel

(Spur a) und Western Blot mit dem CsnB-spezifischen Antikörper F79-C10 (Spur b)

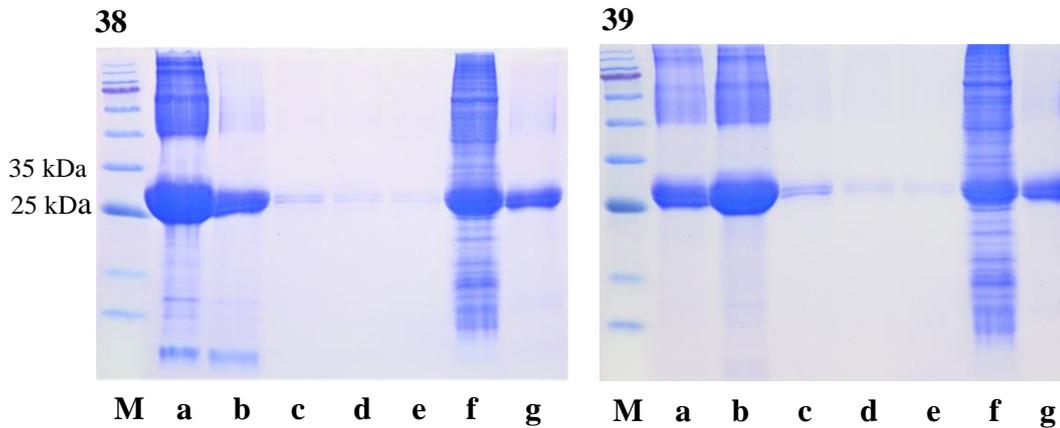


Abbildung 38: Talonreinigung von CsnB. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur f zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 39: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von CsnB, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e), der Durchlauf (Spur f) und die Fraktion (Spur g), die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösen ließ

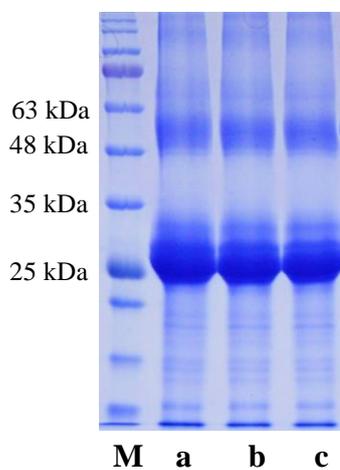


Abbildung 40: Dialyse von CsnB, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

2.5 Hämolyisin/AspHS (Afu3g00590)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	139AS / 15,2kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	18kDa

Tabelle 15: Informationen zu Hly

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 41).

Das Gen besitzt, einschließlich des Introns, eine Größe von 482 bp und sollte mit den in Tab. 16 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 62°C, amplifiziert werden. Aufgrund der vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert und sollte somit eine Größe von 420 bp haben (Abb. 42). Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 420 bp, bzw. 482 bp (Abb. 43). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels der cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die KpnI- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Sieben Klone waren als positiv zu bewerten (Abb. 44). Diese wurden anschließend auf Expression getestet, vier hatten eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 18 kDa (Abb. 45).

Hly-BamHI-FOR	GCAGGATCCATGGCATCGGTCCAAGCT
Hly-KpnI-REV	AGGGTACCTCAGCGCTTCTTCCAAC

Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für das Hly-Konstrukt

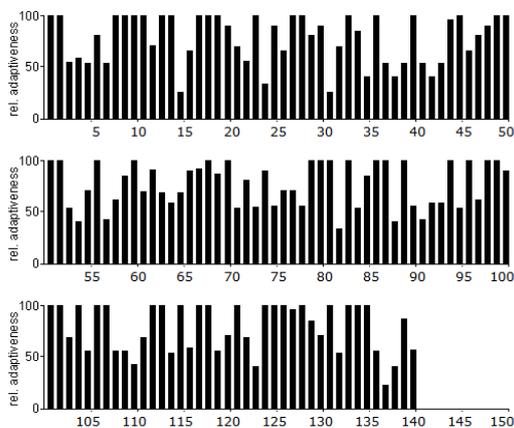


Abbildung 41: Analyse der Sequenz des Hly-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

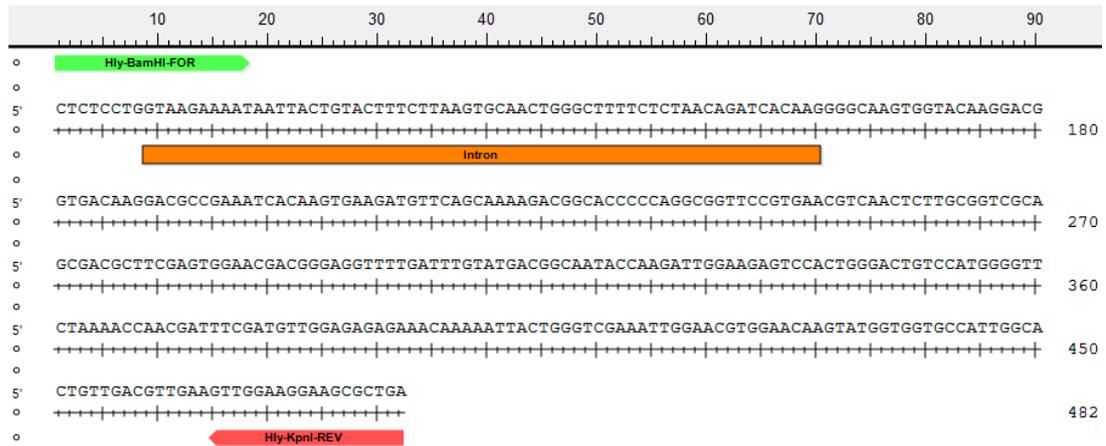


Abbildung 42: Genomische Sequenz des Hly-Gens, das Intron ist orange dargestellt, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

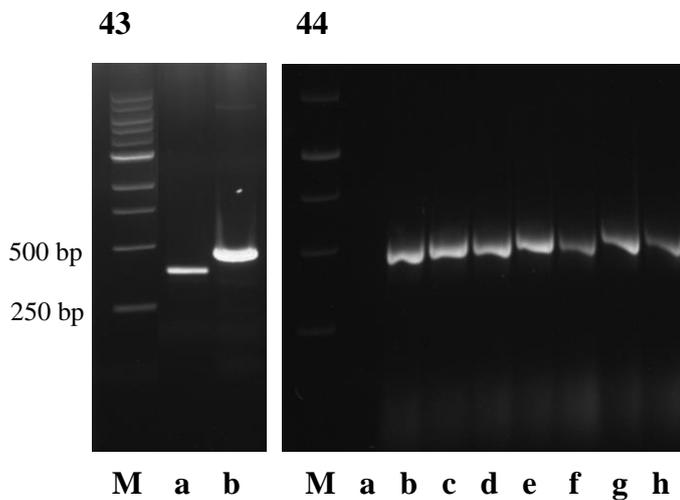


Abbildung 43: Amplifikat der PCR von Hly. Spur a zeigt das Amplifikat der cDNA, Spur b das der chromosomalen, bei beiden Banden stimmen mit der erwarteten Größe von 420 bp, bzw. 482 bp überein

Abbildung 44: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation entstandenen Hly Klonen im Agarosegel. Sieben Klone (Spuren b-h) zeigen Banden bei der erwarteten Größe von 420 bp

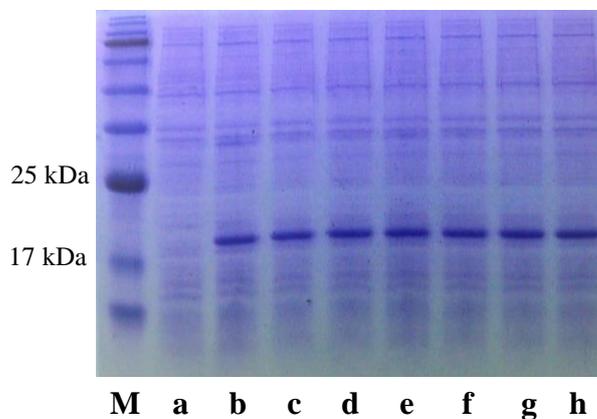


Abbildung 45: Coomassie-Gel der Hly Klone. Alle sieben haben eine

induzierte Bande, die der erwarteten Größe von 18 kDa entspricht (Spuren b-h), Spur a zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Die anschließende Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Gen erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 46).

Auch ein Western Blot mit dem spezifischen α Hly-L125-3 Antikörper konnte dies bestätigen (Abb. 47)

Bei der Reinigung über die Talonsäule konnte im ersten Durchgang in der zweiten Elution eine sehr hohe Menge an gereinigtem Protein gewonnen werden (Abb. 48). Da im Durchlauf dennoch viel Protein auffindbar war, wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und neu eluiert. Hier war in den ersten beiden Elutionen eine sehr hohe Menge vorhanden. Der Durchlauf dieses zweiten Durchlaufs enthielt kein rekombinantes Protein mehr (Abb. 49).

Nach Dialyse (Abb. 50) wurde eine deutlich zu hohe LPS-Konzentration von 182 EU/ml gemessen. Über eine Nachreinigung der Probe über die Talonsäule konnte der Wert auf 43,13 EU/ml gesenkt werden, da dies jedoch ebenfalls nicht den Vorgaben entsprach, wurde eine Reinigung einer neu angesetzten Kultur vorgenommen. Bei dieser konnte ein Wert von 1,55 EU/ml erreicht werden, diese Probe stand somit für den Einsatz im ELISpot Assay zur Verfügung. Die Ursache für diese sehr weit auseinanderliegenden LPS-Werten konnte nicht ermittelt werden.

Proteinseq.	HHHHGSHVISSXASMASVQAYAQWVTVHLINMSSETLSIGNASLSWGKWKYKDGDKDAEI	60
Hly	-----MASVQAYAQWVTVHLINMSSETLSIQNASLSWGKWKYKDGDKDAEI	46

Proteinseq.	TSEDEVQQKTAPPGGSVNVNSCGRSDASSGTTGGFDLYDGNTKIGRVHWDCPWGSKTNDFFD	120
Hly	TSEDEVQQKTAPPGGSVNVNSCGRSDASSGTTGGFDLYDGNTKIGRVHWDCPWGSKTNDFFD	106

Proteinseq.	VGERNKNYWVEIGTWNKYGGGAGTVDVEVGRKR---	153
Hly	VGERNKNYWVEIGTWNKYGGGAGTVDVEVGRKR---	139

Abbildung 46: Gegenüberstellung der Hly-Proteinsequenz aus der Datenbank (Hly) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz, rot gekennzeichnet ist die Signalsequenz, gelb unterlegt das rekombinante Protein, das His-tag aus dem Vektor ist grün markiert

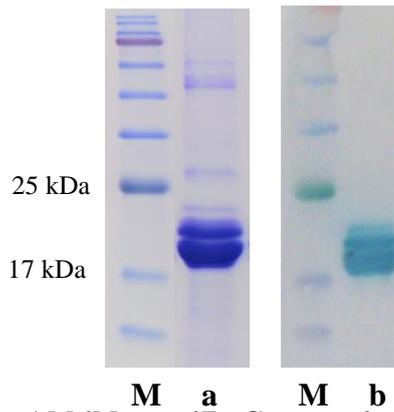


Abbildung 47: Coomassie-Gel und Western Blot von Hly. Spur a zeigt das Coomassie-Gel von Hly, Spur b den Western Blot mit dem spezifischen α Hly-L125-3 Antikörper

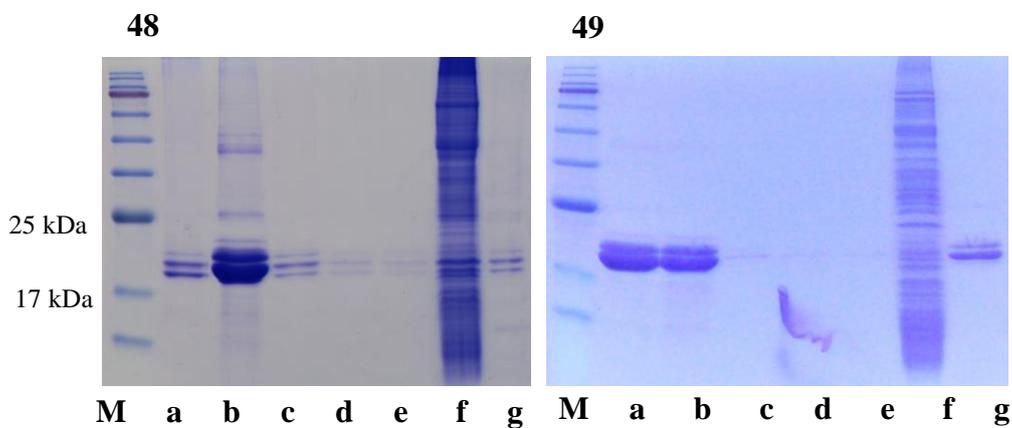


Abbildung 48: Talonreinigung von Hly. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur g zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur h die Fraktion, welche sich mit *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 49: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Hly, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e), der Durchlauf (Spur f) und die Fraktion (Spur g), die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösen ließ

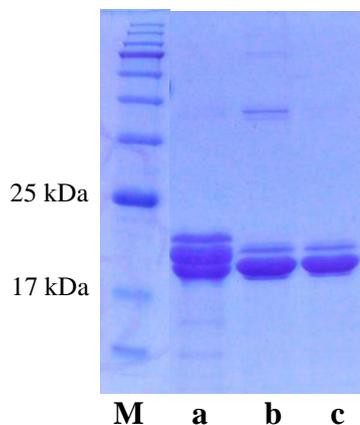


Abbildung 50: Dialyse von Hly, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

2.6 FG-GAP (Afu1g04130)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	307 AS / 33,8kDa
Signalsequenz	1-25
Größe des His ₆ -Proteins	34kDa

Tabelle 17: Informationen zu FG-GAP

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 51).

Das Gen besitzt, einschließlich des Teils, der für die Signalsequenz kodiert, eine Größe von 924 bp (Abb. 52). Das Zielgen sollte somit eine Größe von 849 bp haben und konnte, mit den in Tab. 18 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 58°C, erfolgreich mit chromosomaler DNA amplifiziert werden. Im Agarosegel konnte eine Bande mit der erwarteten Größe von 849 bp sichtbar gemacht werden (Abb. 53). Dieses PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Zwei zeigten eine sehr deutliche Bande bei der erwarteten Größe von 849 bp, fünf sehr schwache Banden an der gleichen Stelle (Abb 54). Zur Überprüfung auf Expression wurden die zwei Klone mit den deutlichen Banden verwendet, beide zeigten induzierte Banden mit der erwarteten Größe von 34 kDa. Das Expressionslevel war eher schwach.

FG-GAP-BamHI-FOR	GTAGGATCCGCTCCATACCAAACCCGCATC
FG-GAP-HindIII-REV	GTAAAGCTTTCAGTTTCTGCCATTTGCAACG

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide für das FG-GAP-Konstrukt

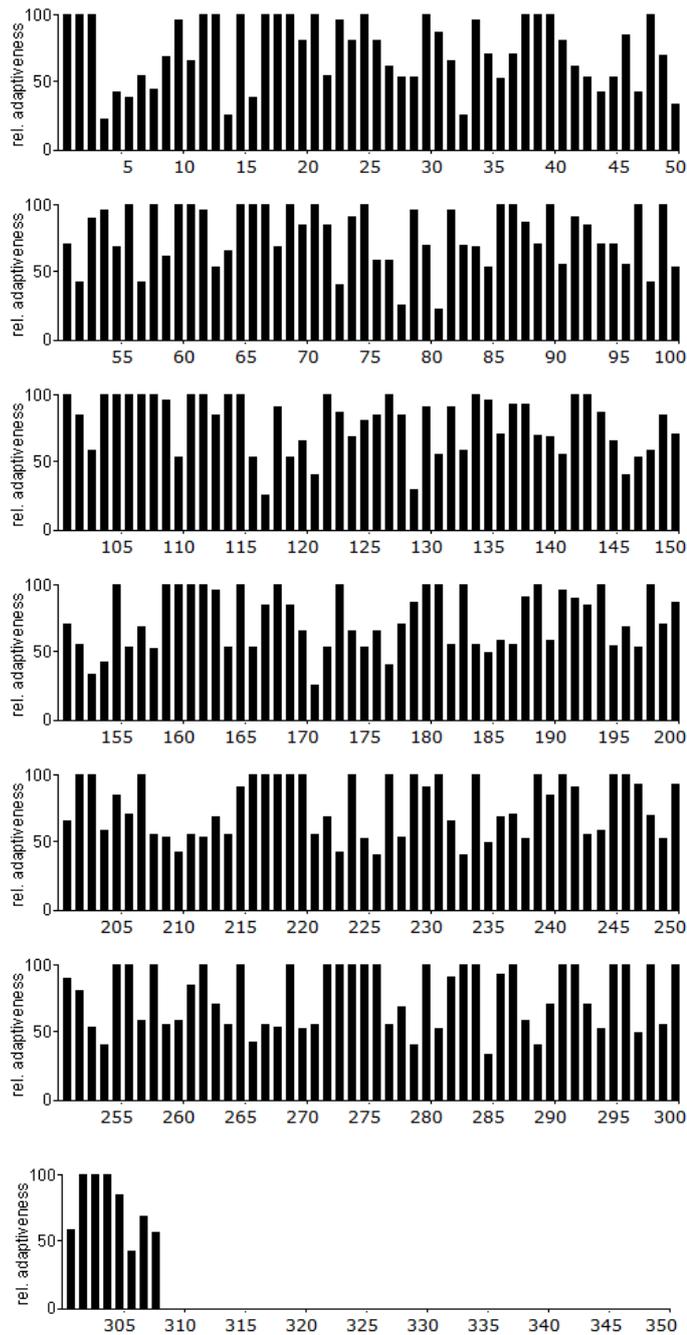


Abbildung 51: Analyse des FG-GAP-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

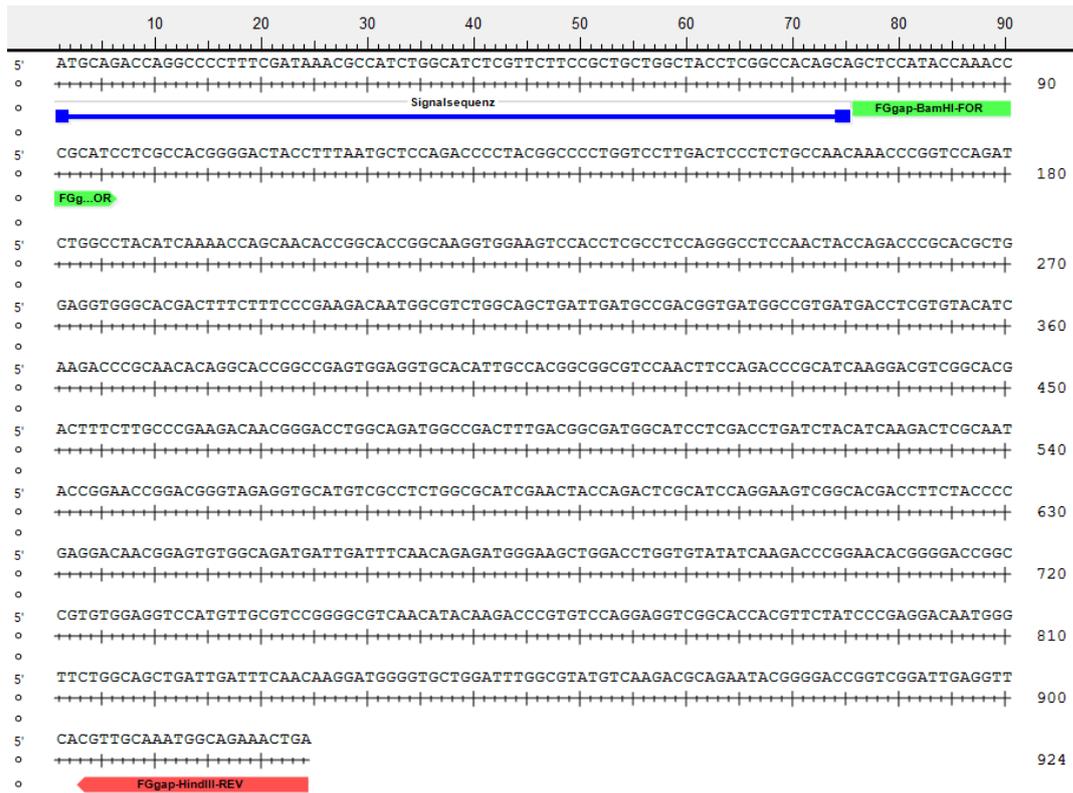


Abbildung 52: Genomische Sequenz des FG-GAP-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

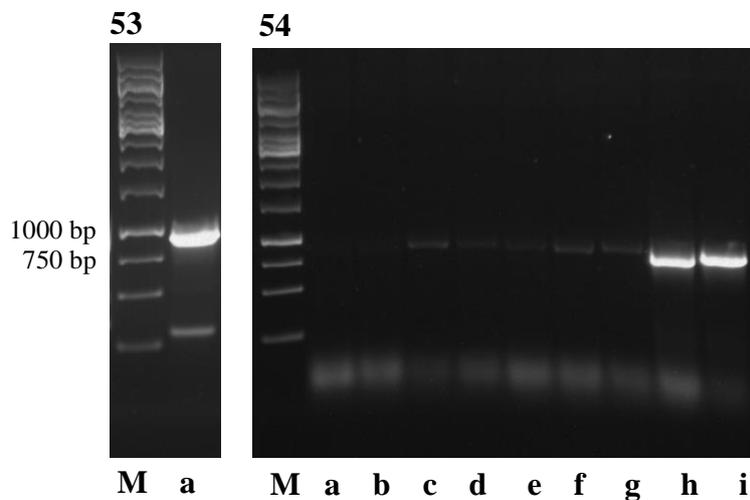


Abbildung 53: Amplifikat der PCR von FG-GAP. Spur a zeigt das PCR-Produkt. Die Bande stimmt mit der erwarteten Größe von 849 bp überein

Abbildung 54: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation entstandenen FG-GAP Klonen im Agarosegel. Zwei Klone (Spuren h und i) zeigen sehr deutliche Banden bei der erwarteten Größe von 849 bp, fünf (Spuren c-g) schwächere

Anschließend wurde eine Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* durchgeführt. Diese zeigte, dass das gesamte Gen, ohne Signalsequenz, erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 55).

Die Reinigung über die Talonsäulenmatrix verlief erfolgreich, so konnte hochkonzentriertes und gereinigtes rekombinantes Protein gewonnen werden (Abb. 56). Die Elution erfolgte dabei über 250 mM Imidazol. In den Elutionen eins und zwei war das meiste rekombinante Protein in einer hohen Konzentration vorhanden. Da das Coomassie-Gel zeigte, dass nicht alles Protein an die Säulenmatrix gebunden hatte und im Durchlauf geblieben war, wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und eluiert. Hier zeigte sich dasselbe Bild wie zuvor. Die höchsten Konzentrationen waren in den ersten beiden Elutionen zu finden, auch hier erfolgte die Elution mit dem Elutionspuffer. Die anschließende Analyse im Coomassie-Gel zeigte, dass im Durchlauf nur noch eine geringe Menge an rekombinantem Protein vorhanden war (Abb 57).

Die LPS-Messung nach dem Umpuffern (Abb. 58) ergab einen Wert von 798 EU/ml, daher wurde das FG-GAP nachgereinigt. Bei dieser Nachreinigung konnte der Wert auf 11,1 EU/ml gesenkt werden. Bei weiteren Reinigungen wurden ebenfalls Werte von >100 EU/ml gemessen, die LPS-Werte der Proben waren für den Einsatz im ELISpot Assay oder im Vollblut-ELISA damit zu hoch.

Proteinseq.	-----HHHHHGS	APYQTRILATGTTFNAPDPYGPWSLTPSANKPGPD	43
FG-GAP	MQTRPLSINAIWHLVPLLLATSATA	APYQTRILATGTTFNAPDPYGPWSLTPSANKPGPD	60
		. *****	
Proteinseq.		LAYIKTSNTGTGKVEVHLASRASNYQTRTLEVGTTFFPEDNGVWQLIDADGDGRDDLVI	103
FG-GAP		LAYIKTSNTGTGKVEVHLASRASNYQTRTLEVGTTFFPEDNGVWQLIDADGDGRDDLVI	120

Proteinseq.		KTRNTGTGRVEVHIATAASNFOQTRIKDVGTTFLPEDNGTWQMAFDGKLDLVIKTRN	163
FG-GAP		KTRNTGTGRVEVHIATAASNFOQTRIKDVGTTFLPEDNGTWQMAFDGKLDLVIKTRN	180

Proteinseq.		TGTGRVEVHVASGASNYQTRIQEVGTTFFPEDNGVWQIMDFNRDGKLDLVIKTRNTGTG	223
FG-GAP		TGTGRVEVHVASGASNYQTRIQEVGTTFFPEDNGVWQIMDFNRDGKLDLVIKTRNTGTG	240

Proteinseq.		RVEVHVASGASTYKTRVQEVGTTFFPEDNGFWQLIDFNKDGVLDSLAVKQTGTGRIEV	283
FG-GAP		RVEVHVASGASTYKTRVQEVGTTFFPEDNGFWQLIDFNKDGVLDSLAVKQTGTGRIEV	300

Proteinseq.	HVANGRN---	290	
FG-GAP	HVANGRN---	307	

Abbildung 55: Gegenüberstellung der FG-GAP-Proteinsequenz aus der Datenbank (FG-GAP) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Die Signalsequenz ist rot dargestellt, das His-tag aus dem Vektor grün, das rekombinante Protein ist gelb unterlegt

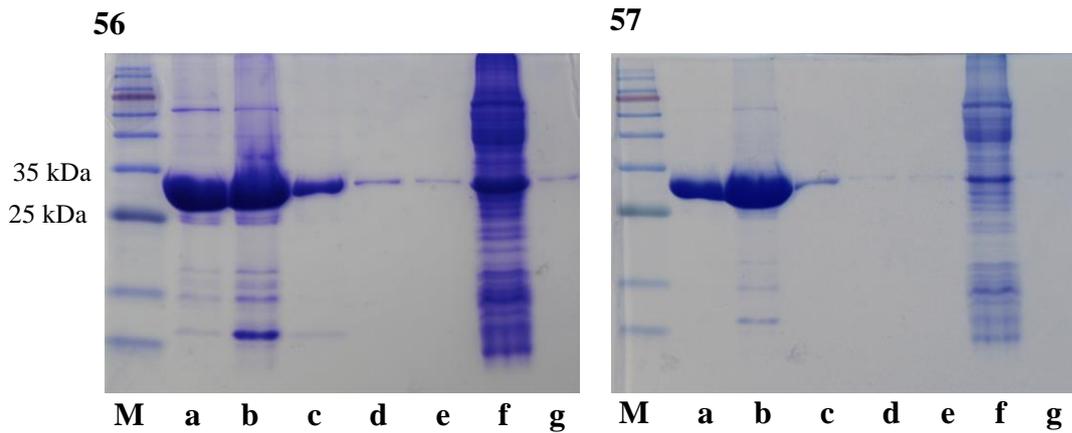


Abbildung 56: Talonreinigung von FG-GAP. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur g zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur h die Fraktion, welche sich bei der Elution mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 57: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von FG-GAP, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e), der Durchlauf (Spur f) und die Fraktion (Spur g), die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösen ließ

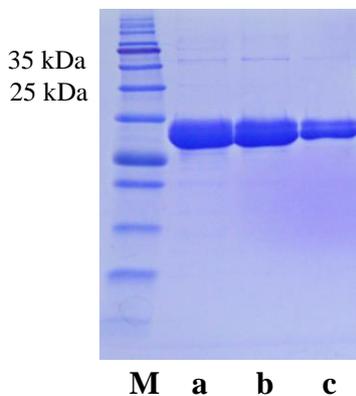


Abbildung 58: Dialyse von FG-GAP, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

3. Nicht erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine aufgeführt

Antigen	Genbank-ID
Aspf5/Mep1	Afu8g07080
Aspf7	Afu4g06670
Aspf10/Pep1	Afu5g13300
Aspergillopepsin	Afu7g01200

Tabelle 19: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine

3.1 Aspf5/Mep (Afu8g07080)

Zahl der Introns	4
Gesamtgröße	634AS / 68,7kDa
Signalsequenz	1-18
Größe des His ₆ -Proteins	70 kDa

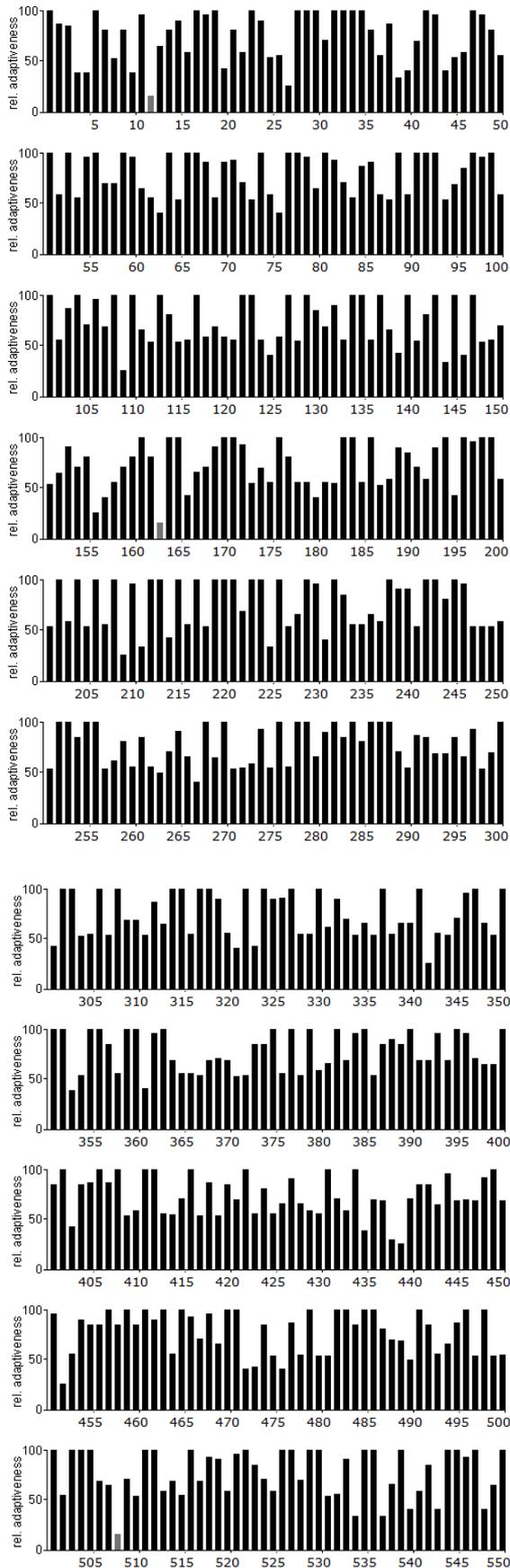
Tabelle 20: Informationen zu Aspf5

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 59).

Da Aspf5 insgesamt durch vier Introns in fünf Exons mit ähnlicher Größe unterteilt ist (Abb. 60), wurde für die Amplifikation cDNA verwendet. Es wurden die in Tab. 21 genannten Oligonukleotide verwendet. Als Schnittstellen sollten die KpnI- und die HindIII-Schnittstelle dienen, der T_m-Wert lag bei 63°C. Das gesamte Gen besitzt eine Größe von 2111 bp, ohne Introns und Signalsequenz eine von 1848 bp. Jedoch konnte es nicht erfolgreich amplifiziert werden. Das lag nicht an den verwendeten Oligonukleotiden, da sich das Gen mit genomischer DNA amplifizieren ließ, wie in Abb. 61 zu sehen ist. Das rekombinante Protein sollte eine Größe von 70 kDa besitzen (Abb. 62).

Aspf5-FORKpnl	AGGGTACCCCCGCTCACCAGTCTTACGGA
Aspf5-REVHindIII	AGCAAGCTTTCAACAGACACCACTGGGGAC

Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf5-Konstrukt



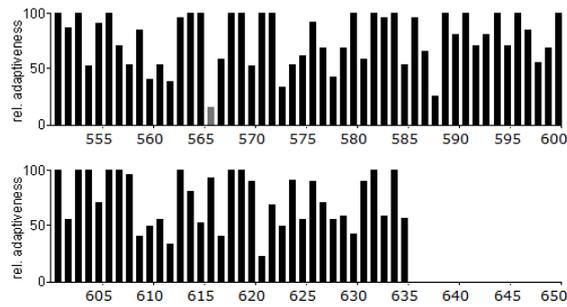


Abbildung 59: Analyse der Sequenz des AspF5-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*



Abbildung 60: Genomische Sequenz des AspF5-Gens, die Signalsequenz wurde blau und die Introns orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

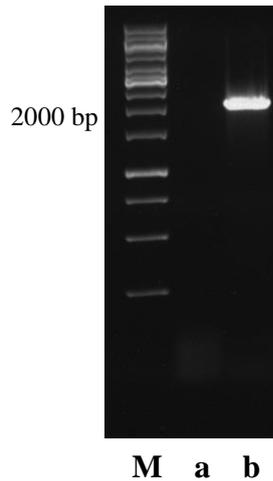


Abbildung 61: Amplifikat der PCR von Aspf5. Spur b zeigt das Amplifikat aus der Kontroll-PCR, welche unter gleichen Bedingungen mit genomischer DNA hergestellt wurde und die erwartete Größe von 2111 bp besitzt. Die PCR mit cDNA verlief erfolglos (Spur a)

Da es bereits Veröffentlichungen gibt, in denen Aspf5 erfolgreich amplifiziert werden konnte, wurden die Wachstumsbedingungen für die Gewinnung der cDNA verändert. Aspf5 zählt zu den sekretierten Proteasen und die Expression von Proteasen ist stark davon abhängig, welche Stickstoffquelle zur Verfügung steht. Statt dem üblicherweise verwendeten AMM wurde auf ein *Skim Milk Medium* gewechselt. Dies enthielt 1% Glukose, 1% Magermilch, 0,1% Casaminoäure, 7mM KCl, 2mM MgSO₄, 50mM Na₂HPO₄, 0,05% Triton X-100 und Spurenelementen (MONOD et al., 2002). Doch auch so ließ sich das Aspf5 nicht amplifizieren, auf weitere Versuche wurde aus Zeitgründen verzichtet.

```

1  MRGLLLAGAL ALPASVFAHP AHQSYGLNRR TVDLNAFRLK SLAKYVNATE
51  TVIEAPSSFA PFKPQSYVEV ATQHVKMIAP DATFRVDDH YVDNGVAHV
101 HFRQTANGLD IDNADFNVNK GKDGVFSYG NSFYTGQIPS SAALTKRDFS
151 DPVTALKGTT NTLQLPITVD SASSESTEEK ESYVFKGVSG TVSDPKAKLV
201 YFVKDDGTLA LAWRVETDID SNWLLTYIDA KSGEEIHGVV DYVAEADYQV
251 YAWGINDPTE GERTVIKDPW DSVASEFTWI SDGSTNYTTS RGNNGIAQSN
301 PSGGSSYLNN YRPSSSSLSF KYPYSVSSSP PSSYIDASII QLFYTANIYH
351 DLLYTLGFTE KAGNFEYNTN GQGGLGNDYV ILNAQDGSST NNANFATPPD
401 GQPGRMRMYV WTESTPYRDG SFEAGIVIHE YTHGLSNRLT GGPANSNCLN

```

451 ALESGGMGEG WSDFMATAIR LKPGDKRSTD YTMGEWASNR AGGIRQYPYS
 501 TSLSTNPLTY TSVNSLNAVH AIGTVWASML YEVLWNLIDK HGKNDAPKPT
 551 LRDGVPTDGK YLAMKLVMDG MALQPCPNPF VQARDAILDA DTALTGGENQ
 601 CEIWTAFAKR GLGAGAKYSS RNRVGSTEVP SGVC

Abbildung 62: Proteinsequenz von Aspf5, die Signalsequenz wurde rot markiert, die Sequenz, für das geplante rekombinante Protein gelb unterlegt.

3.2 Aspf7 (Afu4g06670)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	270AS /30,1 kDa
Signalsequenz	1-21
Größe des His ₆ -Proteins	30 kDa

Tabelle 22: Informationen zu Aspf7

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 63).

Das Gen besitzt eine Gesamtgröße von 813 bp. Die ersten 63 Nukleotide umfassen die Signalsequenz, welche nicht amplifiziert werden sollte (Abb. 64). Das Gen konnte ohne Signalsequenz mit den im Folgenden genannten Oligonukleotiden mit chromosomaler DNA und einem T_m-Wert von 54°C erfolgreich amplifiziert werden. Im Agarosegel konnte bei der erwarteten Größe von 750 bp eine Bande gesehen werden (Abb. 65). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Fünf der sechs getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 750 bp (Abb. 66). Diese wurden im Anschluss auf Expression getestet, welche bei allen negativ ausfiel, das heißt keiner der getesteten Klone zeigte eine induzierte Bande bei der erwarteten Höhe von 30 kDa (Abb. 67).

Aspf7-FOR-BamHI	ATCGGATCCGCCCTGTCAACCTTGAC
Aspf7-REV-HindIII	CTAAAGCTTTTAGTTGAAGTACCACGA

Tabelle 23: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf7-Konstrukt

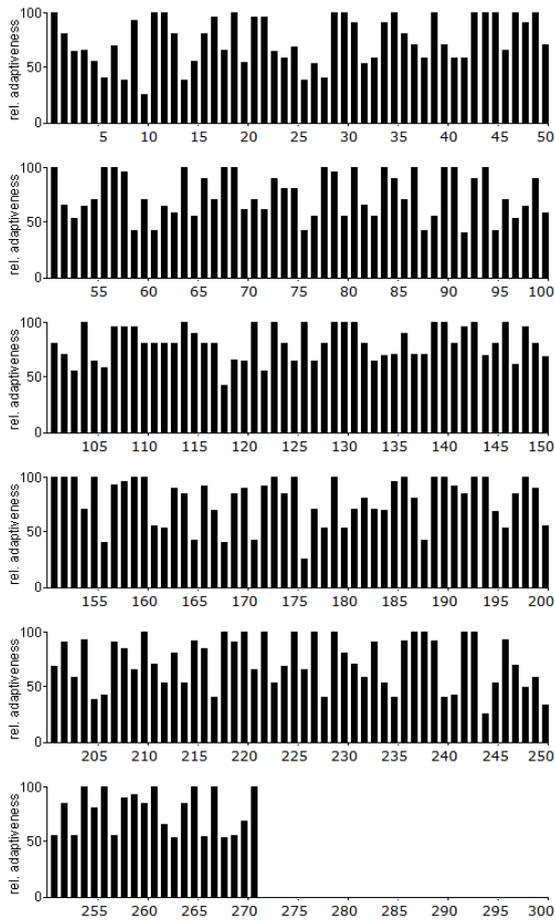


Abbildung 63: Analyse der Sequenz des AspF7-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

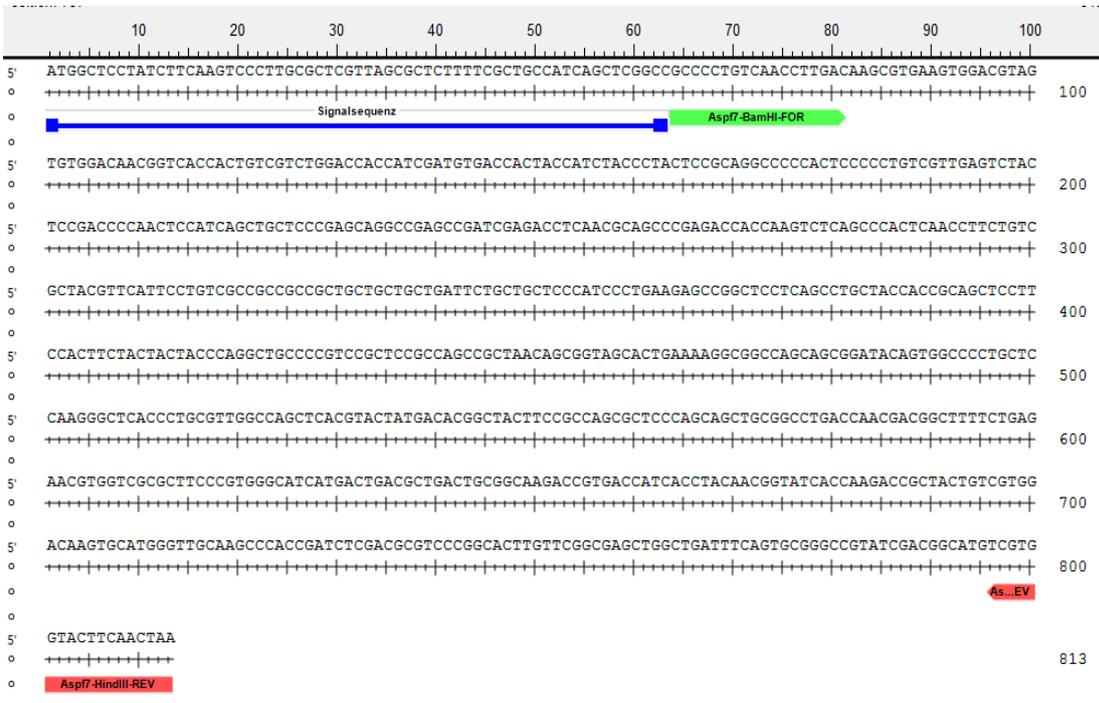


Abbildung 64: Genomische Sequenz des AspF7-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt


```

*****
Proteinseq.      TATSASAPSSCGLTNDGFSENVVALPVGIMTDADCGKTVTITTYNGITKTATVVDKCMGCK 227
Aspf7            TATSASAPSSCGLTNDGFSENVVALPVGIMTDADCGKTVTITTYNGITKTATVVDKCMGCK 240
*****

Proteinseq.      PTDLASRHLFGELADFSAGRIDGMSWYFN 257
Aspf7            PTDLASRHLFGELADFSAGRIDGMSWYFN 270
*****

```

Abbildung 68: Gegenüberstellung der Aspf7-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf7) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Proteinsequenz. Die Signalsequenz wurde rot markiert, das His-tag grün. Das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

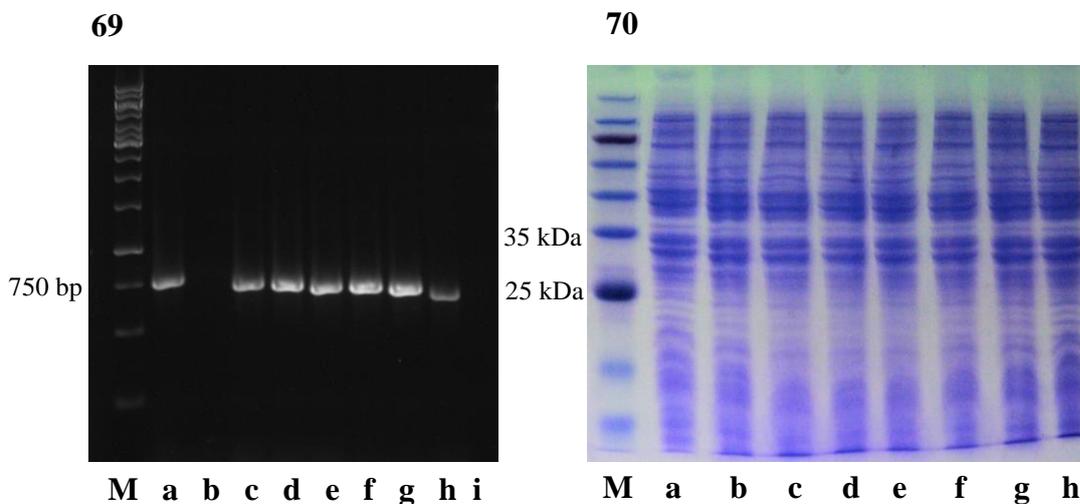


Abbildung 69: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm entstandenen Aspf7 Klone im Agarosegel. Sieben der neun getesteten Klone zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 750 bp (Spur a, Spuren c-h)

Abbildung 70: Coomassie-Gel der Aspf7 Klone (Rosetta), welche bei der PCR-Überprüfung positiv ausfielen (Spuren a-g). Eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 27 kDa konnte bei keinem der Klone beobachtet werden, Spur h zeigt die Kontrolle ohne IPTG

3.3 Aspf10/Pep1 (Afu5g13300)

Zahl der Introns	3
Gesamtgröße	395AS / 41,6kDa
Signalsequenz	1-20
Größe des His ₆ -Proteins	35kDa

Tabelle 24: Informationen zu Aspf10

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 71).

Das Gen besitzt eine Signalsequenz, drei Introns und hat eine Gesamtgröße von 1348 bp. Aufgrund seiner Größe und seiner Intronstrukturen wurden die Primer (Tab. 25) so konzipiert, dass das Gen erst ab dem 2. Exon amplifiziert werden und somit eine Größe von 864 bp haben sollte (Abb. 72). Aufgrund der vorhandenen Intronstrukturen wurde cDNA als Template eingesetzt. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen ein Ansatz mit chromosomaler DNA durchgeführt, dieses Gen sollte eine Größe von 973 bp besitzen. Zunächst gelang jedoch keine Herstellung des Gens. Dies lag nicht an den verwendeten Oligonukleotiden, da das Gen von chromosomaler DNA amplifizierbar war. Wie Aspf5 gehört auch Aspf10 zu den sekretierten Proteasen, daher wurde für die Amplifikation in einem weiteren Versuch cDNA eingesetzt, welche aus einem Pilz hergestellt wurde, der in einem *Skim Milk Medium* angewachsen war. Auch hier wurde parallel unter den gleichen Bedingungen eine PCR mit chromosomaler DNA durchgeführt. In diesem Versuch verliefen beide PCRs positiv und es konnten im Agarosegel auf jeweils eine Bande mit der erwarteten Größe von 864 bp bzw. 973 bp beobachtet werden (Abb. 73). Anschließend wurde das cDNA-Amplifikat über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Keiner konnte dabei als positiv identifiziert werden (Abb. 74). Eine Überprüfung der Restriktionsstellen in den Primern bestätigte, dass diese korrekt waren. Auch ein Wechsel des Bakterienstammes zu Rosetta lieferte nur negative Klone. Weitere Klonierungsversuche brachten ebenfalls keine Klone hervor, welche das Konstrukt aufgenommen hatten. Nach mehreren Fehlversuchen wurden die Bemühungen daher aus Zeitgründen eingestellt. Das rekombinante Protein hätte eine Größe von 35 kDa besitzen sollen (Abb. 75).

Pep1-FOR-BamHI	CTAGGATCCTGGGTCTTCTCCTCCGAGCTT
Pep1-REV-HindIII	CTAAAGCTTCTATGCCTGAGGGGCGAAGCC

Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf10-Konstrukt

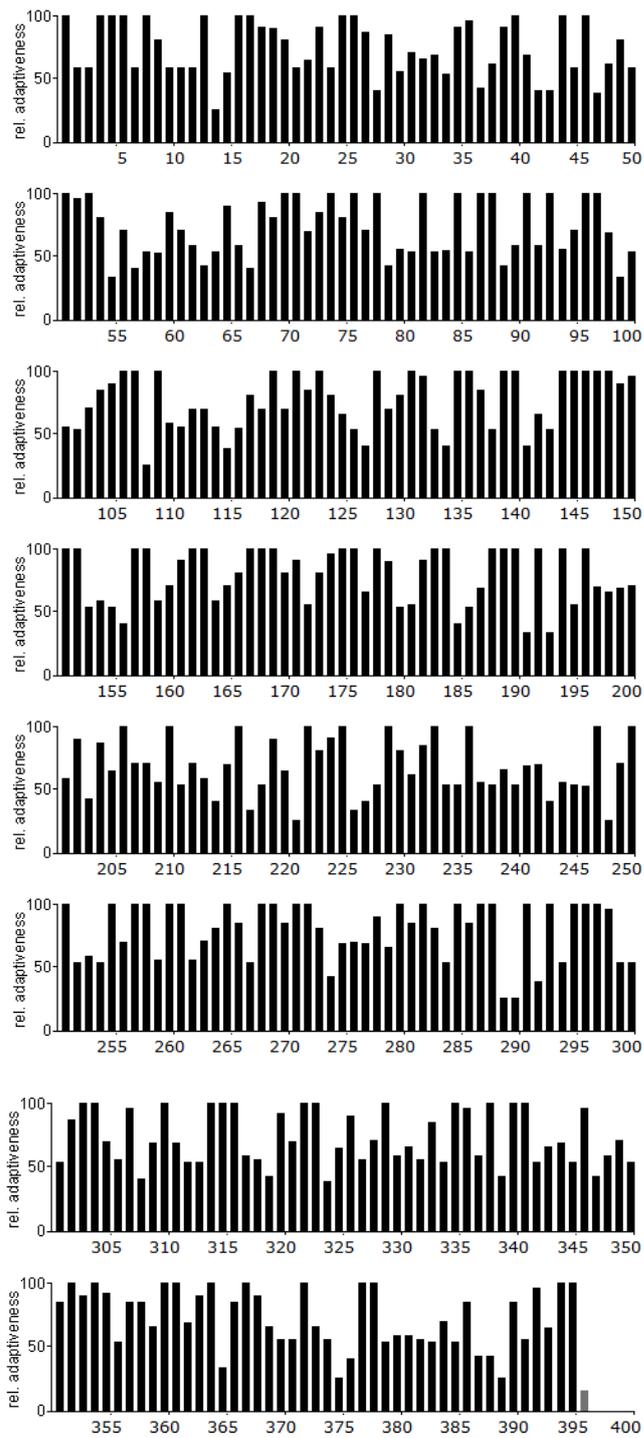


Abbildung 71: Analyse der Sequenz des Asp10-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

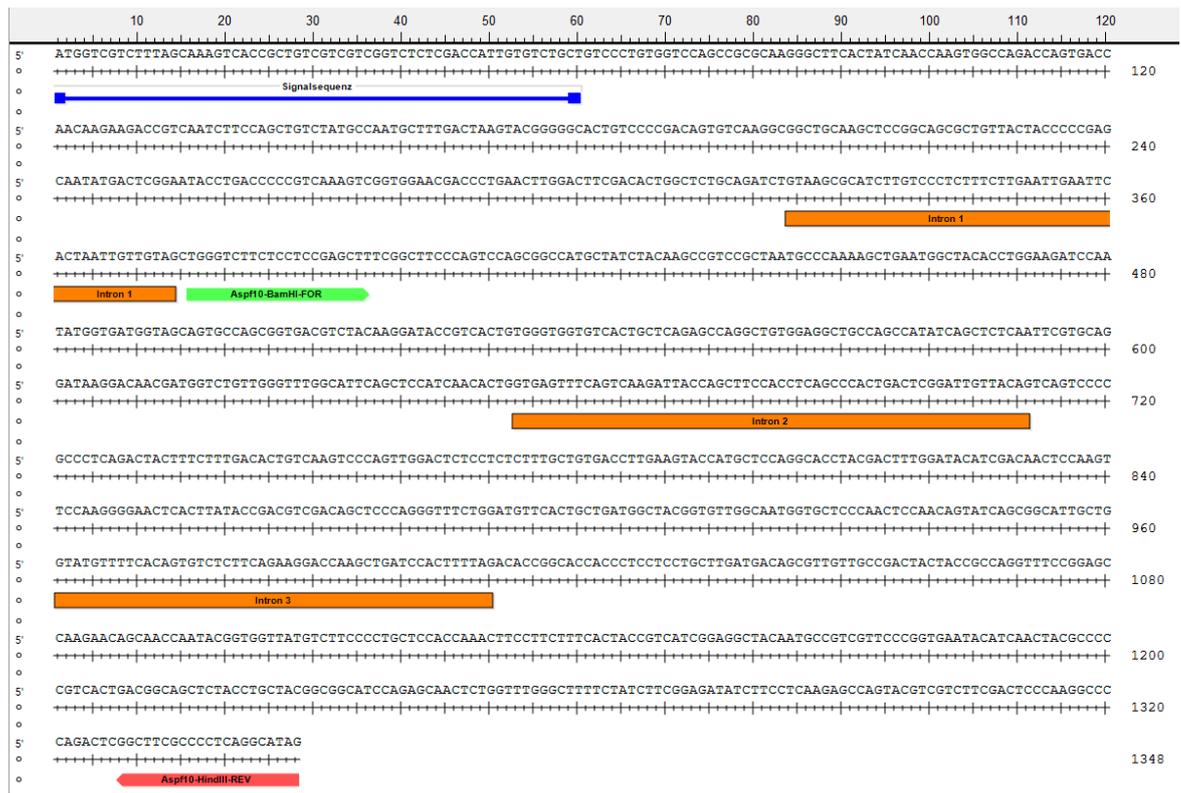


Abbildung 72: Genomische Sequenz des Aspf10-Gens, die Signalsequenz wurde blau, die Introns orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

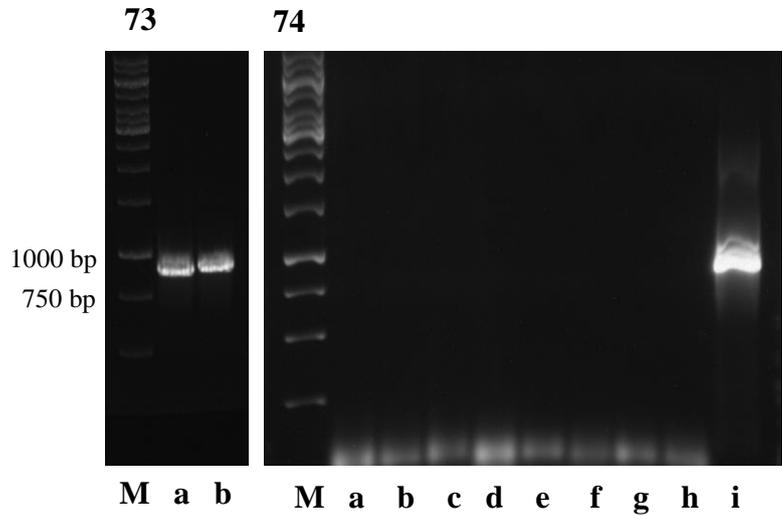


Abbildung 73: Amplifikat der PCR von Aspf10. Spur a zeigt das Amplifikat aus der PCR mit cDNA, die aus der Anzucht des Pilzes im *Skim Milk Medium* entstammte, die Bande entspricht der erwarteten Größe von 864 bp. Spur b zeigt das Amplifikat aus der PCR mit der chromosomalen DNA, die Bande liegt bei der erwarteten Größe von 973 bp.

Abbildung 74: Auftrennung der PCR-Produkte aus den bei der Transformation entstandenen Aspf10 Klonen im Agarosegel, bei keinem ist eine Bande auf der erwarteten Größe von 864 bp zu erkennen (Spuren a-h). Spur i zeigt das Amplifikat der Kontroll-PCR mit cDNA

1 MVVFSKVTAV VVGLSTIVSA VPVVQPRKGF TINQVARPVT NKKTVNLPV
 51 YANALTKYGG TVPDSVKAAA SSGSAVTTPE QYDSEYLTPV KVG GTTLNLD
 101 FDTGSADLWV FSSELSASQS SGHAIYKPSA NAQKLNGYTW KIQYGDGSSA
 151 SGDVYKDTVT VGGVTAQSQA VEAASHISSQ FVQDKDNDGL LGLAFSSINT
 201 VSPRPQTTFE DTVKSQLDSP LFAVTLKYHA PGTYDFGYID NSKFQGELTY
 251 TDVDSSQGFW MFTADGYGVG NGAPNSNSIS GIADTGTLL LLDDSVVADY
 301 YRQVSGAKNS NQYGGYVFPC STKLPSFTTV IGGYNAVVPG EYINYAPVTD
 351 GSSTCYGGIQ SNSGLGFSIF GDIFLKSQYV VFDSQGPRLG FAPQA

Abbildung 75: Proteinsequenz von Aspf10, die Signalsequenz wurde rot markiert, gelb unterlegt ist das geplante rekombinante Protein

3.4 Aspergillopepsin

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	277AS / 29.0kDa
Signalsequenz	1-19
Größe des His ₆ -Proteins	31kDa

Tabelle 26: Informationen zu Aspergillopepsin

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 76).

Das Gen besitzt, einschließlich der Signalsequenz, eine Größe von 834 bp, unter Auslassung dieser umfasst es 777 bp (Abb. 77) und konnte mit den in Tab. 27 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 58°C erfolgreich amplifiziert werden. Im Agarosegel konnte eine Bande bei der erwarteten Größe von 777 bp sichtbar gemacht werden (Abb. 78). Dieses PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Keiner der Klone konnte dabei als positiv identifiziert werden (Abb. 79). Daraufhin wurde das gereinigte und geschnittene PCR-Produkt neu in den Vektor pQE30 kloniert und anschließend in *E. coli* (Rosetta) transformiert. Wie in Abb. 80 zu sehen ist, konnten fünf Klone mit einer Bande bei der erwarteten Größe von 777 bp identifiziert werden. Bei der anschließenden Überprüfung auf Expression konnte jedoch bei keinem eine

induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 31 kDa beobachtet werden (Abb. 81). Ein Expressionsplasmid, welches laut PCR die richtige Größe hatte, wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 82). Auf weitere Versuche wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Aspergillopepsin-FOR	AGTGGATCCGCCCTAACGCGCGTCCCTG
Aspergillopepsin-REV	AGTAAGCTTCTACGGACATACTCGACAAC

Tabelle 27: Verwendete Oligonukleotide für das Aspergillopepsin-Konstrukt

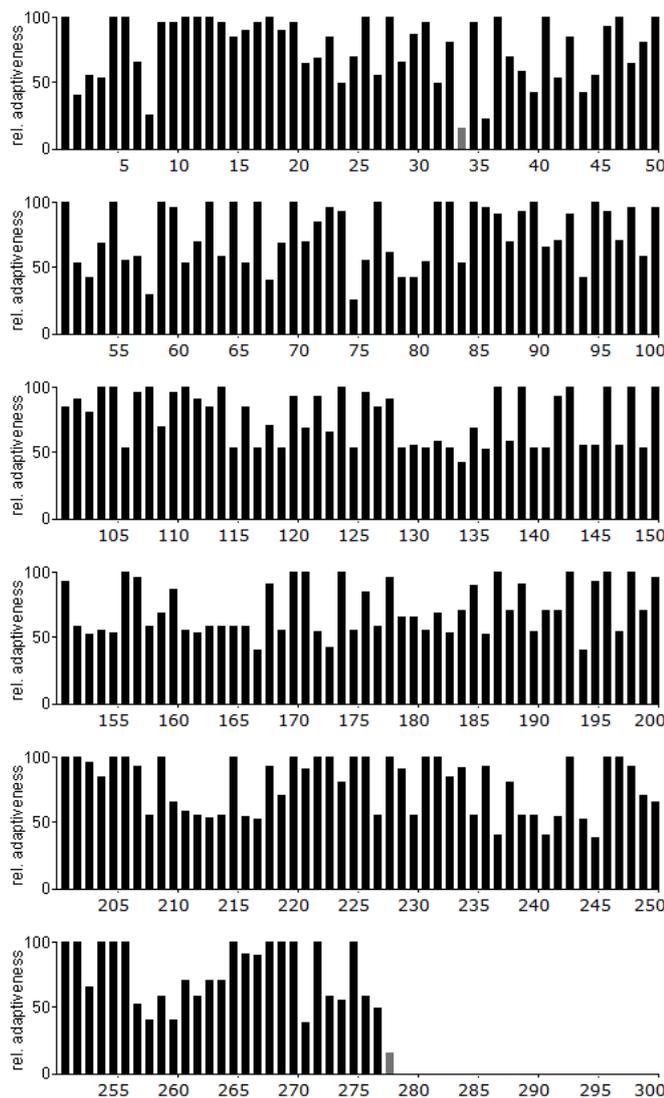


Abbildung 76: Analyse der Sequenz des Aspergillopepsin-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

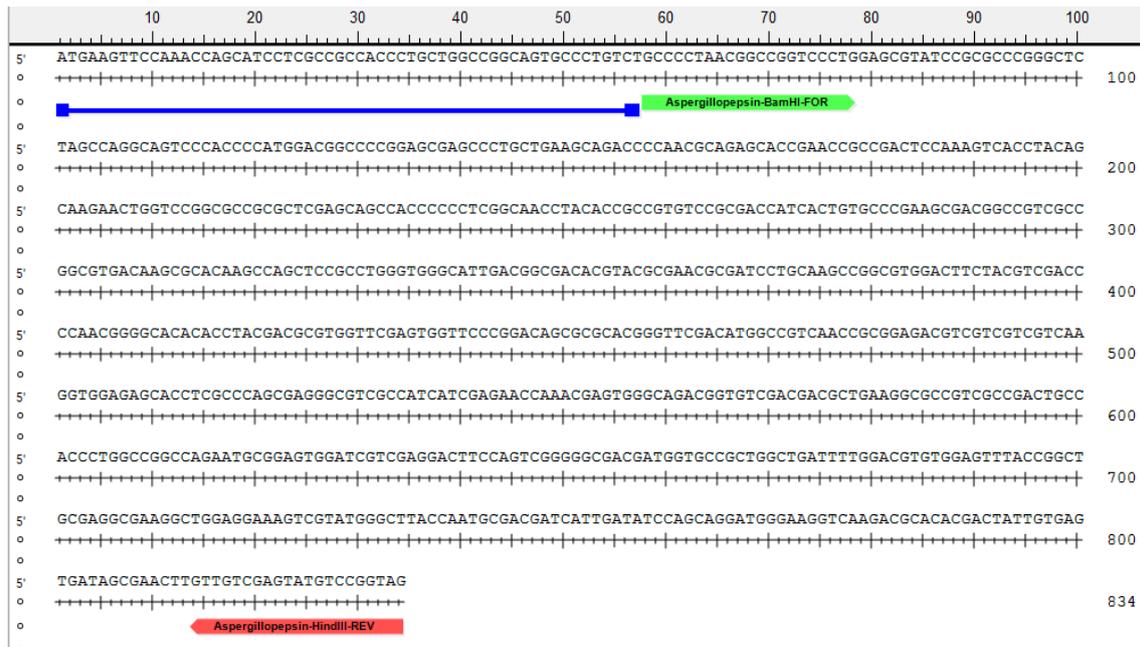


Abbildung 77: Genomische Sequenz des Aspergillopepsin-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

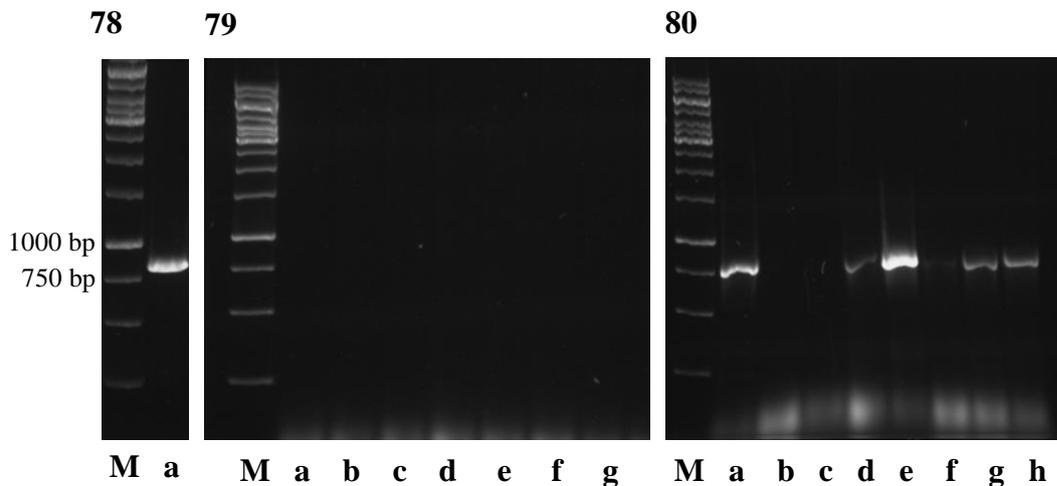


Abbildung 78: Amplifikat der PCR von Aspergillopepsin. Spur a zeigt das PCR-Produkt. Die Bande stimmt mit der erwarteten Größe von 777 bp überein.

Abbildung 79: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation in *E. coli* (M15) entstandenen Aspergillopepsin Klonen im Agarosegel. Keiner der getesteten Klone zeigt eine Bande mit der erwarteten Größe von 777 bp.

Abbildung 80: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation in *E. coli* (Rosetta) entstandenen Aspergillopepsin Klonen im Agarosegel, fünf zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 777 bp (Spuren a,d,e,g,h).

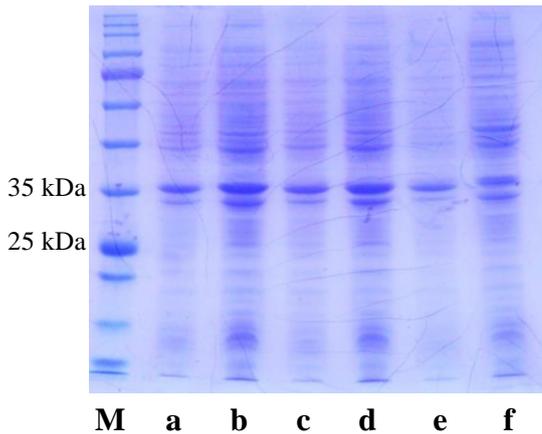


Abbildung 81: Coomassie-Gel der Aspergillopepsin Klone (Rosetta), welche laut PCR die richtige Größe hatten. Es war keine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 31 kDa zu sehen (Spuren a-e), Spur f zeigt die Kontrolle ohne IPTG

Proteinseq.	-----HHHHHGS	APNGRSLEIRARALARQSHPMDGPASPAEADPNAEHRTA	49
Aspergillopepsin	MKFQTSILAATLLAGSALS	APNGRSLEIRARALARQSHPMDGPASPAEADPNAEHRTA	60

Proteinseq.		DSKVITYSKNWSGAALEQPPSATYTAVSATITVPEATAVAGVTSAQASSAWVGIDGDTYA	109
Aspergillopepsin		DSKVITYSKNWSGAALEQPPSATYTAVSATITVPEATAVAGVTSAQASSAWVGIDGDTYA	120

Proteinseq.		NAILQAGVDFYVDPNGAHTYDAWFEWFPDSAHGFDMAVNRGDVVVVKVESTSPSEGVAI I	169
Aspergillopepsin		NAILQAGVDFYVDPNGAHTYDAWFEWFPDSAHGFDMAVNRGDVVVVKVESTSPSEGVAI I	180

Proteinseq.		ENQTSGQTVSTTLKAPSPTATLAGQNAEWIVEDFQSGATMVPLADFGRVEFTGCEAKAGG	229
Aspergillopepsin		ENQTSGQTVSTTLKAPSPTATLAGQNAEWIVEDFQSGATMVPLADFGRVEFTGCEAKAGG	240

Proteinseq.		KSYGLTNATIIDIQQDGKVKHTTIVSDSELVVEYVR	266
Aspergillopepsin		KSYGLTNATIIDIQQDGKVKHTTIVSDSELVVEYVR	277

Abbildung 82: Gegenüberstellung der Aspergillopepsin-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspergillopepsin) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot, das rekombinante Protein gelb unterlegt

4. Erfolgreich hergestellte Zellwandproteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte Zellwandproteine aufgeführt

Antigen	Genbank-ID
Aspf2	Afu4g09580
Aspf9/Crf1	Afu1g16190
Ecm33	Afu4g06820
Gel1	Afu2g01170
Cat1(N-term.)	Afu3g02270

Tabelle 28: Liste aller erfolgreich hergestellten Zellwandproteine

4.1 Aspf2 (Afu4g09580)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	314 AS /33,3 kDa
Signalsequenz	1-20
Größe des His ₆ -Proteins	35kDa

Tabelle 29: Informationen zu Aspf2

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 83).

Die Größe des gesamten Gens liegt bei 1020 bp (Abb. 84). Das Zielgen, welches ohne Intron und den Teil, der für die Signalsequenz kodiert, eine Größe von 886 bp haben sollte, konnte erfolgreich mit den in Tab. 30 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 56°C amplifiziert werden. Aufgrund der vorhandenen Introns wurde cDNA als Template für diese PCR eingesetzt, parallel dazu wurde eine PCR unter den gleichen Bedingungen mit chromosomaler DNA durchgeführt. Wie in Abb. 85 zu erkennen ist, zeigten beide Amplifikate jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 886 bp, bzw. 1020 bp. Anschließend wurde das Zielgen über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Zwei der getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 886 bp (Abb. 86), diese wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass beide eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 35 kDa zeigten.

Aspf2-BamHI-FOR	GCAGGATCCCCTTGTGGCCACCCTCCC
Aspf2-HindIII-REV	GCAAAGCTTCTAAGTGAATGAAGCTG

Tabelle 30: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf2-Konstrukt

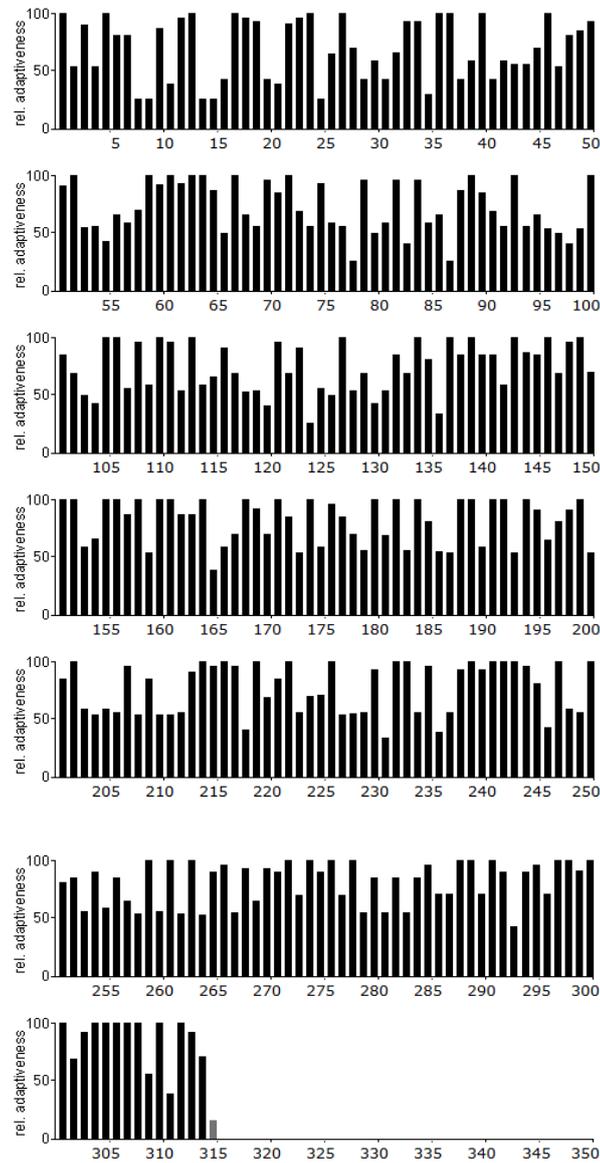


Abbildung 83: Analyse der Sequenz des Aspf2-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

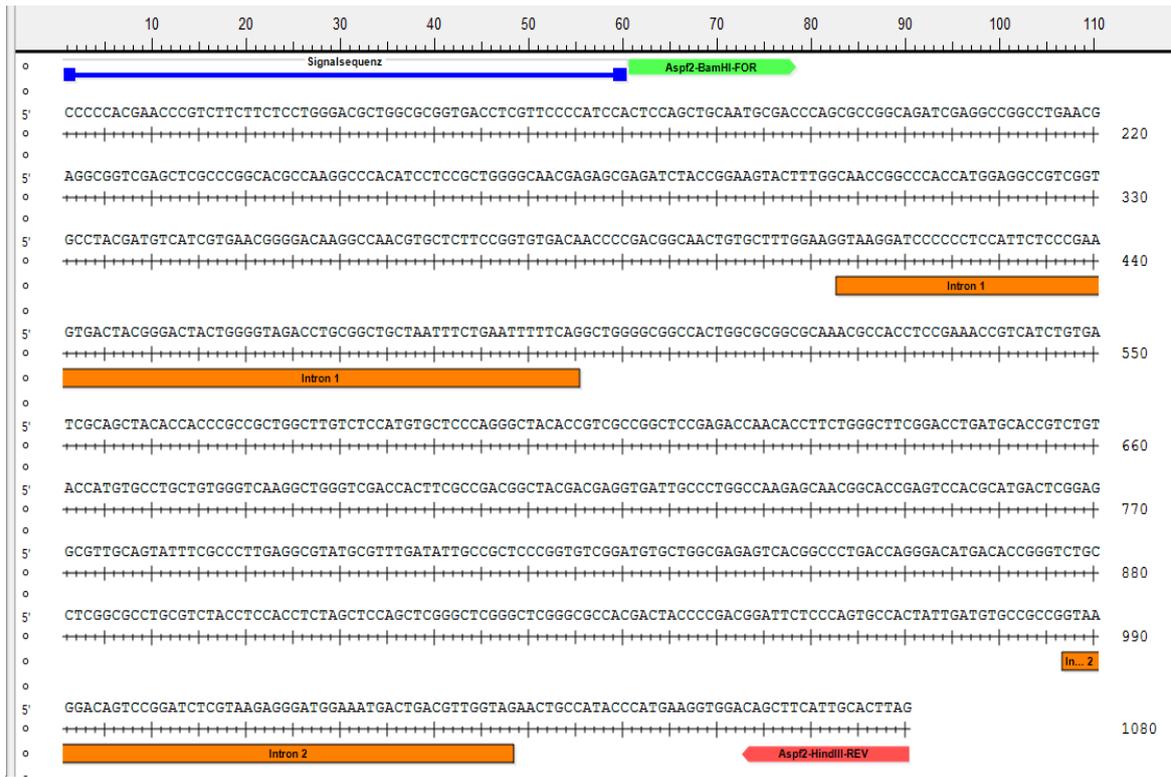


Abbildung 84: Genomische Sequenz des *Aspf2*-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, die beiden Introns orange. Der *forward primer* wurde grün, der *reverse primer* rot dargestellt

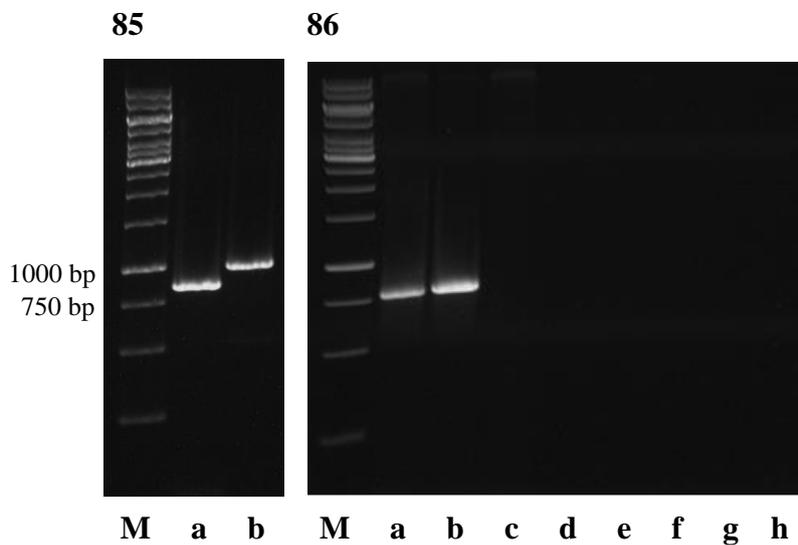


Abbildung 85: Amplifikat der PCR von *Aspf2*. Die Banden der beiden PCR-Produkte aus der Amplifizierung mit cDNA (Spur a) und chromosomaler DNA (Spur b) stimmen mit den erwarteten Größen überein (886 bp, bzw. 1020 bp)

Abbildung 86: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen *Aspf2* Klonen im Agarosegel, die ersten zwei zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 886 bp (Spuren a,b)

Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer*, sie bestätigte, dass AspF2 ohne Signalsequenz erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 87).

Bei der darauffolgenden Reinigung über die Talonsäule zeigte sich, dass der Großteil des Proteins in Elution 2 und Elution 3 zu finden waren (Abb. 88). Dieses Protein ließ sich über den Elutionspuffer aus der Säulenmatrix komplett lösen.

Eine Dialyse und eine LPS-Messung fanden bei diesem Protein bisher aus Zeitgründen nicht statt. Prinzipiell war dieser Versuchsteil dennoch erfolgreich.

Proteinseq.	-----HHHGS	LVATLPTSPVPIAARATPHEPVFFSWDAGAVTSFPIHSSC	46
AspF2	MYSQMAALLRLAVLLPLA	LVATLPTSPVPIAARATPHEPVFFSWDAGAVTSFPIHSSC	60
	:	*****	
Proteinseq.		NATQRRQIEAGLNEAVELARHAKAHILRWGNESEIYRKYFGNRPTMEAVGAYDVIIVNGDK	106
AspF2		NATQRRQIEAGLNEAVELARHAKAHILRWGNESEIYRKYFGNRPTMEAVGAYDVIIVNGDK	120

Proteinseq.		ANVLFRCNDNPDGNCALGEGWGHWRGANATSETVICDRSYTTRRWLVSMCSQGYTVAGSET	166
AspF2		ANVLFRCNDNPDGNCALGEGWGHWRGANATSETVICDRSYTTRRWLVSMCSQGYTVAGSET	180

Proteinseq.		NTFWASDLMHRLYHVPVAVGQGWVDHFADGYDEVIALAKSNGTESTHDSEALQYFALEAYA	226
AspF2		NTFWASDLMHRLYHVPVAVGQGWVDHFADGYDEVIALAKSNGTESTHDSEALQYFALEAYA	240

Proteinseq.		FDIAAPGVGCAGESHGPDQGHDTGSASAPASTSTSSSSSGSGGATTTPDPSATIDVP	286
AspF2		FDIAAPGVGCAGESHGPDQGHDTGSASAPASTSTSSSSSGSGGATTTPDPSATIDVP	300

Proteinseq.		PNCHTHEGGQLHCT--	300
AspF2		PNCHTHEGGQLHCT--	314

Abbildung 87: Gegenüberstellung der AspF2-Proteinsequenz aus der Datenbank (AspF2) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün gekennzeichnet, die Signalsequenz rot. Das rekombinante Protein ist gelb unterlegt

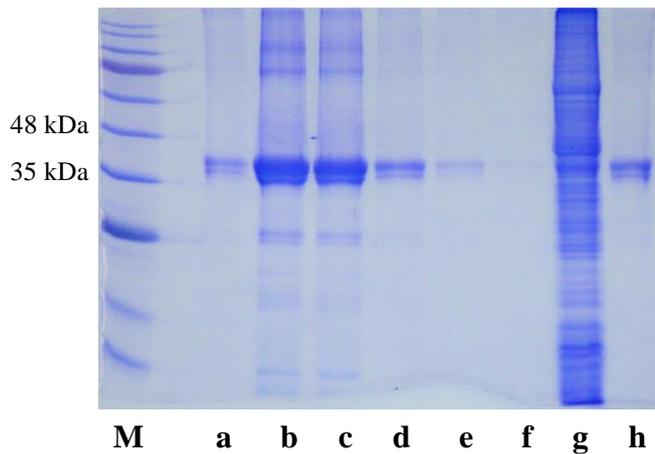


Abbildung 88: Talonreinigung von Asp2. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-f) mit dem Elutionspuffer, Spur g zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur h die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

4.2 Asp9/Crf1 (Afu1g16190)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	395AS / 40,3kDa
Signalsequenz	1-19
Größe des His ₆ -Proteins	50 kDa

Tabelle 31: Informationen zu Asp9

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 89).

Aspf9 ist das bisher beste Aspergillus T-Zell-Antigen und wurde daher bereits zu Beginn des Projekts bearbeitet. Asp9 setzt sich aus drei Exons, die durch zwei Introns unterbrochen werden, zusammen (Abb. 90). Da das erste Expressionskonstrukt noch nicht von cDNA amplifiziert werden konnte, wurde die Methode der Fusions-PCR angewendet. Da von den 88 Nukleotiden des ersten Exons 57 für die Signalsequenz kodieren, wurde das erste Exon nicht mitkloniert, so dass nur Exon 2 und Exon 3 amplifiziert werden sollten. Exon 2 hat eine Größe von 278 Nukleotiden, Exon 3 822 Nukleotide. Die Größe des zu erwarteten Gesamtkonstruktes lag somit bei 1100 Nukleotiden.

In einer ersten PCR wurde, mittels chromosomaler DNA, Exon 2 erfolgreich amplifiziert und in einer weiteren davon unabhängigen Exon 3 (Abb. 91). Die

verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 32 aufgeführt. Anschließend wurden beide DNA-Fragmente gereinigt und ihre Konzentrationen über das NanoDrop bestimmt.

Die Konzentration von Exon 2 lag bei 38,1 ng/μl und die von Exon 3 bei 15,5 ng/μl. Um ein gleichmäßiges Verhältnis der beiden DNA-Fragmente herzustellen, wurden die eingesetzten Mengen für die darauffolgende Fusions-PCR angepasst. Es sollte eine Menge von 100 ng pro Fragment eingesetzt werden, was 2,62 μl von Exon 2 und 6,45 μl von Exon 3 entsprach.

Anschließend erfolgte die eigentliche Fusions-PCR, welche in zwei Phasen eingeteilt werden kann. In der ersten, kürzeren, Phase wurden Exon 2 und 3 bei 98°C für 30 s initial denaturiert. Daraufhin erfolgten neun Wiederholungen der folgenden drei Schritte: 98°C für 10 s (Denaturierung), 30 s bei 72°C und schließlich 1 min bei 72°C, in denen die aneinandergelagerten Fragmente aufgefüllt wurden.

Danach folgte Phase zwei, in der die äußeren Primer, Aspf9-FOR-BamHI und Aspf9-REV-HindIII, hinzugegeben wurden. Anschließend erfolgte eine PCR nach dem Standard-Protokoll. Die Temperatur für die Primeranlagerung lag in diesem Fall bei 72°C, die Elongationsdauer betrug 1 min. Das anschließende Agarosegel des Fusionsproduktes zeigte, dass das Amplifikat eine Größe von etwa 1100 bp besaß (Abb. 92). Dies entsprach einer Addition der Größen der beiden Exons. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die beiden DNA-Fragmente erfolgreich fusioniert wurden.

Die Klone, die nach Klonierung des Amplifikats in den Vektor pQE30 über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen und der darauffolgenden Transformation in *E. coli* (M15) entstanden, wurden auf Expression getestet.

Auffällig hierbei war, dass die induzierte Bande bei allen Klonen bei einer Größe von 25 kDa zu sehen war, die eigentliche Größe des Aspf9-Proteins jedoch bei knapp 50 kDa liegen sollte, wie in Abb. 93 zu sehen ist.

In den Coomassie-Gelen der darauffolgenden Reinigung gab es meist zwei Banden (Abb. 94 und Abb. 95). Die obere Bande stimmte mit der erwarteten Größe von etwa 50 kDa überein, die untere Bande war bei etwa 25 kDa zu

beobachten. Daraus entstand die Annahme, dass es sich bei der oberen Bande um das Gesamtprotein handelte und die untere Bande ein degradiertes Fragment darstellte.

Aspf9-FOR-BamHI	ACTGGATCCAAGACCTGCCCGCCCAACAAG
Aspf9-REV	GTCACCGCCCAATACTTCCCAGTCAACCTCATCCAGATC
Aspf9-FOR	CTGGATGAGGTTGACTGGGAAGTATTGGGCGGTGACAC
Aspf9-REV-HindIII	ACTAAGCTTTTAGAATGCCAACACGGCAG

Tabelle 32: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf9-Konstrukt

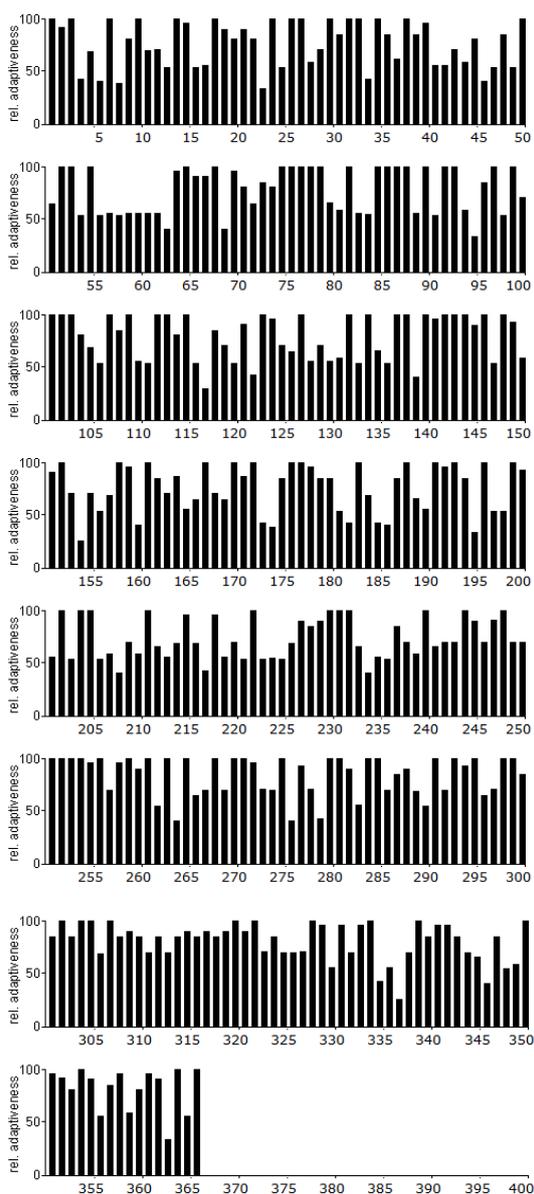


Abbildung 89: Analyse der Sequenz des Aspf9-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

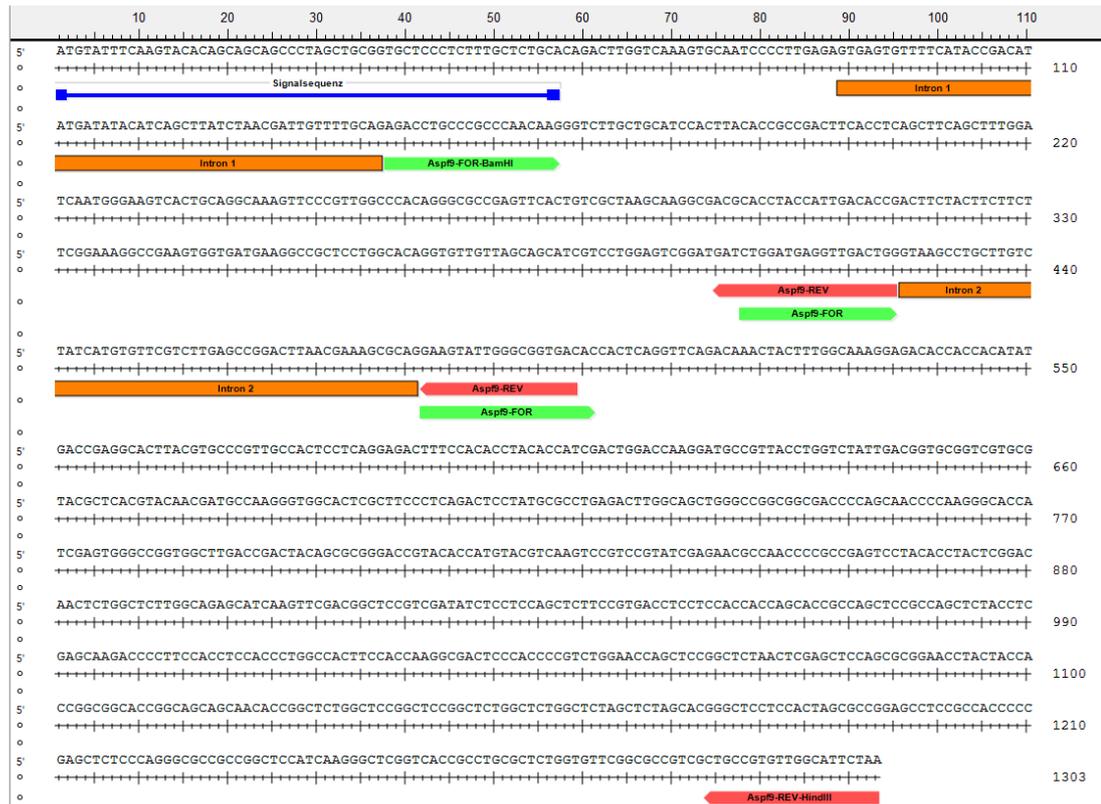


Abbildung 90: Genomische Sequenz des Aspf9-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, die Introns orange. Die forward primer sind grün und die reverse primer rot dargestellt

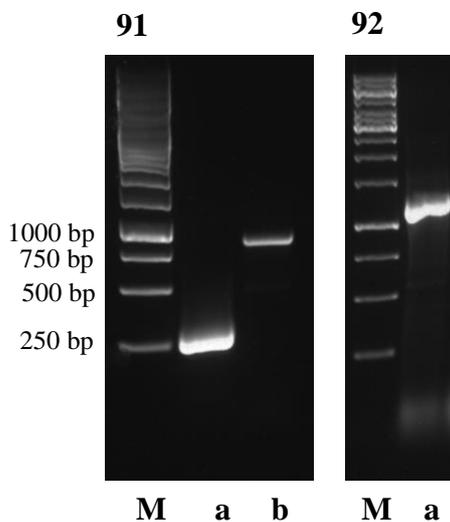


Abbildung 91: Amplifikat der PCR von Aspf9. Spur a zeigt das Amplifikat des zweiten Exon, Spur b das des dritten. Die Größen der beiden Amplifikate stimmen mit den erwarteten Größen von 278 bp, bzw. 822bp überein

Abbildung 92: Fusionsprodukt von Aspf9 (Spur a), die Größe stimmt mit der erwarteten von 1100 bp überein

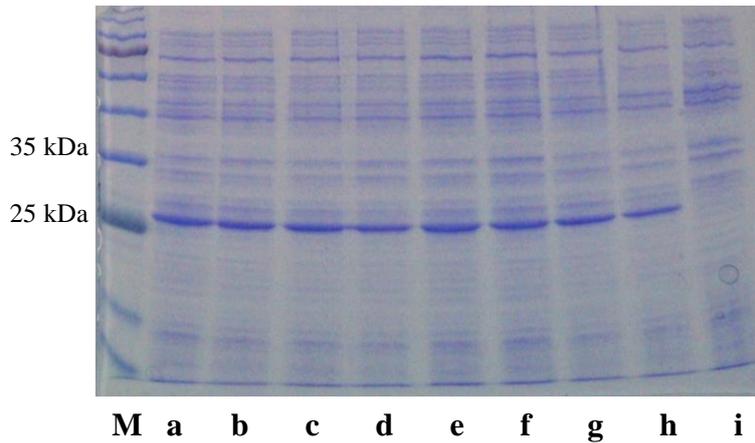


Abbildung 93: Coomassie-Gel der AspF9 Klone, alle zeigen eine induzierte Bande etwas über der 25 kDa Markierung (Spuren a-h), Spur i zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG. Die induzierte Bande des rekombinanten AspF9-Proteins wurde jedoch bei 50 kDa erwartet.

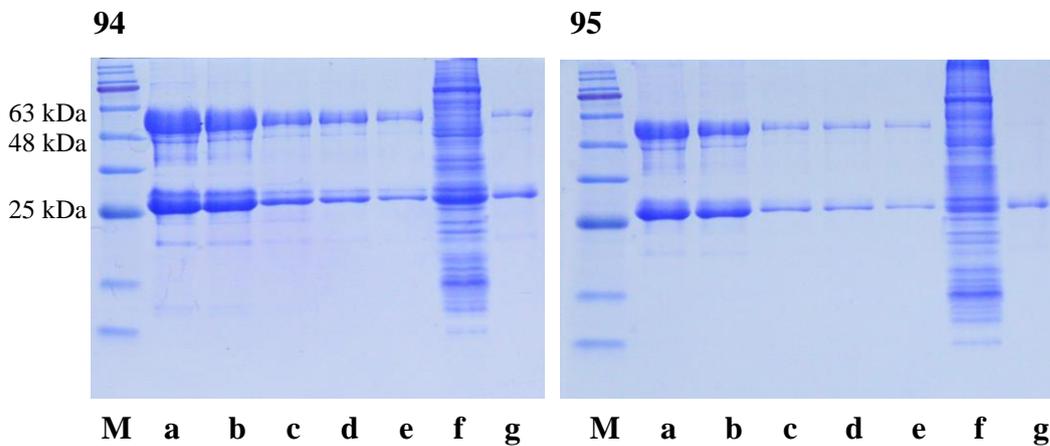


Abbildung 94: Talonreinigung von AspF9. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e), die mit dem Elutionspuffer von der Säule gelöst wurden. Spur f zeigt den Durchlauf der Probe an, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* löste

Abbildung 95: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von AspF9. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) des zweiten Durchganges der Reinigung mit Elutionspuffer. Spur f zeigt den Durchlauf der Probe, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* löste

Die Sequenzierung erfolgte erst verspätet mit dem *pQE30-forward-primer* und zeigte, dass die Fusion der beiden DNA-Fragmente erfolgreich war. Durch eine Deletion an Position 752 kam es jedoch zu einem Abbruch des Leserasters. Von den 367 Aminosäuren des reifen Proteins waren also nur 193 Aminosäuren in dem verkürzten rekombinanten Protein, sowie 12 proteinfremde Aminosäuren (Abb.

96). Auffällig war, dass alle der acht getesteten Klone diese Deletion hatten. Somit kam es zu einer neuen Interpretation der beiden Banden, die im Coomassie-Gel der Reinigung zu sehen war. Die untere Bande war demnach das volle Länge Protein, während es sich bei der oberen Bande um ein Dimer handelte.

Proteinseq.	-----HHHHHGSKTCPPNKGLAASTYTADFTSASALDQWEVTA	39
Aspf9	MYFKYTAALAAVLPLCSAQWTKCNPLEKTCPPNKGLAASTYTADFTSASALDQWEVTA	60
	: : .*****	
Proteinseq.	GKVPVGPQGAEFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSIVLESDDLDEV	99
Aspf9	GKVPVGPQGAEFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSIVLESDDLDEV	120

Proteinseq.	DWEVLGGDTTQVQTNYFGKGDTTTTYDRGYVVPVATPQETFHTYTIIDWTKDAVTWSIDGAV	159
Aspf9	DWEVLGGDTTQVQTNYFGKGDTTTTYDRGYVVPVATPQETFHTYTIIDWTKDAVTWSIDGAV	180

Proteinseq.	VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDEATPRAPSSGPVA-----	203
Aspf9	VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDESNPKGTIEWAGGLTDYSAGPYTMVKS	240
	*****:.*: . . .	
Proteinseq.	-----	203
Aspf9	RIENANPAESYTYSDNSGSWQSIKFDGSVDISSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTST	300
Proteinseq.	-----	203
Aspf9	LATSTKATPTPSGTSSGSNSSSSAEPTTTGGTGSSNTGSGSGSGSGSSSTGSSTTSAG	360
Proteinseq.	-----	203
Aspf9	ASATPELSQGAAGSIKGSVTACALVFGAVAAVLAF	395

Abbildung 96: Gegenüberstellung der Aspf9-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf9) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot, das rekombinante Protein gelb unterlegt

Die Reinigungen von Aspf9 verliefen teils mit sehr unterschiedlichen Konzentrationen der Elutionen. In der Regel löste sich mit dem Elutionspuffer aus der Matrix und der Großteil des Proteins war in den ersten beiden Elutionen zu finden (Abb. 94 und Abb. 95).

Die Dialyse zu 1 M Harnstoff und die anschließende Zentrifugation erfolgten mit sehr geringen Verlusten bei der Konzentration (Abb. 97).

Bei Aspf9 kam es bei voneinander unabhängigen Reinigungen zu sehr unterschiedlichen LPS-Werten von 1,2 EU/ml bis zu > 100 EU/ml. Daher standen nicht alle gereinigten Aspf9-Proben für den Einsatz im ELISpot Assay und im Vollblut-ELISA zur Verfügung.

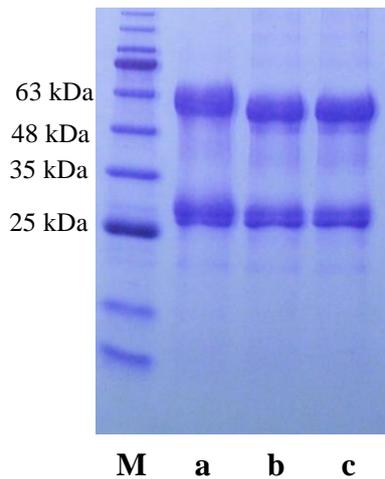


Abbildung 97: Dialyse von Aspf9. Zustand der Probe vor Dialyse (Spur a), die Probe nach der Dialyse (Spur b) und die Probe nach Dialyse sowie anschließender Zentrifugation (c)

In einem folgenden Versuch wurde eine Aspf9 Probe mit >100 EU/ml über eine Endotoxin-Säule nachgereinigt (*Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Wash Columns*, ThermoScientific). Jedoch kam es hierbei zu keiner erfolgreichen LPS-Abreicherung, der Wert war mit > 100 EU/ml genauso hoch wie zuvor.

Eine weitere Möglichkeit den LPS-Gehalt zu reduzieren, sollte über eine Transformation in einen gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm (ClearColi™-K12, Lucigen) in einem Pilotexperiment getestet werden.

Die Transformation in diesen *E. coli*-Stamm verlief auf Anhieb erfolgreich und es konnte ein exprimierender Klon identifiziert werden, der ein ähnliches Expressionslevel wie die Klone im M15-Stamm hatte. Die nach der Reinigung durchgeführte LPS-Bestimmung lieferte einen Wert von < 1 EU/ml und war somit für den ELISpot Assay und den Vollblut-ELISA geeignet.

Da sich im Laufe des Projekts die Herstellung von cDNA entwickelt hatte und auch der Einsatz erfolgreich war, sollte Aspf9 auch aus cDNA amplifiziert werden.

Daher wurde in einem weiteren Versuch cDNA für die Amplifikation eingesetzt. Exon 1 sollte erneut von der Klonierung ausgeschlossen werden, da die ersten 57 der insgesamt 88 Nukleotide für die Signalsequenz kodieren. Hierfür wurden die bereits bei der Fusions-PCR eingesetzten äußeren Primer (Aspf9-FOR-BamHI und Aspf9-REV-HindIII) verwendet. Das PCR-Produkt sollte eine Größe von 1100 bp besitzen. Es wurde ein dreifacher Ansatz angefertigt, zur Kontrolle wurde

parallel mittels chromosomaler DNA ein Amplifikat hergestellt, welches eine Größe von 1156 bp besitzen sollte. Ansatz zwei und drei zeigten dabei eine Bande, die dem erwarteten Molekulargewicht der beiden Fragmente von 1100 bp entspricht. Das Amplifikat, welches mit Hilfe der chromosomalen DNA hergestellt wurde, war circa 50 Basenpaare größer, was der Größe des Introns entspricht (Abb.98). Die PCR-Produkte aus Ansatz zwei und drei wurden für die anschließende Klonierung verwendet.

Anschließend wurden die beiden PCR-Produkte gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die dabei entstandenen Klone wurden zuerst mittels PCR getestet. Klon 1 und 8 zeigten eine sehr schwache Bande, welche auf der richtigen Höhe von 1100 bp zu erkennen war, diese beiden wurden anschließend auf Expression getestet. Bei beiden Klonen konnte eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 50 kDa beobachtet werden. Das Expressionlevel war durchschnittlich (Abb 99).

Die anschließende Sequenzierung bestätigte, dass das Gen erfolgreich ab dem 2. Exon in den Vektor kloniert werden konnte und zeigte, dass keine Deletion vorhanden war (Abb. 100). Die zuvor aufgetretene Deletion war daher nicht auf den von uns eingesetzten Stamm AfS35 zurückzuführen.

Aus Zeitgründen fand keine Reinigung statt, aber es steht nun ein Expressionskonstrukt für weitere Versuche zur Verfügung, da AspF9 sicher auch in Folgearbeiten eingesetzt werden wird.

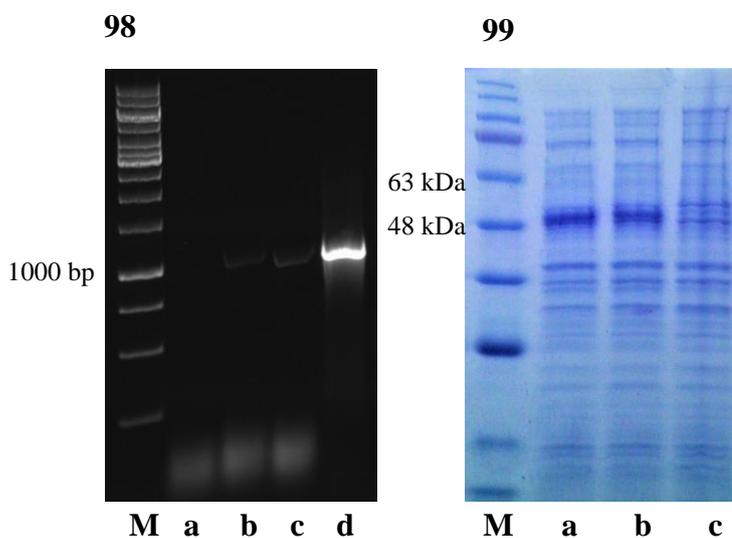


Abbildung 98: Amplifikat der PCR von AspF9 (cDNA). Die PCR-Produkte aus der PCR mit der cDNA. Bei Ansatz zwei (Spur b) und drei (Spur c) liegt jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 1100 bp. Der Ansatz mit der chromosomalen DNA zeigt eine deutlichere Bande, welche mit einer Größe von 1156 bp der erwarteten Größe entspricht

Abbildung 99: Coomassie-Gel der Lysate der AspF9 Klone (cDNA). Klon 1 (Spur a) und Klon 8 (Spur b) nach Induktion, beide zeigen eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 50 kDa, Spur c zeigt die Kontrolle ohne IPTG-Zugabe

Proteinseq. AspF9	-----HHHHHHSKTCPPNKGAASTYTADFTSASALDQWEVTA MYFKYTAALAAVPLCSAQTWSKCNPLEKTCPPNKGAASTYTADFTSASALDQWEVTA : : .*****	39 60
Proteinseq AspF9	GKVPVGPQGAEFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSIVLESDDLDEV GKVPVGPQGAEFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSIVLESDDLDEV *****	99 120
Proteinseq AspF9	DWEVLGGDTTQVQTNFYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYTIIDWTKDAVTWSIDGAV DWEVLGGDTTQVQTNFYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYTIIDWTKDAVTWSIDGAV *****	159 180
Proteinseq. AspF9	VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGWSWAGGDPSNPKGTIEWAGGLTDYSAGPYTMYVKS VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGWSWAGGDPSNPKGTIEWAGGLTDYSAGPYTMYVKS *****	219 240
Proteinseq. AspF9	RIENANPAESYTYSDNSGSWQSIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTST RIENANPAESYTYSDNSGSWQSIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASSTSSKTPSTST *****	279 300
Proteinseq. AspF9	LATSTKATPTPSGTSSGSNSSSSAEPTTTGGTSSNTGSGSGSGSGSSSTGSSTAG LATSTKATPTPSGTSSGSNSSSSAEPTTTGGTSSNTGSGSGSGSGSSSTGSSTAG *****	338 360
Proteinseq. AspF9	ASATPELSQGAAGSIKGSVTACALVFGAVAAVLAF 373 ASATPELSQGAAGSIKGSVTACALVFGAVAAVLAF 395 *****	

Abbildung 100: Gegenüberstellung der AspF9-Proteinsequenz aus der Datenbank (AspF9) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (AspF9). Die Signalsequenz ist rot markiert, das His-tag grün. Das erste Exon wurde grau unterlegt, das rekombinante Protein, bestehend aus Exon 2 und Exon 3, gelb

4.3 Ecm33 (Afu4g06820)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	398AS / 41,5 kDa
Signalsequenz	1-19
Größe des His ₆ -Proteins	45 kDa

Tabelle 33: Informationen zu Ecm33

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 101).

Das Gen besitzt zwei Introns, kodiert eine Signalsequenz und hat eine Gesamtgröße von 1324 bp (Abb.102). Es wurde über eine Fusions-PCR mit den in Tab. 34 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 72°C über amplifiziert. Aufgrund der Anordnung der Signalsequenz und des unmittelbar darauffolgenden Introns, sollte das erste Fragment erst ab dem 2. Exon beginnen und somit eine Größe von 840 bp besitzen. Das 3. Exon besitzt eine Größe von 295 bp. Der für die Klonierung vorgesehene Bereich sollte daher einer Gesamtgröße von 1135 bp besitzen. Die beiden Amplifikate wurden über eine Fusions-PCR fusioniert, nach der Überprüfung im Agarosegel, welches zeigte, dass das fusionierte PCR-Produkt eine Bande mit der erwarteten Größe von 1135 bp zeigte (Abb. 103), gereinigt und über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die bei dieser Transformation entstandenen Klone wurden per PCR überprüft, einer konnte als positiv identifiziert werden (Abb. 104). Bei der darauffolgenden Überprüfung auf Expression zeigte sich bei dem Klon eine induzierte Bande, die der erwarteten Größe von 45 kDa entsprach (Abb. 105).

Eine Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 106).

Auf eine Reinigung wurde bei diesem Protein aus Zeitgründen verzichtet.

Ecm33-BamHI-FOR	ACTGGATCCTGCGGTAAGACCGATGAG
Ecm33-Exon1-REV	GTTTGGGCATGCTCACTCTCGTCGAACTTGCCGCTGAAGT
Ecm33-Exon2-FOR	TCAGCGGCAAGTTTCGACGAGAGTGAGCATGCCCAAATC
Ecm33-HindIII-REV	ACTAAGCTTGTGCAGTACGTTTTGTAA

Tabelle 34: Verwendete Oligonukleotide für das Ecm33-Konstrukt

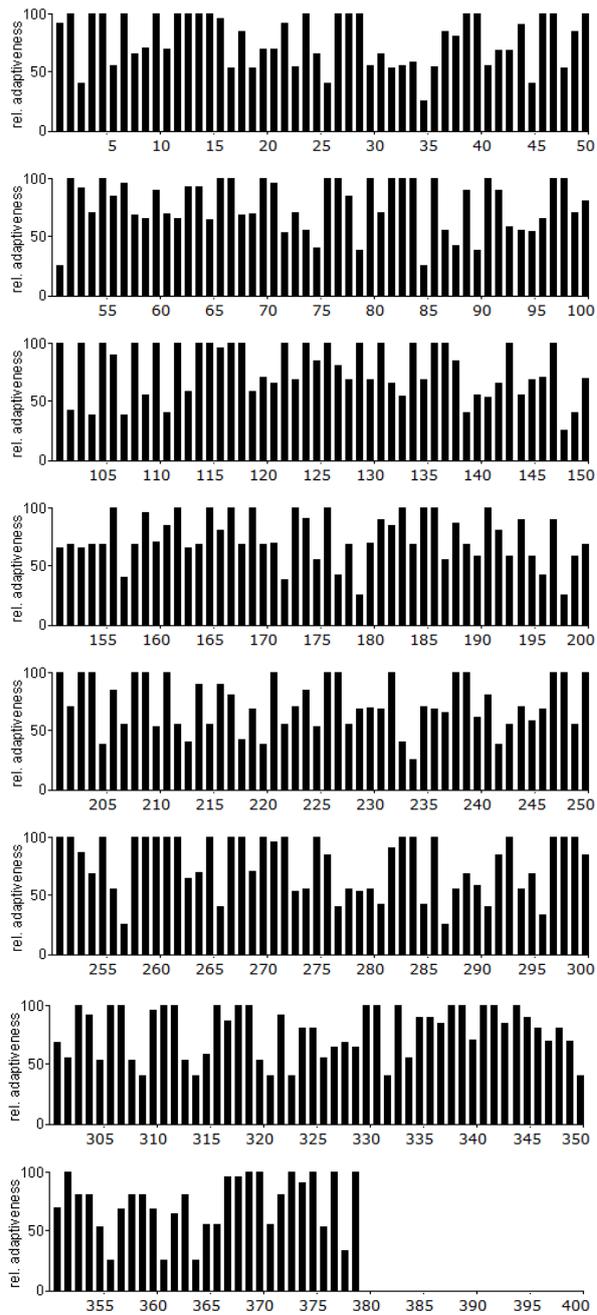


Abbildung 101: Analyse der Sequenz des Ecm33-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.



Abbildung 102: Genomische Sequenz des Ecm33-Gens, die beiden Introns sind orange dargestellt, die Signalsequenz blau, die *forward primer* sind grün und die *reverse primer* rot markiert

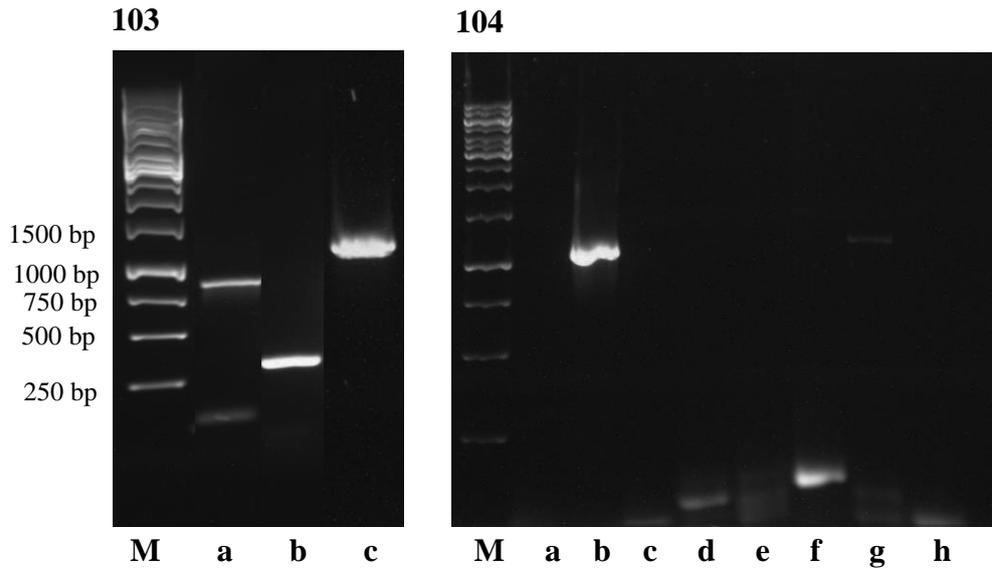


Abbildung 103: Amplifikat der PCR von Ecm33. Spur a zeigt das erste Fragment, Spur b das zweite, in Spur c ist das fusionierte PCR-Produkt abgebildet. Alle Banden stimmen mit den erwarteten Größen von 840 bp, bzw. 295 bp und 1135 bp überein

Abbildung 104: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Ecm33 Klonen im Agarosegel, ein Klon zeigt eine Bande bei der erwarteten Größe von 1135 bp (Spur b)

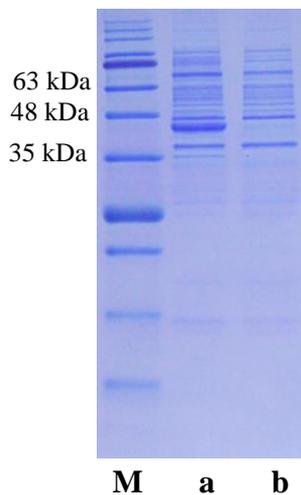


Abbildung 105: Coomassie-Gel des Ecmss Klons, er zeigt eine induzierte Bande bei der erwarteten Größe von 45 kDa (Spur a), die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG ist in Spur b zu sehen

Proteinseq.	-----HHHHHGS	ANCGKTDEITITISSQSDADGYSSCSTIKGTIEIDEHLSGAI	49
Ecm33	MAFLKYALPALAAQA	ANCGKTDEITITISSQSDADGYSSCSTIKGTIEIDEHLSGAI	60
	:	:*****	
Proteinseq.		TFNNVKQIDGTLSC	109
Ecm33		TFNNVKQIDGTLSC	120

Proteinseq.		ALPQLQSLDFTKGV	169
Ecm33		ALPQLQSLDFTKGV	180

Proteinseq.		TGLINFAGNLNSLE	229
Ecm33		TGLINFAGNLNSLE	240

Proteinseq.		LTETGDLVFNSNSK	289
Ecm33		LTETGDLVFNSNSK	300

Proteinseq.		EVSMPKLENVKGQFN	349
Ecm33		EVSMPKLENVKGQFN	360

Proteinseq.		SSGSASASKSNAADL	387
Ecm33		SSGSASASKSNAADL	398

Abbildung 106: Gegenüberstellung der Ecm33-Proteinsequenz aus der Datenbank (Ecm33) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün dargestellt, die Signalsequenz rot, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

4.4 Gel1 (Afu2g01170)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	452AS / 48,1kDa
Signalsequenz	1-19
Größe des His ₆ -Proteins	51kDa

Tabelle 35: Informationen zu Gel1

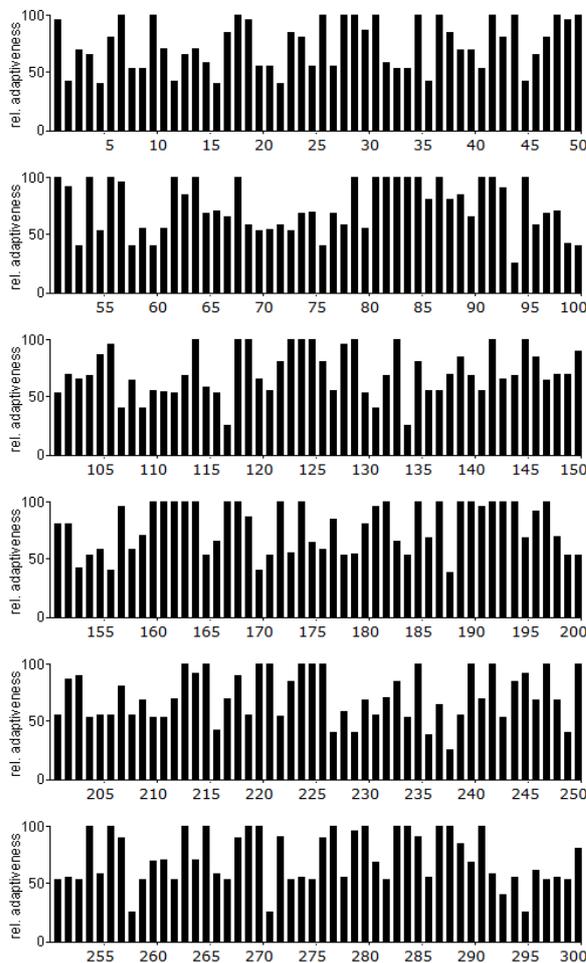
Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 107).

Das Gen besitzt eine Signalsequenz, ein Intron und hat eine Gesamtgröße von 1420 bp. Exon 1 besitzt, ohne Signalsequenz, eine Größe von 540 bp, Exon 2 umfasst 763 bp (Abb. 108). Diese zwei Fragmente sollten unabhängig voneinander amplifiziert und später über eine Fusions-PCR miteinander fusioniert werden. Das zusammengesetzte Konstrukt sollte daher eine Gesamtgröße von 1303 bp haben. Sowohl Exon 1 als auch Exon 2 konnten mit den in Tab. 36 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 72°C erfolgreich

amplifiziert und später fusioniert werden. Im Agarosegel konnte jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 540 bp, bzw. 763 bp beobachtet werden (Abb. 109). In Abb. 110 ist zu sehen, dass das fusionierte Produkt eine Größe von 1303 bp besaß, was der erwarteten Größe entsprach. Anschließend wurde das fusionierte und gereinigte PCR-Produkt über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Einer konnte dabei als positiv identifiziert werden (Abb.111). Dieser wurde im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte er eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 51 kDa (Abb. 112).

Gel1-BamHI-FOR	ACTGGATCCGCCCTCCATCAAGGCTCGT
Gel1-REV	GTTGGTGTGCATATCGGCAGCCGAGTAGCCGACAGGAA
Gel1-FOR	CCTGTCGGCTACTCGGCTGCCGATATCGACACCAACCG
Gel1-HindIII-REV	ACTAAGCTTTCACAAGAGGACGAGGCCAG

Tabelle 36: Verwendete Oligonukleotide für das Gel1-Konstrukt



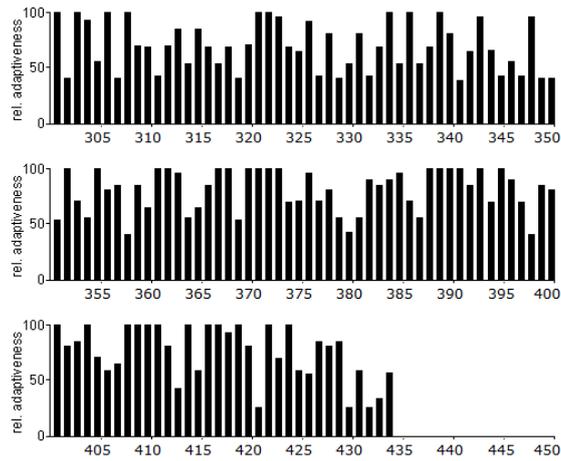


Abbildung 107: Analyse der Sequenz des Gell1-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

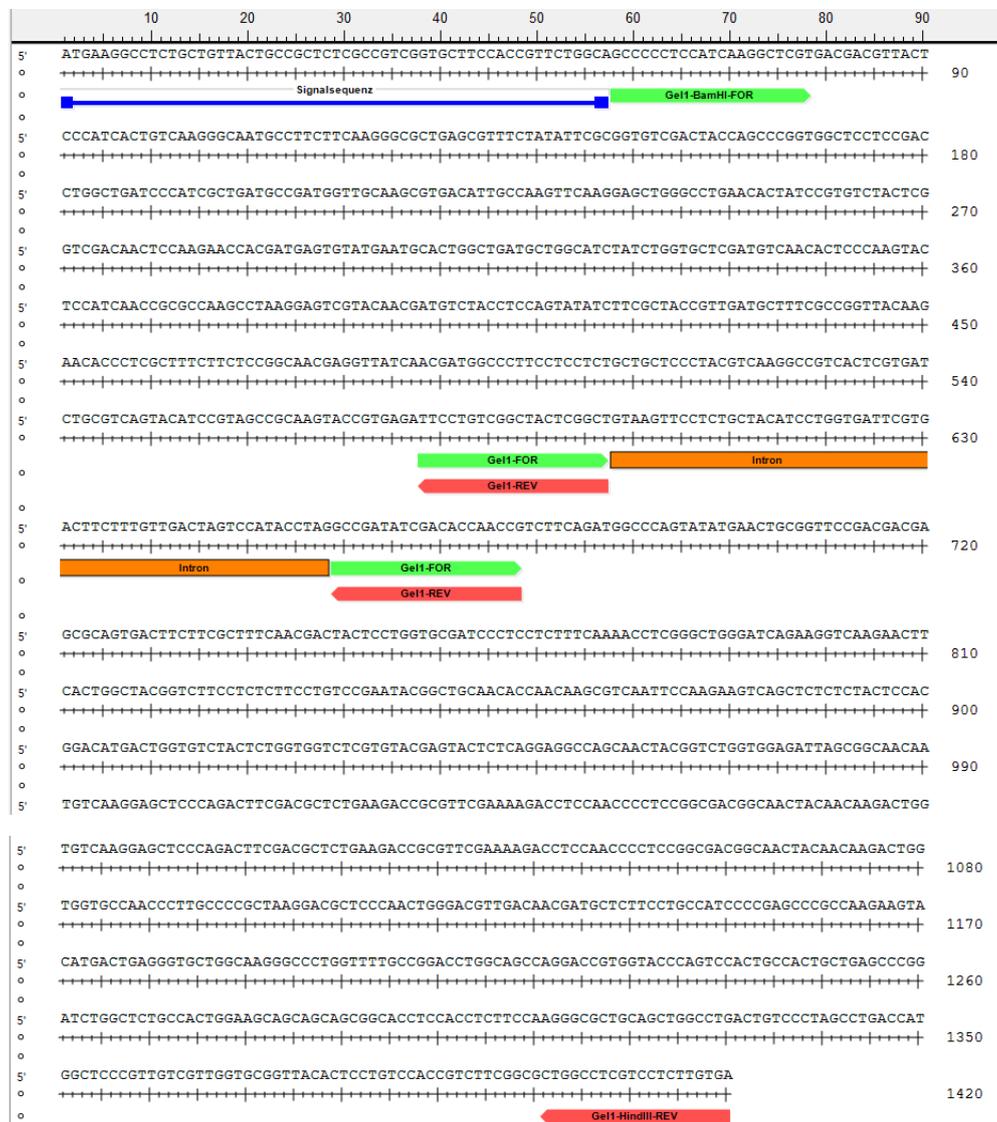


Abbildung 108: Genomische Sequenz des Gell1-Gens, das Intron ist orange dargestellt, die Signalsequenz blau, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

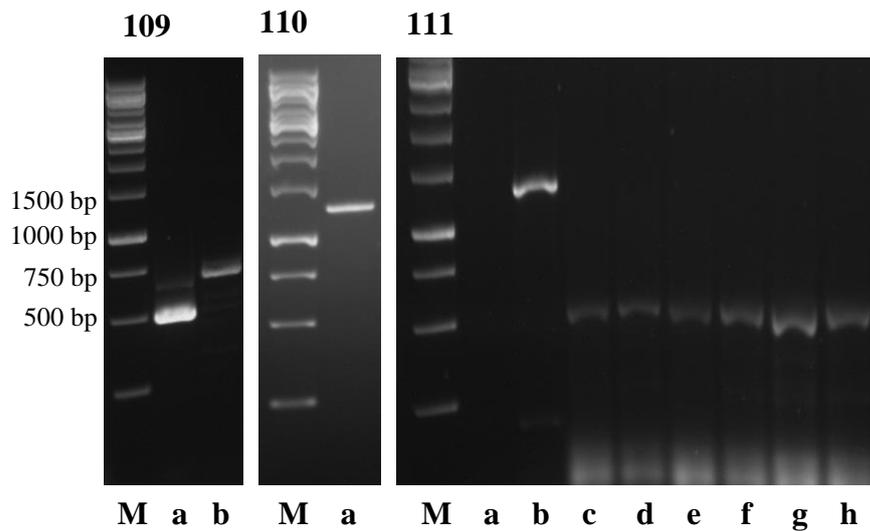


Abbildung 109: Amplifikat der PCR von Gel1. Spur a entspricht Exon 1 mit der erwarteten Größe von 540 bp, Spur b zeigt Exon 2 mit der erwarteten Größe von 763 bp.

Abbildung 110: Fusionsprodukt von Gel1 (Spur a), die Bande stimmt mit der erwarteten Größe von 1303 bp überein

Abbildung 111: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation entstandenen Gel1 Klonen im Agarosegel. Ein Klon (b) zeigt eine Bande bei der erwarteten Größe von 1303 bp.

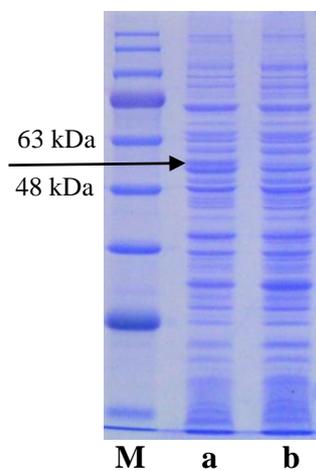


Abbildung 112: Coomassie-Gel des Gel1 Klon. Dieser zeigt eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 51 kDa (Spur a), Spur b zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG. Da die induzierte Bande nicht so deutlich erkennbar ist, wurde sie hier mit einem Pfeil markiert

Die anschließende Sequenzierung des Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 113).

Bei der darauffolgenden Reinigung waren die Konzentrationen in allen Elutionen

gleichmäßig verteilt, jedoch verhältnismäßig gering, außerdem ist in Abb. 114 zu sehen, dass nicht alles Protein an die Säule gebunden hatte und noch im Durchlauf aufzufinden war, daher wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und eluiert (Abb. 115). Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie im ersten Durchgang. Dieses Protein zeigt also eine deutlich geringere Bindung mit der Talonmatrix.

Im Anschluss wurden die Dialyse auf 1 M Harnstoff (Abb. 116) sowie die LPS-Messung durchgeführt, der LPS-Wert wurde mit < 1 EU/ml gemessen. Die Probe muss wahrscheinlich noch aufkonzentriert werden, sie ist prinzipiell jedoch für den Einsatz im ELISpot Assay und im Vollblut-ELISA geeignet.

Proteinseq.	-----HHHHHGS	APSIKARDDVTPITVKGNAFFKGAERFYIRGVYQPGGSSD	49
Gell		MKASAVTAALAVGASTVLAAPSIKARDDVTPITVKGNAFFKGAERFYIRGVYQPGGSSD	60
		:*****	
Proteinseq.		LADPIADADGCKRDI AKFKELGLN TIRVYSVDNSKNHDECMNALADAGIYLVLDVNTPKY	109
Gell		LADPIADADGCKRDI AKFKELGLN TIRVYSVDNSKNHDECMNALADAGIYLVLDVNTPKY	120

Proteinseq.		SINRAKPKE SYNDVYLQYIFATVDAFAGYKNTLAFSGNEVINDGPSSSAAPYVKA VTRD	169
Gell		SINRAKPKE SYNDVYLQYIFATVDAFAGYKNTLAFSGNEVINDGPSSSAAPYVKA VTRD	180

Proteinseq.		LRQY IRSRKYREI PVGYSAADIDTNR LQMAQYMNCGSDDERSDFFAFN DYSWCDPSSFKT	229
Gell		LRQY IRSRKYREI PVGYSAADIDTNR LQMAQYMNCGSDDERSDFFAFN DYSWCDPSSFKT	240

Proteinseq.		SGWDQKVNFTGYGLPLFLSEYGCNTNKRQFQEVSSLYSTDMTGVYSGGLVYEYSQEASN	289
Gell		SGWDQKVNFTGYGLPLFLSEYGCNTNKRQFQEVSSLYSTDMTGVYSGGLVYEYSQEASN	300

Proteinseq.		YGLVEISGNNVKELPDFDALKTAFEKTSNPSGDGNYNKTGGANPCPAKDA PNWDVDNDAL	349
Gell		YGLVEISGNNVKELPDFDALKTAFEKTSNPSGDGNYNKTGGANPCPAKDA PNWDVDNDAL	360

Proteinseq.		PAIPEPAKKYMEGAGKPGFAGPGSQDRGTQSTATAEPGSGSATGSSSSGTSTSSKGAA	509
Gell		PAIPEPAKKYMEGAGKPGFAGPGSQDRGTQSTATAEPGSGSATGSSSSGTSTSSKGAA	420

Proteinseq.		AGLTVPSLTMAPVVVGAVTLLSTVFGAGLVLL	541
Gell		AGLTVPSLTMAPVVVGAVTLLSTVFGAGLVLL	452

Abbildung 113: Gegenüberstellung der Gell-Proteinsequenz aus der Datenbank (Gell) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Rot gekennzeichnet ist die Signalsequenz, das His-tag ist grün markiert, gelb unterlegt ist das rekombinante Protein

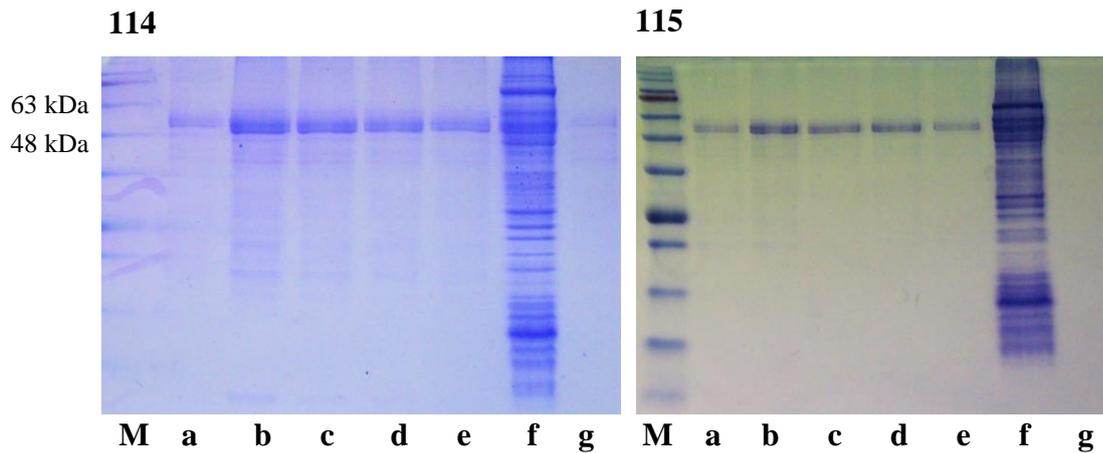


Abbildung 114: Talonreinigung von Gell1. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur g zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur h die Fraktion, welches sich bei der Elution mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 115: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Gell1, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e), der Durchlauf (Spur f) und die Fraktion (Spur g), die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösen ließ

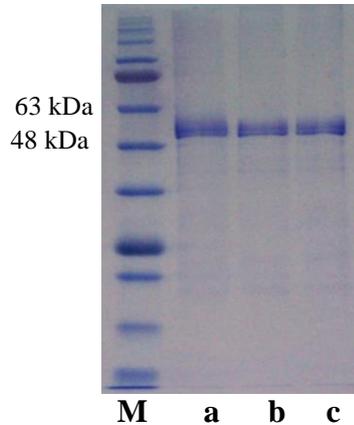


Abbildung 116: Dialyse von Gell1, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

4.5 Cat1 (N-Terminus, Afu3g02270)

Zahl der Introns	5
Gesamtgröße	728AS / 79,9kDa
Signalsequenz	1-15
Größe des His ₆ -Proteins	39kDa

Tabelle 37: Informationen zu Cat1

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 117).

Das Gen besitzt, einschließlich Introns und Signalsequenz, eine Gesamtgröße von 2502 bp (Abb. 118). Da das Cat1-Gen sehr groß war, sollte nur der Bereich, der die N-terminale Hälfte ohne Signalsequenz kodiert, kloniert werden, welcher, Introns eingeschlossen, 973 bp umfasste. Aufgrund der Introns wurde der Abschnitt des Zielgens, der der N-terminalen Hälfte des Proteins entspricht, mit cDNA und den in Tab. 38 aufgeführten Oligonukleotiden amplifiziert und sollte eine Größe von 795 bp haben. Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 795 bp, bzw. 973 bp (Abb. 119). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die KpnI- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Drei Klone konnten als positiv identifiziert werden (Abb. 120). Diese wurden anschließend auf Expression getestet, einer hatte eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von knapp 40 kDa.

Cat1-FOR-BamHI	GCAGGATCCGTATGTCCCTATATGACC
Cat1-REV-KpnI	AGGGTACCCTCGATTGCATCGTGCAA

Tabelle 38: Verwendete Oligonukleotide für das Cat1-Konstrukt (N-Terminus)

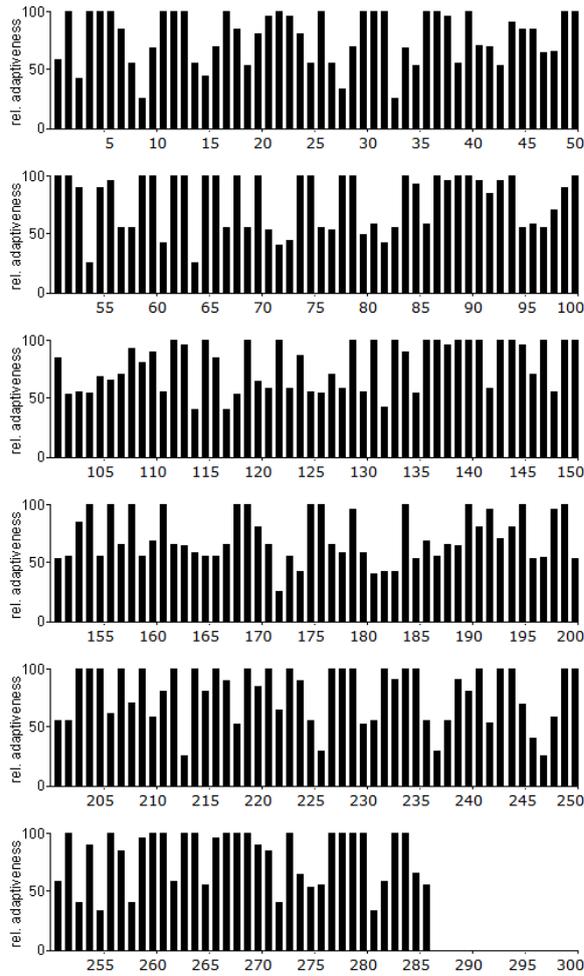


Abbildung 117: Analyse der Sequenz des Cat1-Gens (N-Terminus) mit der *codon usage* von *E. coli*.

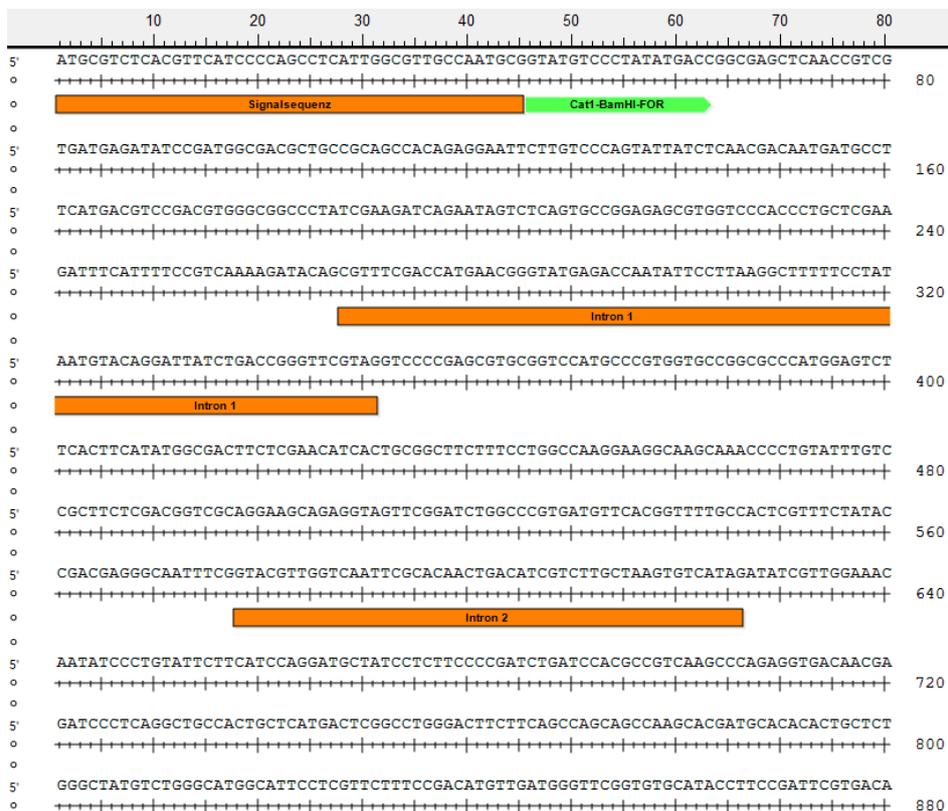




Abbildung 118: Genomische Sequenz des *Cat1*-Gens, die Introns sind orange dargestellt, die Signalsequenz blau, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

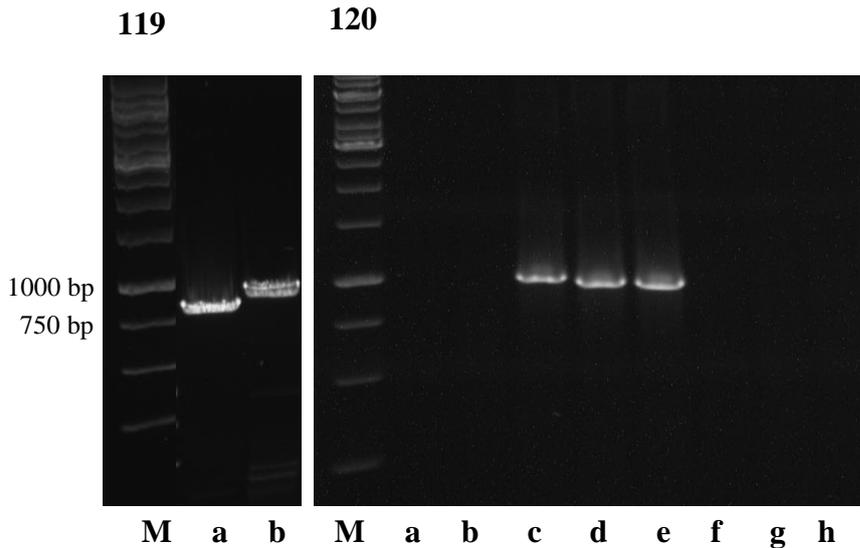


Abbildung 119: Amplifikat der PCR von Cat1. Spur a: Amplifikat des Gen-Fragments, das dem N-Terminus des nativen Proteins entspricht und das mit cDNA amplifiziert wurde. Es hat die erwartete Größe von 795 bp, Spur b zeigt das Amplifikat der chromosomalen DNA mit der erwarteten Größe von 973 bp.

Abbildung 120: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation entstandenen Cat1 Klonen im Agarosegel. Drei Klone (Spuren c-e) zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 795 bp.

Die anschließende Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 121).

Auch ein Western Blot mit dem spezifischen Antikörper α -Cat1J224-2 konnte dies bestätigen. Wie in Abb. 122 zu sehen ist, wurde auch das auftretende Dimer gefärbt.

Bei der im Anschluss stattgefundenen Reinigung über die Talonsäule wurde ein geringer Teil des Proteins bereits beim Waschschrift mit dem *Binding Buffer II* von der Säule gelöst und war gleichmäßig über alle Elutionen verteilt (Abb. 123). Es konnte eine ausreichende Konzentration an gereinigtem Protein gewonnen werden, daher wurde auf ein weiteres Auftragen des Durchlaufes verzichtet, obwohl noch eine große Menge an rekombinanten Protein im Durchlauf vorhanden war.

Nach der Dialyse (Abb. 125) erfolgte die LPS-Messung, welche einen Wert von < 1 EU/ml lieferte und damit unterhalb des Grenzwertes war. Das rekombinante Cat1-Protein stand damit für T-Zell-Analysen zur Verfügung.

Proteinseq.	-----HHHHHGSVCPYMTGELNRRDEISDGDAAAATEEFLSQYYLNDNDAFMTSDVG	53
Cat1	MRLTFIPSLIGVANA VCPYMTGELNRRDEISDGDAAAATEEFLSQYYLNDNDAFMTSDVG .:*****	60
Proteinseq.	GPIEDQNSLSAGERGPTLLEDFIFRQKIQRFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYGDFSN	113
Cat1	GPIEDQNSLSAGERGPTLLEDFIFRQKIQRFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYGDFSN *****	120
Proteinseq.	ITAASFLAKEGKQTPVFRFSTVAGSRGSSDLARDVHGFAFRFYTDEGNFDIVGNNIPVF	173
Cat1	ITAASFLAKEGKQTPVFRFSTVAGSRGSSDLARDVHGFAFRFYTDEGNFDIVGNNIPVF *****	180
Proteinseq.	FIQDAILFPDLIHAVKPRGDNEIPQAATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLLWAMSGHGIPRSF	233
Cat1	FIQDAILFPDLIHAVKPRGDNEIPQAATAHDSAWDFFSQQPSTMHTLLWAMSGHGIPRSF *****	240
Proteinseq.	RHVDGFGVHTFRFVTDGASKLVKFWKSLQGKASMVWEEAQQTSGKNPDMRQDLHDAI	293
Cat1	RHVDGFGVHTFRFVTDGASKLVKFWKSLQGKASMVWEEAQQTSGKNPDMRQDLHDAI *****	300
Proteinseq.	-----	293
Cat1	EAGRYPEWELGVQIMDEEDQLRFGFDLLDPTKIVPEEFVPI TKLGKMQLNRRNPRNYFAET	360
Proteinseq.	-----	293
Cat1	EQVMFQPGHIVRGVDFTEPDLQGRLEFSYLDLQLNRHGGPNFEQLPINQPRVPVHNNNRD	420
Proteinseq.	-----	293
Cat1	GAGQMFIPLNPHAYSPKTSVNGSPKQANQTVGDGFFTAPGRRTSGKLVRAVSSSFEDVWS	480
Proteinseq.	-----	293
Cat1	QPRLFYNSLVPAEKQFVIDAIRFENANVKSPVVKNNV IQLNRIDNDLARRVARAIGVAE	540
Proteinseq.	-----	293
Cat1	PEPDPTFYHNNKTADVGTGFKLKKLDGLKGVVLSVQHPGSVEGASTLRDRLKDDGVDV	600
Proteinseq.	-----	293
Cat1	VLVAERLADGVDQTYSTSDAIQFDVVAAGAESLFAASSFTGGSANSASGASSLYPTGR	660
Proteinseq.	-----	293
Cat1	PLQILIDGFRFGKTVGALGSGTAALRNAGIATSRDGVYVAQSVTDDFANDLKEGLRFTFKF	720
Proteinseq.	----- 293	
Cat1	LDRFPVDH 728	

Abbildung 121: Gegenüberstellung der Cat1-Proteinsequenz aus der Datenbank (Cat1) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Proteinsequenz (Proteinseq.) Die Signalsequenz wurde rot markiert, das His-tag grün, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

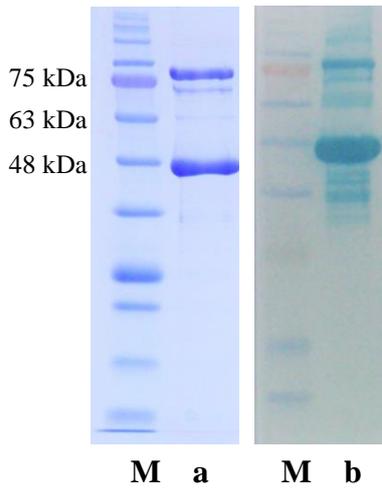


Abbildung 122: Coomassie-Gel und Western Blot von Cat1. Spur a zeigt das Coomassie-Gel von Cat1, Spur b den Western Blot mit dem spezifischen Antikörper α Cat1J224-1

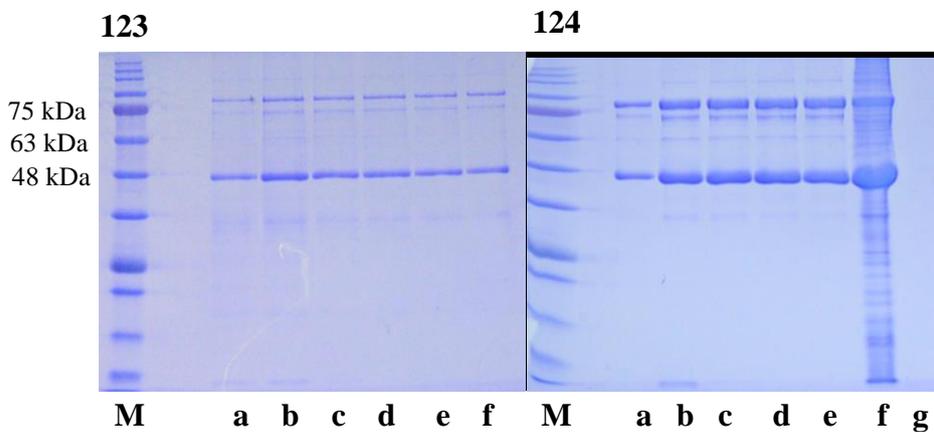


Abbildung 123: Talonreinigung von Cat1, Waschfraktionen. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösten

Abbildung 124: Talonreinigung von Cat1, Elutionen. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur f zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur g die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

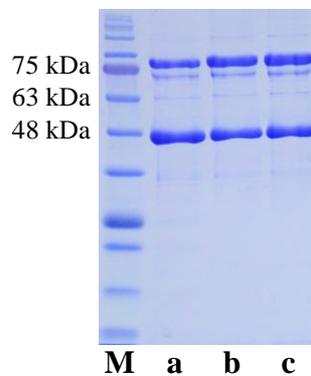


Abbildung 125: Dialyse von Cat1, vorher (a), nachher (b) und den Überstand nach anschließender Zentrifugation (c)

5. Nicht erfolgreich hergestellte Zellwandproteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte Zellwandproteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf17/MP1	Afu4g03240
CspA	Afu3g08990

Tabelle 39: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten Zellwandproteine

5.1 Aspf17/MP1 (Afu4g03240)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	284AS / 27,4 kDa
Signalsequenz	1-17
Größe des His ₆ -Proteins	29,4kDa

Tabelle 40: Informationen zu Aspf17

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 126).

Das Gen besitzt, einschließlich der Signalsequenz, eine Größe von 855 bp. Bei Auslassung dieser sollte es eine Größe von 804 bp haben. Es konnte mit den in Tab. 41 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 67°C, erfolgreich amplifiziert werden. Diese PCR wurde mit chromosomaler DNA durchgeführt, da das Gen keine Introns enthält. Eine Bande mit der erwarteten Größe von 804 bp war im Agarosegel zu sehen (Abb. 128). Anschließend wurde es über die BamHI- und die PstI- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Drei der getesteten Klone zeigten eine Bande bei der erwarteten Größe von 804 bp (Abb. 129). Diese drei wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass keiner eine induzierte Bande bei der erwarteten Größe von ca. 30 kDa zeigte (Abb. 130). Eine Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm lieferte ebenfalls keine exprimierenden Klone. Ein Expressionsplasmid wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Dieser zufolge konnte das gesamte Gen, unter Auslassung der Signalsequenz, erfolgreich in den Vektor kloniert werden

(Abb. 131). So lieferte auch die Sequenzierung keinen Grund für die nicht vorhandene Expression. Da die im Vorfeld an die Klonierung stattgefundene Analyse der Sequenz des Aspf17-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* auch keine Hinweise auf die fehlende Expression lieferte, wurde von weiteren Bemühungen abgesehen.

MP1-FOR-BamHI	GCGGGATCCACGCCACCTGGTCTCTCGT
MP1-REV-Pst1	GCGCTGCAGTTAGAGAGCGACGGCGAT

Tabelle 41: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf17-Konstrukt

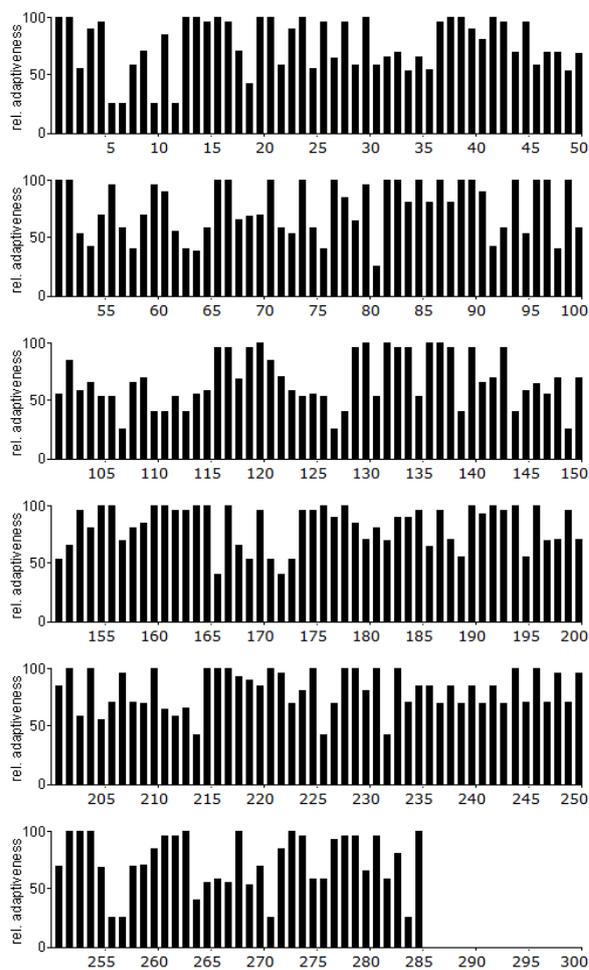


Abbildung 126: Analyse der Sequenz des Aspf17-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

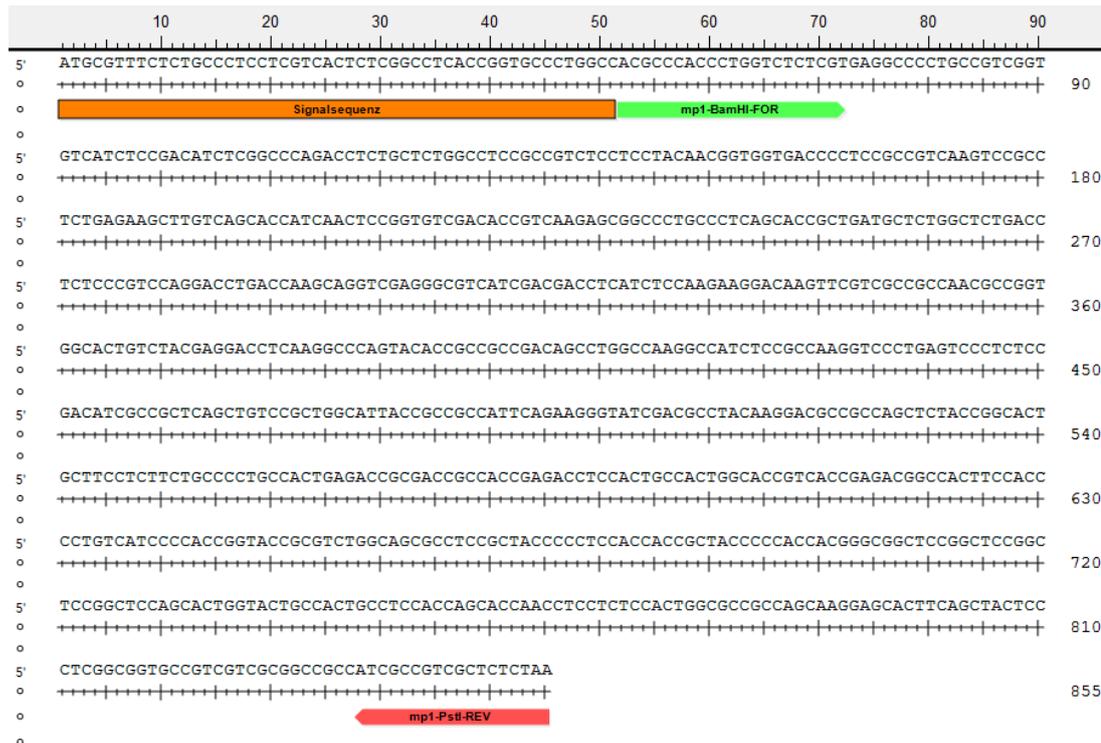


Abbildung 127: Genomische Sequenz des Aspf17/MP1-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

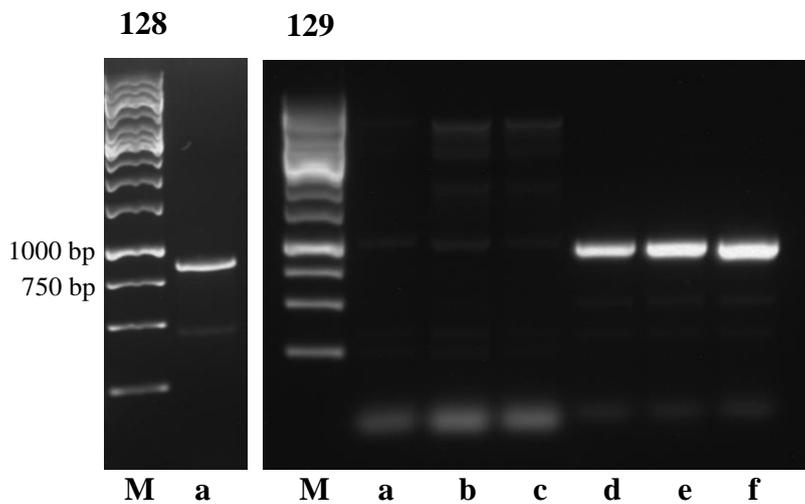


Abbildung 128: Amplifikat der PCR von Aspf17/MP1. Spur a zeigt das Amplifikat, die Größe stimmt mit der erwarteten von 804 bp überein

Abbildung 129: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf17 Klonen im Agarosegel, drei zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 804 bp (d-f)

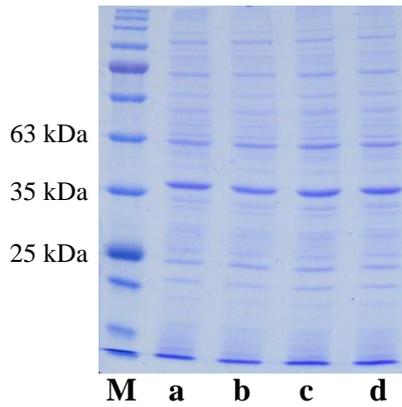


Abbildung 130: Coomassie-Gel der AspF17 Klone (M15), welche laut PCR die richtige Größe hatten, bei keinem war eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von knapp 30 kDa zu sehen, Spur d zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Proteinseq.	-----HHHHHGS	TPTLVSREAPAVGVISDISAQTALASAVSSYNGGDP	SAVKSA	50
MP1	MRFSALLVTLGLTGALA	TPTLVSREAPAVGVISDISAQTALASAVSSYNGGDP	SAVKSA	60
		:	*****	
Proteinseq.		SEKLVSTINSGVDTVKSGPALSTADALALTS	SPVQDLTKQVEGVIDDLISKDKFVAANAG	110
MP1		SEKLVSTINSGVDTVKSGPALSTADALALTS	SPVQDLTKQVEGVIDDLISKDKFVAANAG	120
		*****	*****	
Proteinseq.		GTVYEDLKAQYTAADSLAKAISAKVPESLS	DIAAQLSAGITAAIQKGIDAYKDAASSTGT	170
MP1		GTVYEDLKAQYTAADSLAKAISAKVPESLS	DIAAQLSAGITAAIQKGIDAYKDAASSTGT	180
		*****	*****	
Proteinseq.		ASSAPATETATATETSTATGTVTETATSTP	VIPTGTASGSASATPSTTATPTTGGSGSG	230
MP1		ASSAPATETATATETSTATGTVTETATSTP	VIPTGTASGSASATPSTTATPTTGGSGSG	240
		*****	*****	
Proteinseq.		SGSSTGTATASTSTNLLSTGAASKEHFSY	SLGGAVVAAAIAVAL	274
MP1		SGSSTGTATASTSTNLLSTGAASKEHFSY	SLGGAVVAAAIAVAL	284
		*****	*****	

Abbildung 131: Gegenüberstellung der AspF17-Proteinsequenz aus der Datenbank (MP1) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot. Das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

5.2 CspA (Afu3g08990)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	430AS / 52,4kDa
Signalsequenz	1-17
Größe des His ₆ -Proteins	48kDa

Tabelle 42: Informationen zu CspA

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 132).

Das Gen besitzt, einschließlich der Introns und der Signalsequenz, eine Größe von 1414 bp, und wurde, mit den in Tab. 43 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 58°C amplifiziert (Abb. 133). Aufgrund der vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert und sollte, ohne Signalsequenz, somit eine Größe von 1242 bp haben. Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande bei der erwarteten Größe von 1414 bp, bzw. 1242 bp (Abb. 134). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels der cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Keiner der Klone konnte als positiv identifiziert werden (Abb. 135). Daraufhin wurde das gereinigte und geschnittene PCR-Produkt nochmals neu in den Vektor kloniert und anschließend in einen anderen *E. coli*-Stamm (Rosetta) transformiert. Die bei dieser Transformation entstandenen Klone wurden per PCR überprüft, fünf konnten als positiv identifiziert werden (Abb. 136). Bei der darauffolgenden Überprüfung auf Expression konnte jedoch bei keinem der Klone eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 48 kDa beobachtet werden (Abb. 137). Die Sequenzierung eines Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Gen erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 138). Da auch die zuvor erstellte Analyse der Sequenz des CspA-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* (Abb. 132) keine Hinweise auf die fehlende Expression lieferte, wurde auf weitere Bemühungen verzichtet.

CspA-BamHI-FOR	AGCGGATCCGGCATTGTGCCAAACAAGGGC
CspA-HindIII-REV	AGCAAGCTTCTAAAGCATGAGCATGACAAC

Tabelle 43: Verwendete Oligonukleotide für das CspA-Konstrukt

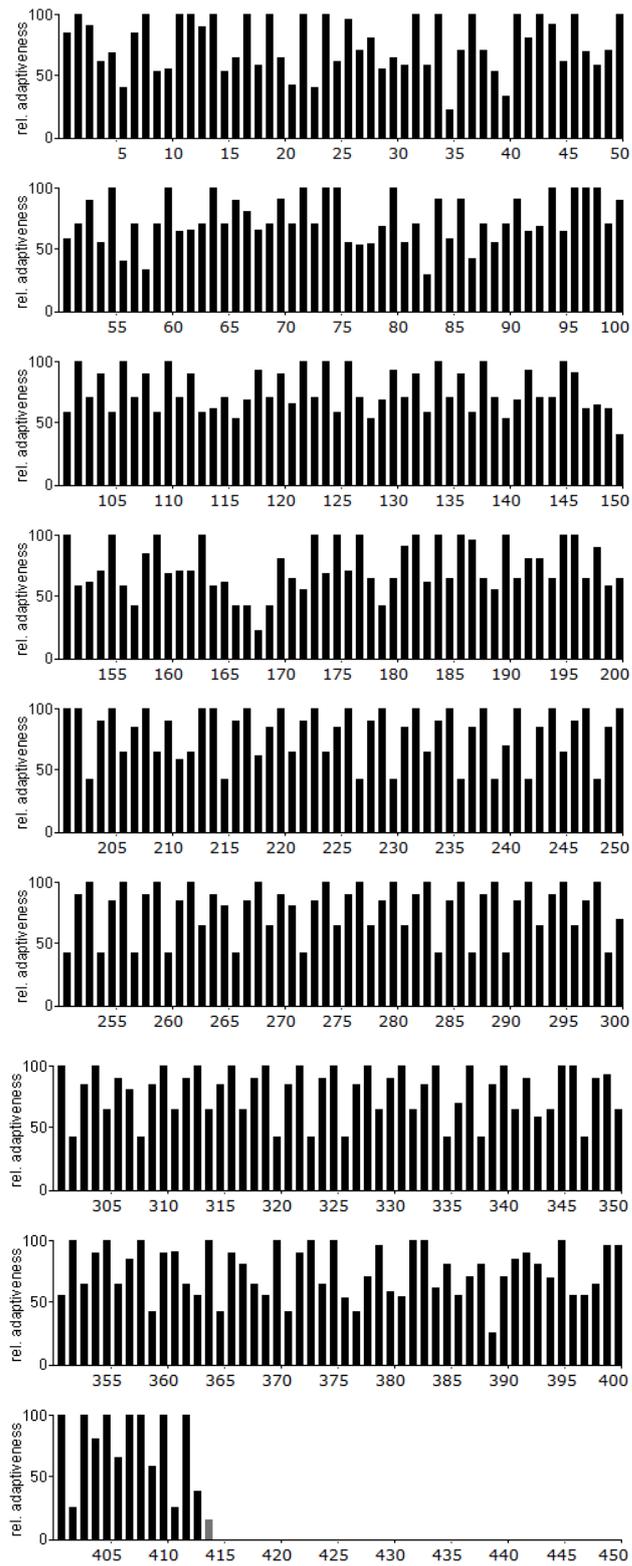


Abbildung 132: Analyse der Sequenz des CspA-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

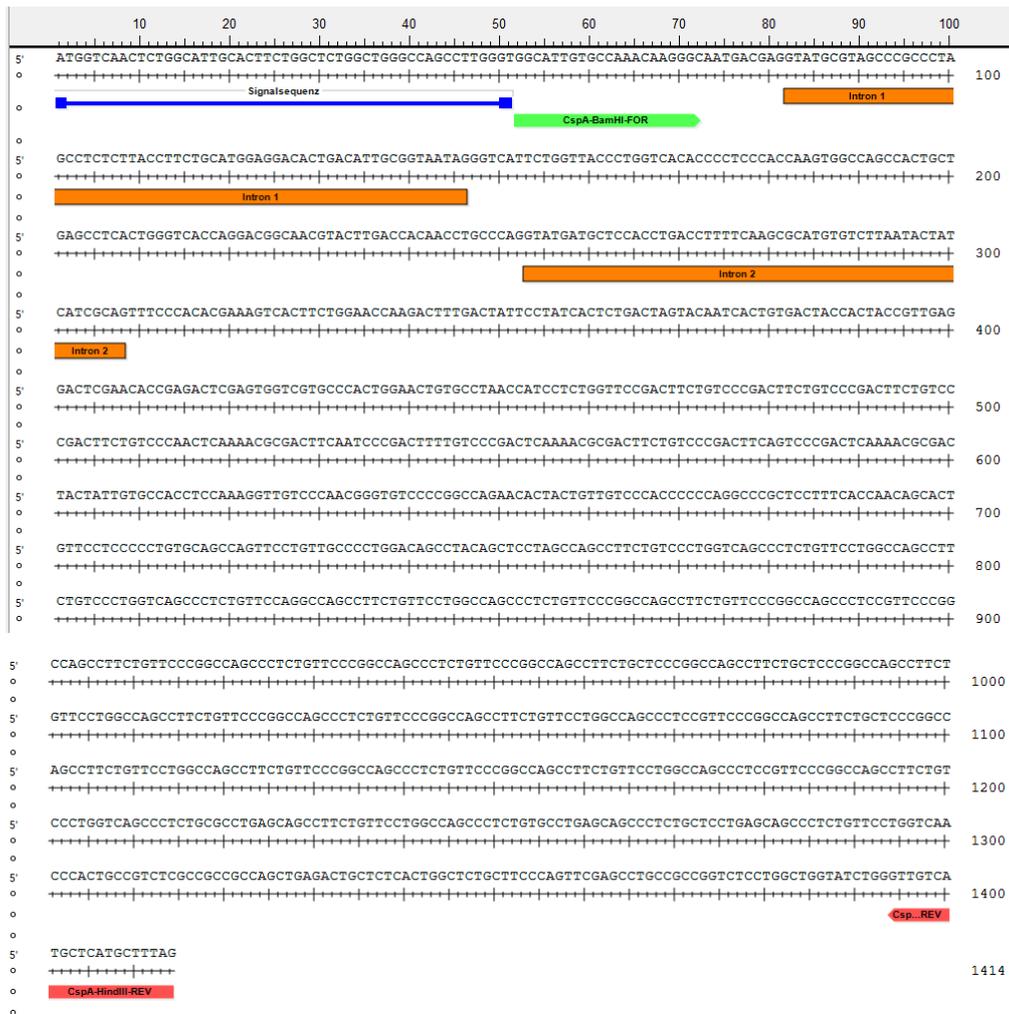


Abbildung 133: Genomische Sequenz des CspA-Gens, die Introns sind orange dargestellt, die Signalsequenz blau, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

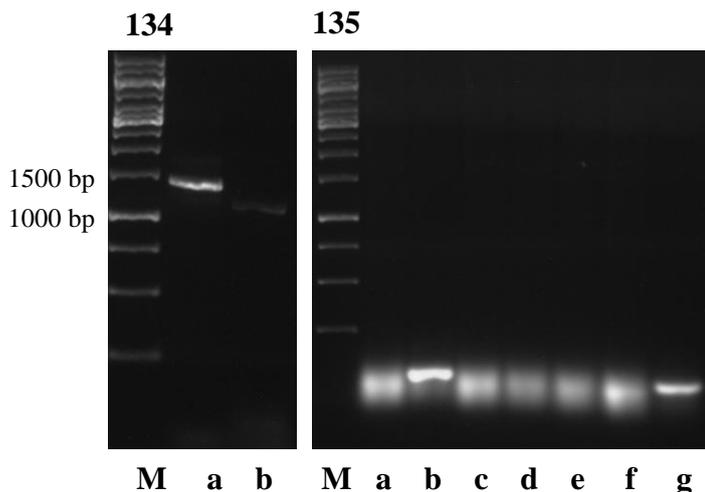


Abbildung 134: Amplifikat der PCR von CspA. Spur a zeigt das Amplifikat aus der PCR mit der chromosomalen DNA, Spur b das der cDNA. Beide Banden stimmen mit den jeweils erwarteten Größen von 1414 bp, bzw. 1242 bp überein

Abbildung 135: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation (M15) entstandenen CspA Klonen im Agarosegel. Keiner konnte als positiv identifiziert werden

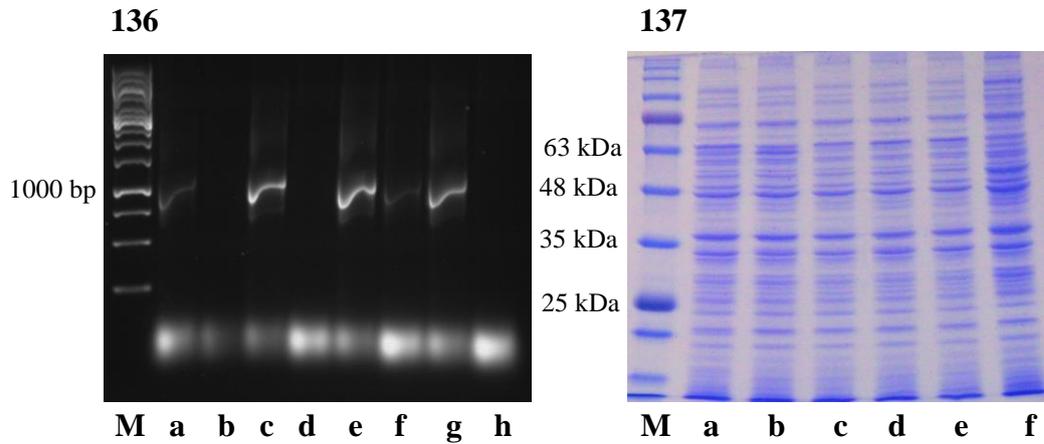


Abbildung 136: Auftrennung der PCR-Produkte von den aus der Transformation (Rosetta) entstandenen CspA Klonen im Agarosegel, fünf Klone (Spuren a,c,e-g) zeigen eine Bande beider erwarteten Größe von 1212 bp

Abbildung 137: Coomassie-Gel der CspA Klone, die in Rosetta transformiert wurden. Keiner zeigt eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 48 kDa (Spuren a-e), Spur f zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Proteinseq.	-----HHHHHGS	GIVPNKGNDEGHS	GYPGHTPPTKWPATAE	PHWVTRTATYLT	TTT	55
CspA	MVNSGIALLAGPALG	GIVPNKGNDEGHS	GYPGHTPPTKWPATAE	PHWVTRTATYLT	TTT	60
	-----	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	CPVSHTKVTS	SGTKTLTIPITL	TSTITVTTTT	VEDSNTET	TRVVVPTGTVP	112
CspA	CPVSHTKVTS	SGTKTLTIPITL	TSTITVTTTT	VEDSNTET	TRVVVPTGTVP	120
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	SVPTSVPTS	VPTQNATSIP	TFVPTQNATS	SVPTSVPT	QNATTIVPPK	174
CspA	SVPTSVPTS	VPTQNATSIP	TFVPTQNATS	SVPTSVPT	QNATTIVPPK	180
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	VPPRPAPFT	NSTVPPVQ	PVPVAPGQ	PTAPSQPS	VPVPGQPS	231
CspA	VPPRPAPFT	NSTVPPVQ	PVPVAPGQ	PTAPSQPS	VPVPGQPS	240
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	PGQPSVPGQ	PSVPGQPS	VPGQPSVPG	QPSVPGQPS	APGQPSAPG	288
CspA	PGQPSVPGQ	PSVPGQPS	VPGQPSVPG	QPSVPGQPS	APGQPSAPG	300
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	PGQPSVPGQ	PSVPGQPS	VPGQPSVPG	QPSVPGQPS	APGQPSVPG	345
CspA	PGQPSVPGQ	PSVPGQPS	VPGQPSVPG	QPSVPGQPS	APGQPSVPG	360
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	PGQPSAPEQ	PSVPGQPS	VPEQPSAPE	QPSVPGQPT	AVSPPPAET	402
CspA	PGQPSAPEQ	PSVPGQPS	VPEQPSAPE	QPSVPGQPT	AVSPPPAET	420
	*****	*****	*****	*****	*****	
Proteinseq.	AGIWVVML	LML				412
CspA	AGIWVVML	LML				430
	*****	*****				

Abbildung 138: Gegenüberstellung der CspA-Proteinsequenz aus der Datenbank (CspA) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Die Signalsequenz wurde rot markiert, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt, das His-tag grün

6. Erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf3/Pmp20	Afu6g02280
Aspf6/MnSOD	Afu1g14550
Aspf8	Afu2g10100
Aspf11	Afu2g03720
Aspf22/EnoA	Afu6g06770
CipC	Afu5g09330

Tabelle 44: Liste aller erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine

6.1 Aspf3/Pmp20 (Afu6g02280)

Zahl der Introns	3
Gesamtgröße	168 AS /18,4 kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	18,4 kDa

Tabelle 45: Informationen zu Aspf3

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 139).

Das Gen sollte ohne Introns eine Größe von 507 bp besitzen und konnte erfolgreich, mit den in Tab. 46 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 62°C amplifiziert werden (Abb. 140). Aufgrund der vorhandenen Introns wurde cDNA für diese PCR eingesetzt, parallel dazu wurde eine PCR unter den gleichen Bedingungen mit chromosomaler DNA durchgeführt. Dort konnte eine Bande mit der erwarteten Größe von 747 bp beobachtet werden (Abb. 141). Anschließend wurde das Gen über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Sieben der getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 507 bp (Abb. 142). Diese sieben wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass sechs dieser Klone eine induzierte Bande bei der erwarteten Größe von 18 kDa zeigten (Abb. 143).

Aspf3-BamHI-FOR	ACTGGATCCATGTCTGGACTCAAGGCCGGT
Aspf3-HindIII-REV	GCAAAGCTTTTACAGGTGCTTGAGGACGGT

Tabelle 46: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf3-Konstrukt

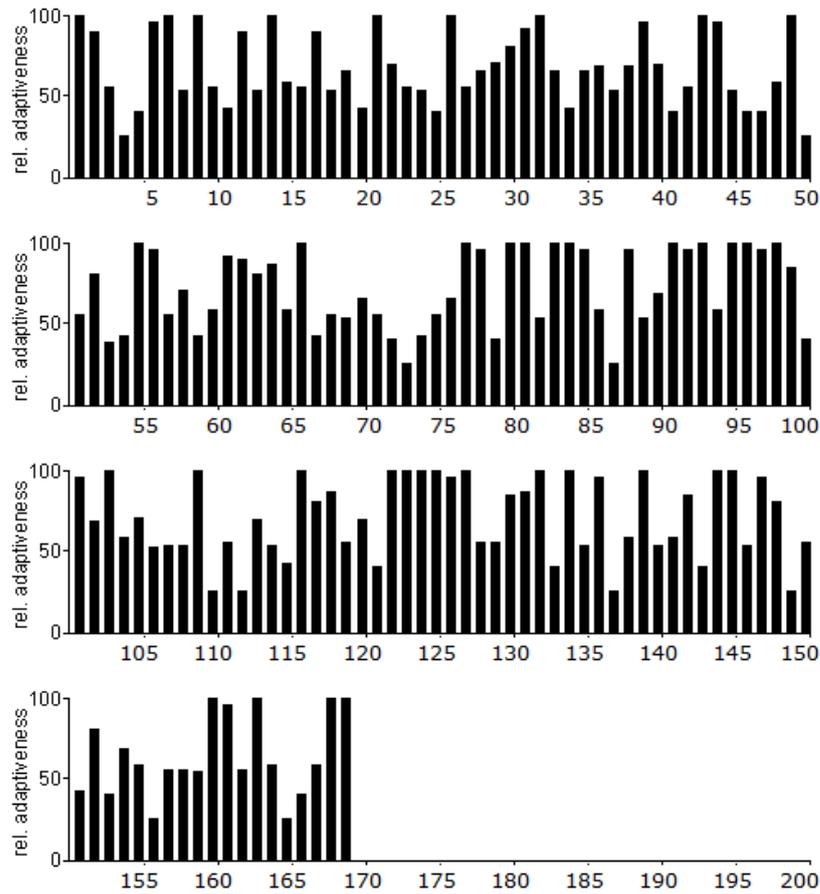


Abbildung 139: Analyse der Sequenz des Aspf3-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

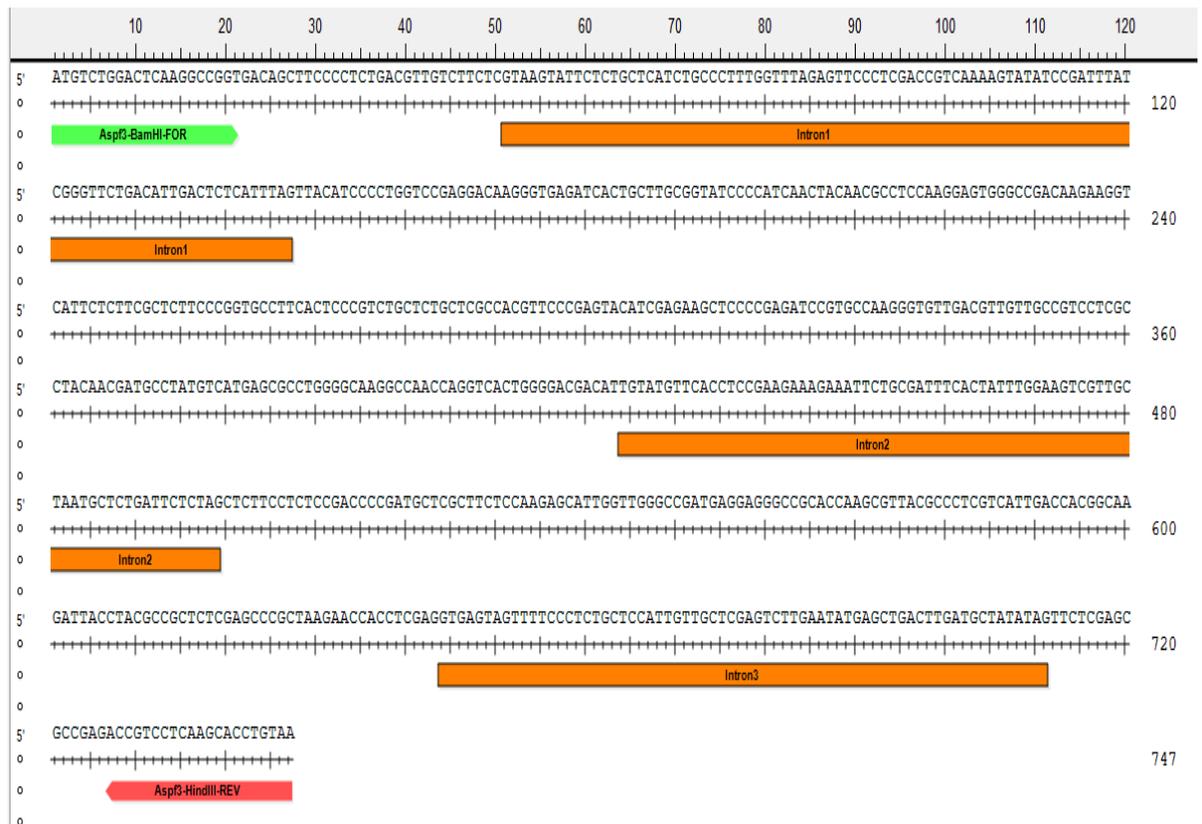


Abbildung 140: Genomische Sequenz des *Aspf3*-Gens, die Introns wurden orange dargestellt, der *forward primer* grün, der *reverse primer* rot

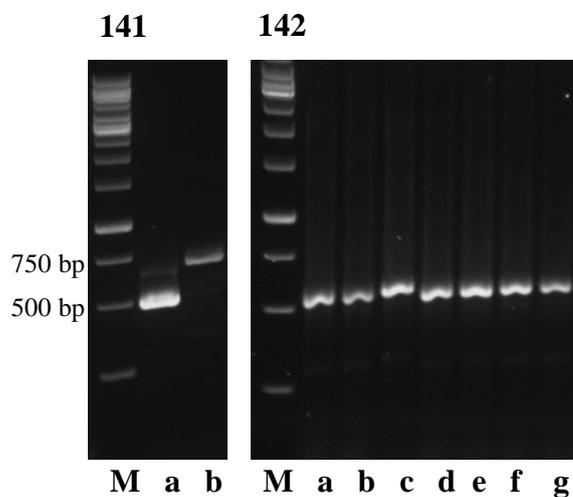


Abbildung 141: Amplifikat der PCR von *Aspf3*. Die beiden PCR-Produkte aus der Amplifizierung mit cDNA (Spur a) und chromosomaler DNA (Spur b) stimmen mit den erwarteten Größen überein (507 bp, bzw. 747 bp)

Abbildung 142: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen *Aspf3* Klonen im Agarosegel, alle sieben zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 507 bp (Spuren a-g)

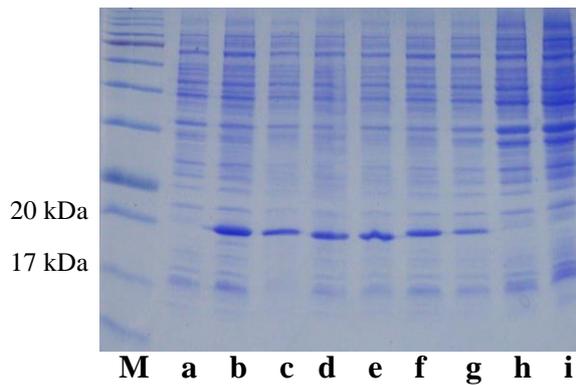


Abbildung 143: Coomassie-Gel der AspF3 Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten. Sechs zeigen bei der erwarteten Größe von 18 kDa eine induzierte Bande (Spuren b-g), Spur i zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer*, sie ergab, dass das AspF3 erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 144).

Bei der darauffolgenden Reinigung war das rekombinante Protein gleichmäßig in den Elutionen verteilt (Abb. 145). Außerdem war im Durchlauf kaum His₆-AspF3 nachweisbar (Abb. 146). In den Elutionen trat eine Doppelbande auf, die im Lysat nicht zu sehen war. Dieser proteolytische Abbau könnte durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren eventuell verhindert werden.

Nach Dialyse (Abb. 147) wurde eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen. Das rekombinante Protein stand damit für T-Zell-Versuche zur Verfügung.

Proteinseq.	HHHHHHGSMSGLKAGDSFPSDVVFSYIPWSEDKGEITACGIPINYNASKEWADKKVILFA	60
AspF3	-----MSGLKAGDSFPSDVVFSYIPWSEDKGEITACGIPINYNASKEWADKKVILFA	52

Proteinseq.	LPGAFTPVCSARHVPEYIEKLPEIRAKGVDVVAVLAYNDAYVMSAWGKANQVTGDDILFL	120
AspF3	LPGAFTPVCSARHVPEYIEKLPEIRAKGVDVVAVLAYNDAYVMSAWGKANQVTGDDILFL	112

Proteinseq.	SDPDARFSKSIGWADEEGRTKRYALVIDHGKITAALEPAKNHLEFSSAETVLKHL	176
AspF3	SDPDARFSKSIGWADEEGRTKRYALVIDHGKITAALEPAKNHLEFSSAETVLKHL	168

Abbildung 144: Gegenüberstellung der Sequenz des AspF3-Gens aus der Datenbank (AspF3) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün gekennzeichnet, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

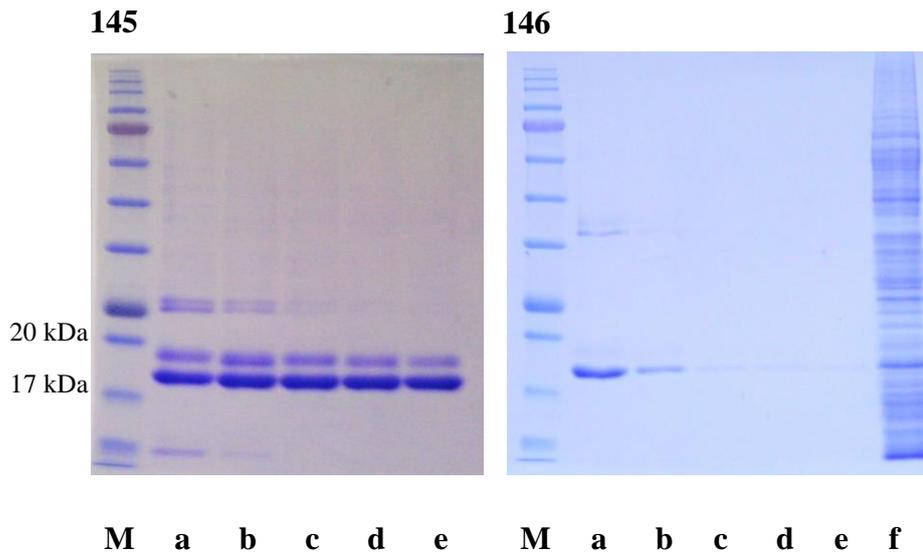


Abbildung 145: Talonreinigung von Aspf3. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer

Abbildung 146: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf3. Fraktionen 1 bis 5 (Spuren a-e), die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Matrix lösten, Spur f zeigt den Durchlauf der Probe

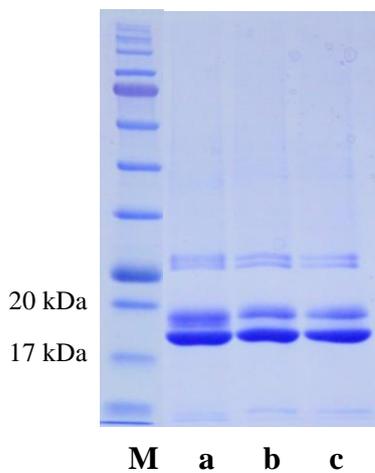


Abbildung 147: Dialyse von Aspf3. Aspf3 vor (Spur a) und nach (Spur b) der Dialyse, Spur c zeigt die Probe nach anschließender Zentrifugation

6.2 Aspf6/MnSOD (Afu1g14550)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	210AS / 23,4kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	25 kDa

Tabelle 47: Informationen zu Aspf6

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 148).

Das Gen besitzt, einschließlich der Introns, eine Größe von 748 bp (Abb. 149), ohne umfasst es 633 bp und konnte, mit den in Tab. 48 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 55°C, erfolgreich amplifiziert werden. Aufgrund der Intronstrukturen wurde cDNA als Template für diese PCR verwendet. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen ein Ansatz mit chromosomaler DNA durchgeführt. Im Agarosegel konnte bei den erwarteten Größen von 633 bp, bzw. 748 bp jeweils eine Bande beobachtet werden (Abb. 150). Anschließend wurde es über die KpnI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Alle acht getesteten Klone zeigten eine Bande bei der erwarteten Größe von 633 bp (Abb. 151). Diese wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass alle eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 25 kDa zeigten, mit einem ähnlich guten Expressionsniveau (Abb. 152).

Aspf6-FOR	AGGGTACCATGTCCACAGCAATACACG
Aspf6-REV	GCAAAGCTTCTACAGCTTCATGAATGG

Tabelle 48: Verwendete Oligonukleotide für Aspf6

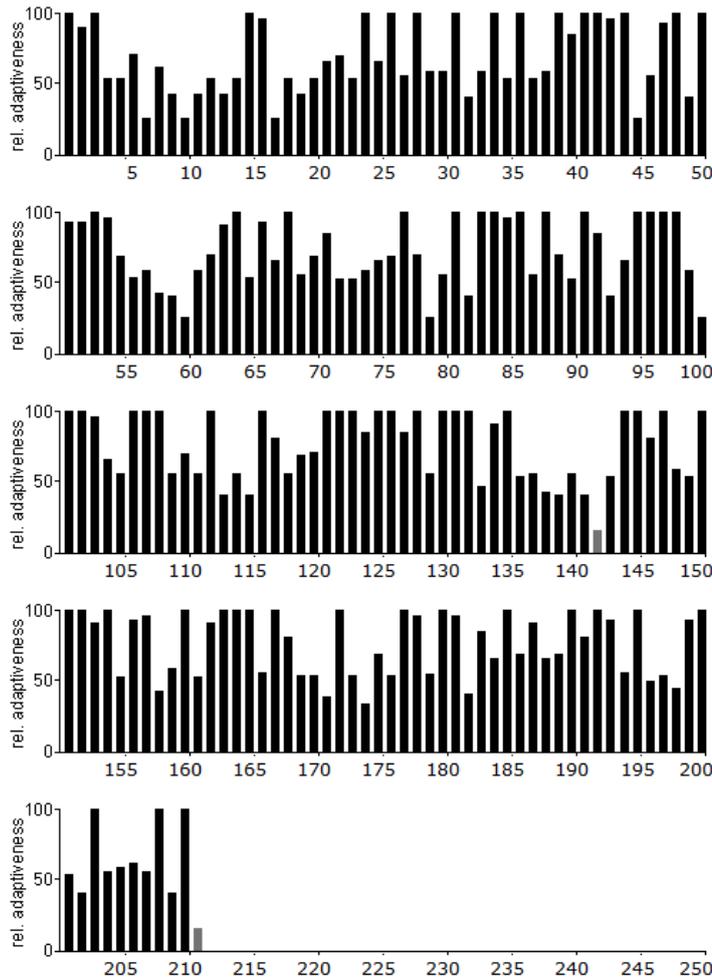


Abbildung 148: Analyse der Sequenz des Asp6-Gens *codon usage* von *E. coli*.

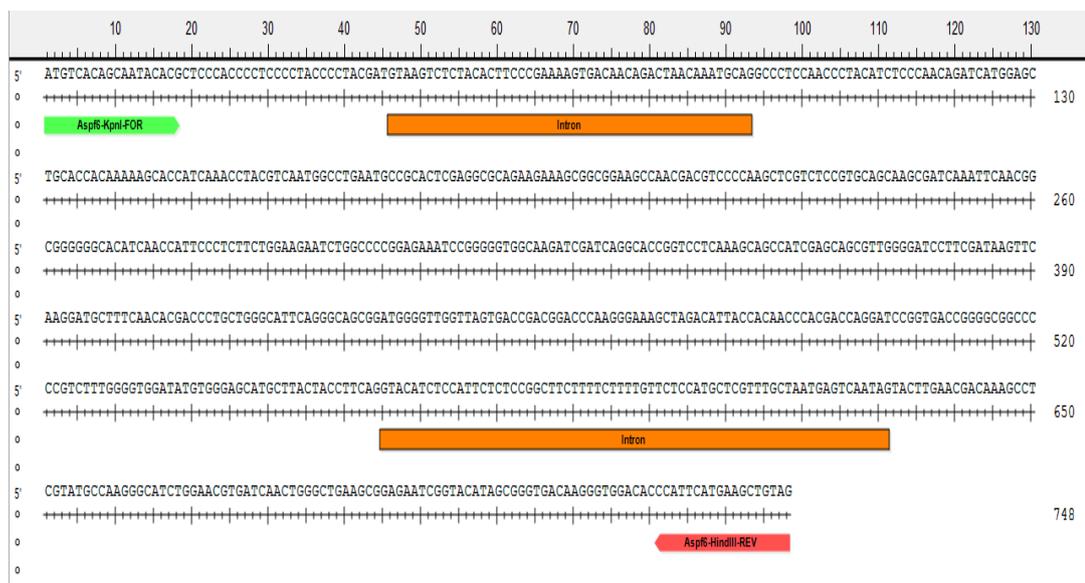


Abbildung 149: Genomische Sequenz des Asp6-Gens, die beiden Introns wurden orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

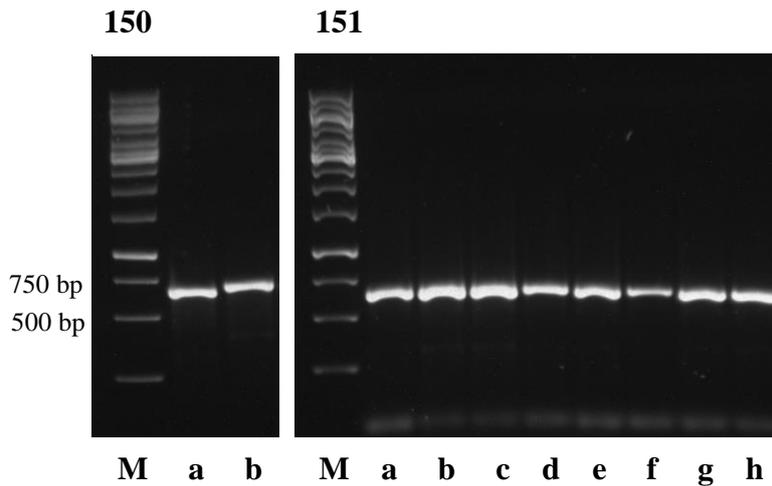


Abbildung 150: Amplifikat der PCR von Aspf6. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit der cDNA mit der erwarteten Größe von 633 bp. Spur b zeigt das Amplifikat der Kontroll-PCR mit der chromosomalen DNA, die Größe von 748 bp stimmt mit der erwarteten überein

Abbildung 151: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Aspf6 Klonen im Agarosegel, alle zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 633 bp (Spuren a-h)

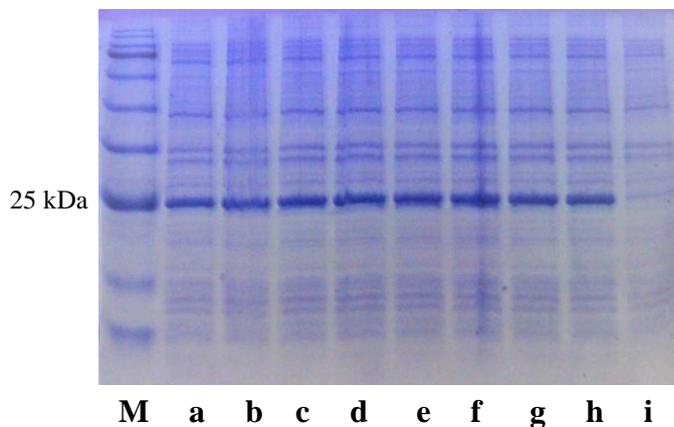


Abbildung 152: Coomassie-Gel der Aspf6 Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten, sie zeigen alle eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 25 kDa (Spuren a-h), Spur i zeigt die Kontrolle ohne IPTG

Ein Plasmid wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert, diese bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 153).

Es erfolgten zwei Reinigungen, da sehr viel rekombinantes Protein in der Probe war. Beide Reinigungen brachten ein sehr ähnliches Ergebnis hervor: Elution 2

hatte mit Abstand die größte Konzentration. In Elutionen 1 und 3 waren auch hohe Konzentrationen von Asp6, in Elution 4 dagegen nur geringere (Abb. 154 und Abb. 155).

Nach Dialyse (Abb. 156) wurde eine LPS-Konzentration von < 1EU/ml gemessen werden. Bei einem weiteren Reinigungsversuch, der nötig war, da dieses Protein in mehreren Stimulationsversuchen eingesetzt wurde, ergab sich ein LPS-Wert von > 100 EU/ml und auch eine Nachreinigung konnte diesen Wert nicht verringern. Bei dem Versuch diese Probe über eine Endotoxinsäule zu reinigen, ging sämtliches Protein verloren, wie in Abb. 157 zu sehen ist.

Proteinseq.	HHHHHGHSHVISSIAS	MSQQYTLPLPYPYDALQPYISQQIMELHHKHHQTYVNLNAA	60
Aspf6	-----	MSQQYTLPLPYPYDALQPYISQQIMELHHKHHQTYVNLNAA	44

Proteinseq.		LEAQKAAEANDVPKLVSVQQAIFNNGGGHINHSLEWKNLAPEKSGGKIDQAPVLKAAI	120
Aspf6		LEAQKAAEANDVPKLVSVQQAIFNNGGGHINHSLEWKNLAPEKSGGKIDQAPVLKAAI	104

Proteinseq.		EQRWGSFDKFKDAFNTLLGIQSGGWGLVTDGPKGKLDITTHDQDPVTGAAPVFGVDM	180
Aspf6		EQRWGSFDKFKDAFNTLLGIQSGGWGLVTDGPKGKLDITTHDQDPVTGAAPVFGVDM	164

Proteinseq.		WEHAYYLQYLNDKASYAKGIWNVINWAEAEENRYIAGDKGGHPPFMKL	226
Aspf6		WEHAYYLQYLNDKASYAKGIWNVINWAEAEENRYIAGDKGGHPPFMKL	210

Abbildung 153: Gegenüberstellung der Asp6-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspf6) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das His-tag ist grün dargestellt, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

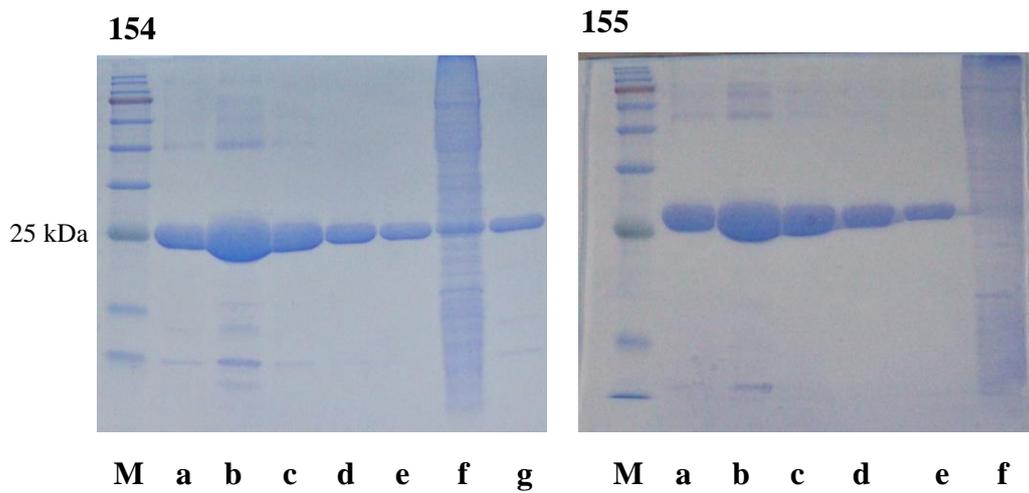


Abbildung 154: Talonreinigung von Asp6. Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer. Spur f zeigt den Durchlauf der Probe, Spur g zeigt die Fraktion, die sich mit dem *Binding buffer II* von der Säule löste

Abbildung 155: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Aspf6. Der Durchlauf wurde noch einmal auf dieselbe Säule aufgetragen und eluiert (Spuren a-e), Spur f zeigt den Durchlauf dieses Durchgangs

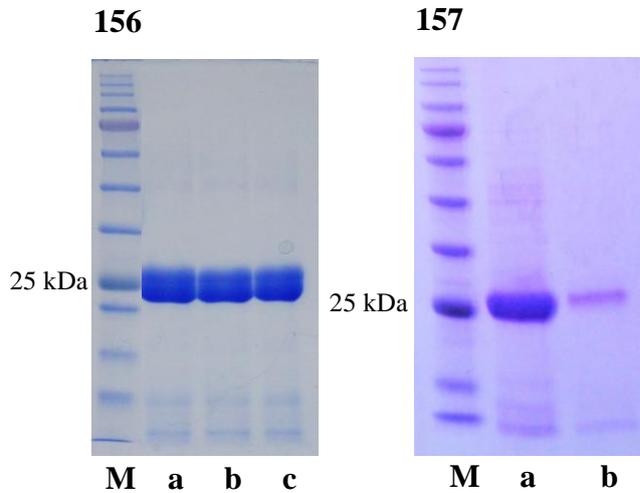


Abbildung 156: Dialyse von Aspf6. Gereinigtes Aspf6 vor der Dialyse (Spur a), danach (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

Abbildung 157: Reinigung von Aspf6 über die Endotoxinsäule. Spur a zeigt den Zustand der Probe vor der Reinigung über die Endotoxinsäule, Spur b danach

6.3 Aspf8 (Afu2g10100)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	111AS /11,1kDa
Signalsequenz	1-18
Größe des His ₆ -Proteins	16 kDa

Tabelle 49: Informationen zu Aspf8

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 158).

Das Gen besitzt, einschließlich Introns, eine Größe von 407 bp, ohne Introns umfasst es 336 bp (Abb. 159) und konnte mit den in Tab. 50 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 55°C erfolgreich amplifiziert werden. Aufgrund der Intronstrukturen wurde cDNA als Template für diese PCR verwendet. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen ein Ansatz mit chromosomaler DNA durchgeführt. Die Signalsequenz wurde nicht in den zu amplifizierenden Teil aufgenommen, somit war mit einer Größe des Amplifikats von 282 bp zu rechnen. Im Agarosegel konnte bei den erwarteten Größen von 282

bp, bzw. 407 bp jeweils eine Bande beobachtet werden (Abb. 160). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Sieben der getesteten Klone zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von 282 bp (Abb. 161). Diese wurden im Anschluss auf Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass sieben eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 16 kDa zeigten (Abb.162). Da sich die Bande bei einzelnen Klonen in ihrer Lage geringgradig unterschied, wurde zur Überprüfung noch ein Western Blot mit dem spezifischen Antikörper α Aspf8 R225-7 durchgeführt. Bei drei Klonen konnte das rekombinante Aspf8-Protein mit dem Antikörper eindeutig gefärbt werden (Abb. 163).

Aspf8-FOR-BamHI	AGCGGATCCTCCTCTGAGGATGTCAAGGCC
Aspf8-REV-HindIII	AGCAAGCTTTTAGTCGAAAAGACCGAAGCC

Tabelle 50: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf8-Konstrukt

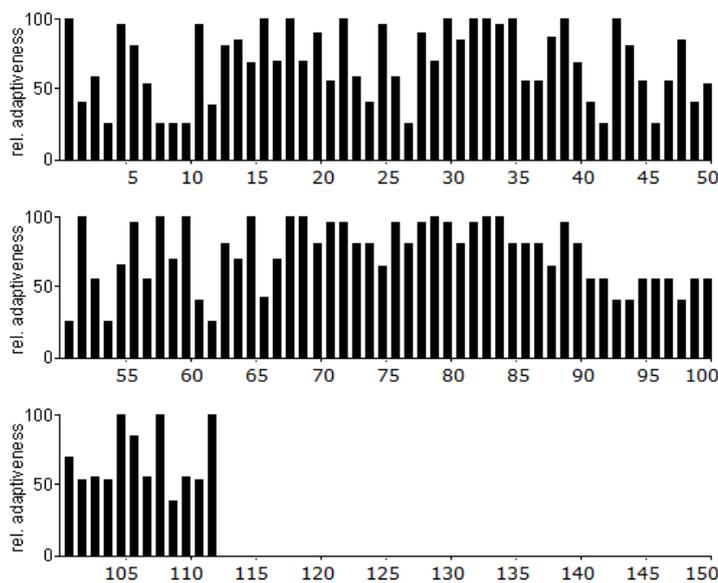


Abbildung 158: Analyse der Aspf8-Sequenz mit der *codon usage* von *E. coli*.

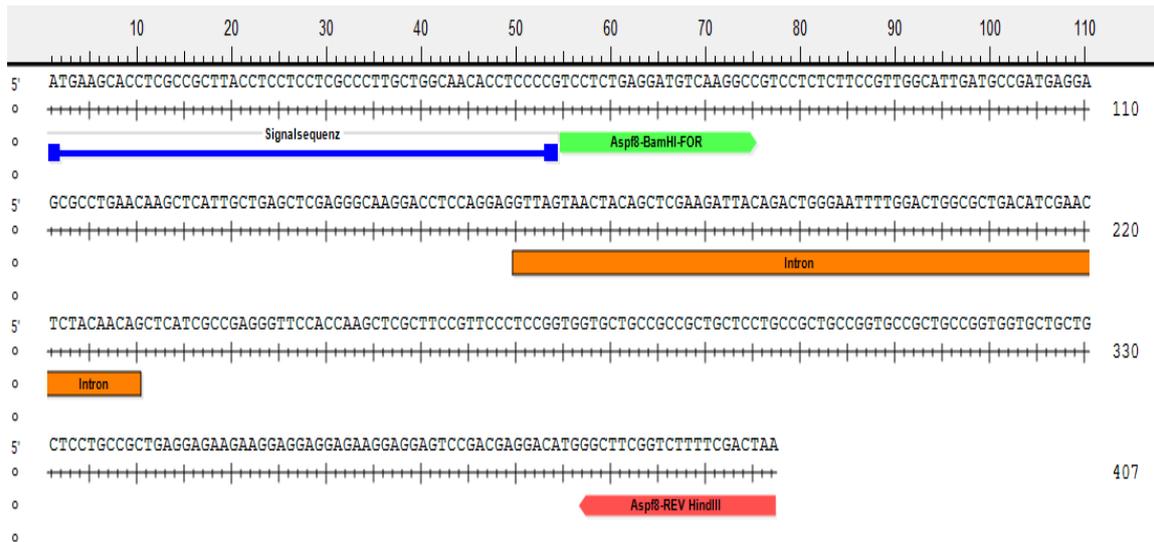


Abbildung 159: Genomische Sequenz des Aspf8-Gens, die Signalsequenz wurde blau, das Intron orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

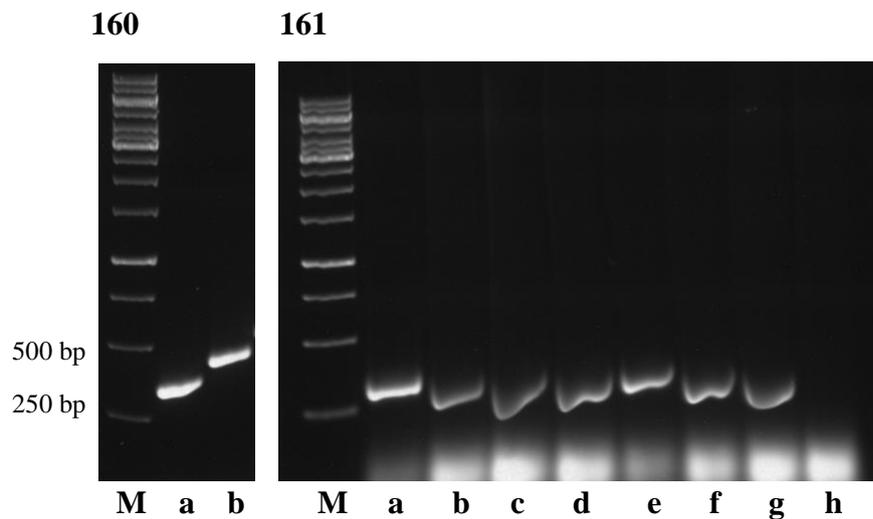


Abbildung 160: Amplifikat der PCR von Aspf8. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit cDNA, die Größe des Amplifikats stimmt mit der erwarteten Größe von 282 bp überein. In Spur b ist das Amplifikat aus der parallel dazu abgelaufenen PCR mit chromosomaler DNA abgebildet, die erwartete Größe liegt bei 407 bp

Abbildung 161: Agarosegel von den bei der Transformation in *E. coli* entstandenen Aspf8 Klonen, sieben zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 282 bp (Spuren a-g)

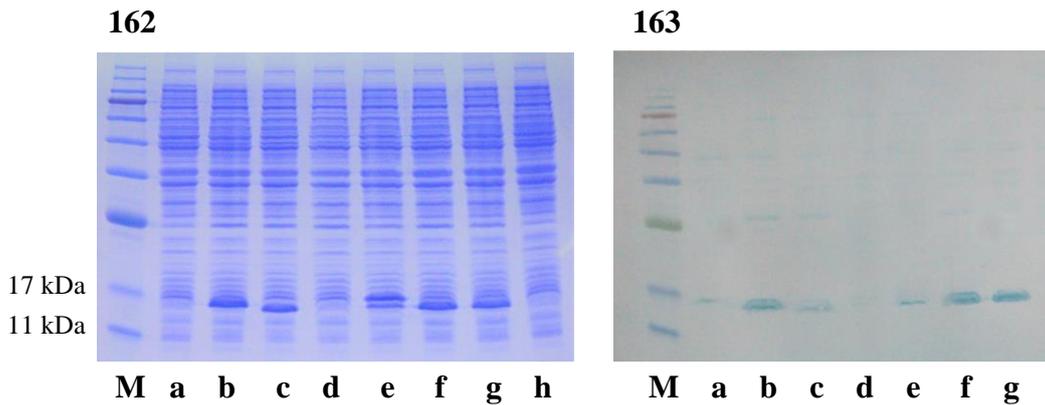


Abbildung 5: Coomassie-Gel der AspF8 Klone, welche laut PCR die richtige Größe hatten. Die induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 18 kDa scheint sich bei einigen Klonen in ihrer Höhe zu unterscheiden (Spuren a-g), Spur h zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Abbildung 6: Western Blot der AspF8 Klone mit dem spezifischen AK α AspF8 R225-7

Ein Plasmid aus einem Klon, welcher eine exprimierte Bande mit der erwarteten Größe zeigte, die auch durch den AspF8-spezifischen Antikörper gefärbt wurde, wurde im Anschluss sequenziert. Die Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* zeigte, dass das Gen ohne Intron und Signalsequenz in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 164).

Bei der anschließenden Reinigung wurde beobachtet, dass sich das rekombinante Protein bereits beim Waschschriff mit dem *Binding buffer II* sauber von der Matrix löste (Abb. 165). Der Großteil des Proteins befand sich in den ersten drei Waschfraktionen und war gut gereinigt. In der anschließenden Elution mit dem Elutionspuffer war bereits kein Protein mehr an der Säulenmatrix gebunden (Abb. 166).

Nach Dialyse (Abb. 167) wurde eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen und somit stand die Probe für T-Zell-Versuche zur Verfügung.

```

Proteinseq.      -----HHHHHGS SSEDVKAVLSSVGIDADEERLNKLI AELEGKDLQELIAEGST      50
AspF8           MKHLAAYLL LALAGNTSP SSEDVKAVLSSVGIDADEERLNKLI AELEGKDLQELIAEGST      60
                : . *****
Proteinseq.      KLASVPSGGAAAAAPAAAGAAAGGAAAPAAEKKKEEKEESEDEDMGFGLFD      101
AspF8           KLASVPSGGAAAAAPAAAGAAAGGAAAPAAEKKKEEKEESEDEDMGFGLFD      111
                *****
    
```

Abbildung 164: Gegenüberstellung der AspF8-Proteinsequenz aus der Datenbank (AspF8) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz

(Proteinseq.) Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

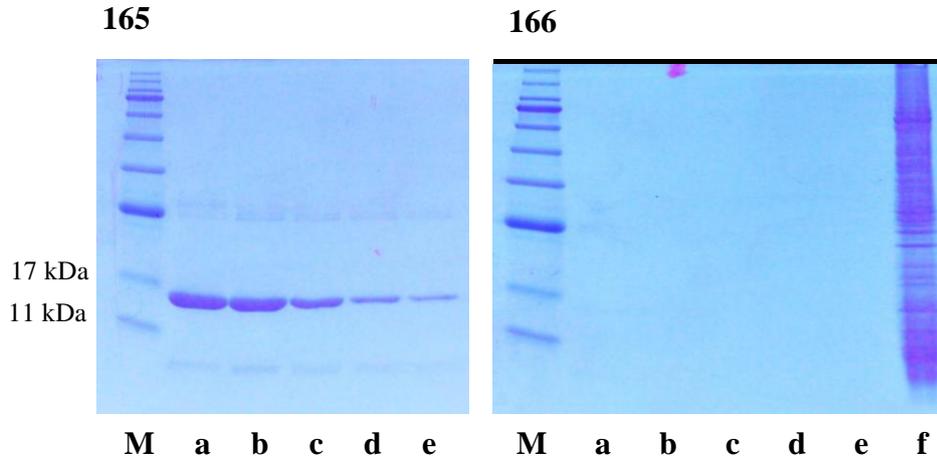


Abbildung 165: Talonreinigung von Aspf8, Waschfraktionen. Fraktionen 1 bis 5 (Spuren a-e) , die sich mit dem *Binding buffer II* von der Matrix lösten

Abbildung 166: Talonreinigung von Aspf8, Elutionen. Spuren a-e zeigen, dass kein Protein eluiert wurde, der Durchlauf der Probe ist in Spur f zu sehen

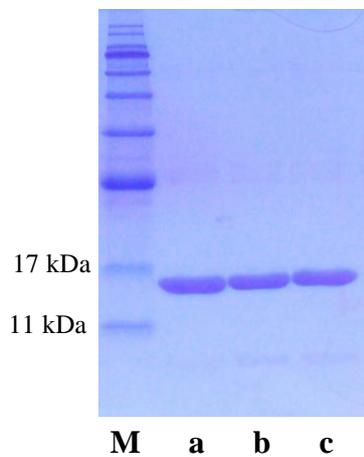


Abbildung 167: Dialyse von Aspf8. Das gereinigte Protein vor (Spur a) und nach (Spur b) der Dialyse, Spur c zeigt den Zustand der dialysierten Probe nach anschließender Zentrifugation

6.4 Aspf11/cyp4 (Afu2g03720)

Zahl der Introns	3
Gesamtgröße	205AS /22,3 kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	20 kDa

Tabelle 51: Informationen zu Aspf11

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 168).

Das Gen besitzt einschließlich der drei Introns eine Gesamtgröße von 875 bp, ohne sie 618 bp (Abb. 169). Es konnte mittels cDNA mit den in Tab. 52 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 60°C erfolgreich amplifiziert werden. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen ein Ansatz mit chromosomaler DNA durchgeführt. Im Agarosegel konnte bei den erwarteten Größen von 619 bp, bzw. 875 bp jeweils eine Bande beobachtet werden (Abb. 170). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass keiner der entstandenen Klone das Konstrukt aufgenommen hatte. Daraufhin wurde das gereinigte und geschnittene PCR-Produkt erneut in den Vektor pQE30 kloniert und anschließend in den *E. coli*-Rosetta-Stamm transformiert. Bei der anschließenden Überprüfung per PCR konnte bei allen der acht getesteten Klone eine Bande mit der erwarteten Größe von 619 bp gesehen werden (Abb. 171). Diese acht wurden im Anschluss auf Expression getestet, dabei war bei allen acht Klonen eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 20 kDa erkennbar (Abb. 172). Sie hatten alle ein ähnlich gutes Expressionsniveau. Über einen Wechsel des Bakterienstammes konnte somit das Problem der fehlenden Expression im Falle des Aspf11 gelöst werden.

Das Plasmid eines exprimierenden Klons wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass das Gen erfolgreich unter Auslassung der Introns amplifiziert werden konnte (Abb. 173). Eine Reinigung dieses Proteins war aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

Aspf11-FOR-BamHI	AGCGGATCCATGTCTCAGGTCCTTCTCGAC
Aspf11-REV-HindIII	AGCAAGCTTTTACAGCTCACCACAGTTGAC

Tabelle 52: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf11-Konstrukt

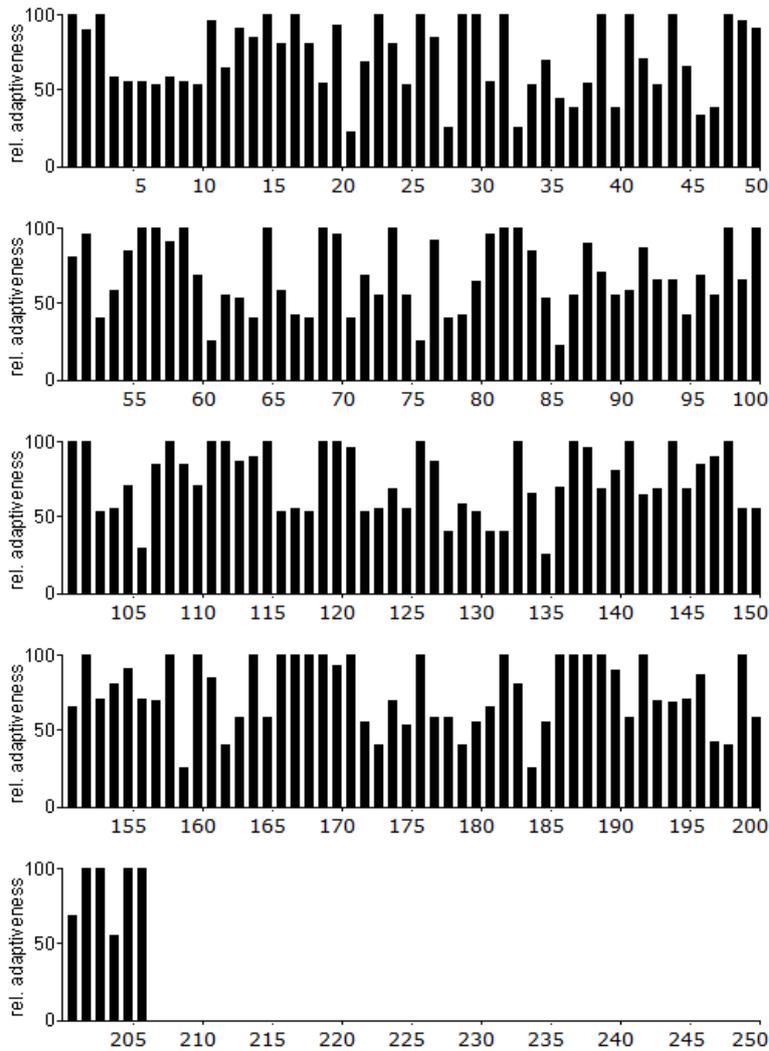


Abbildung 168: Analyse der Sequenz des Aspf11-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

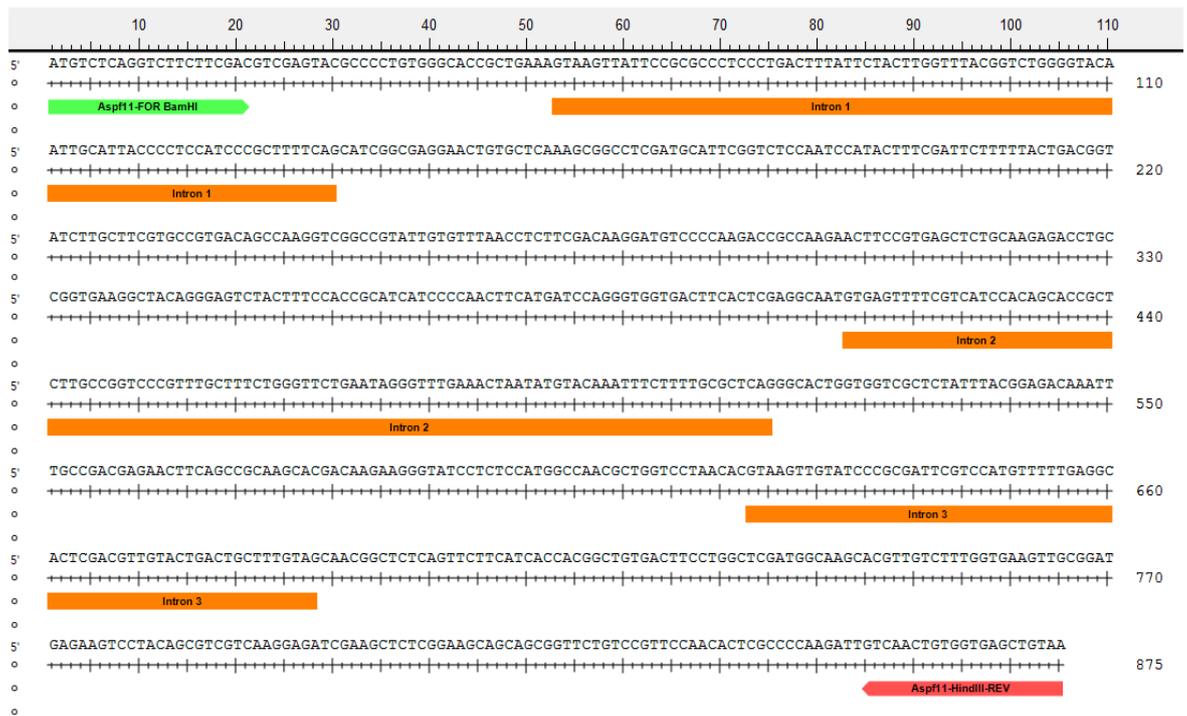


Abbildung 169: Genomische Sequenz des *Aspf11*-Gens, die drei Introns wurden orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

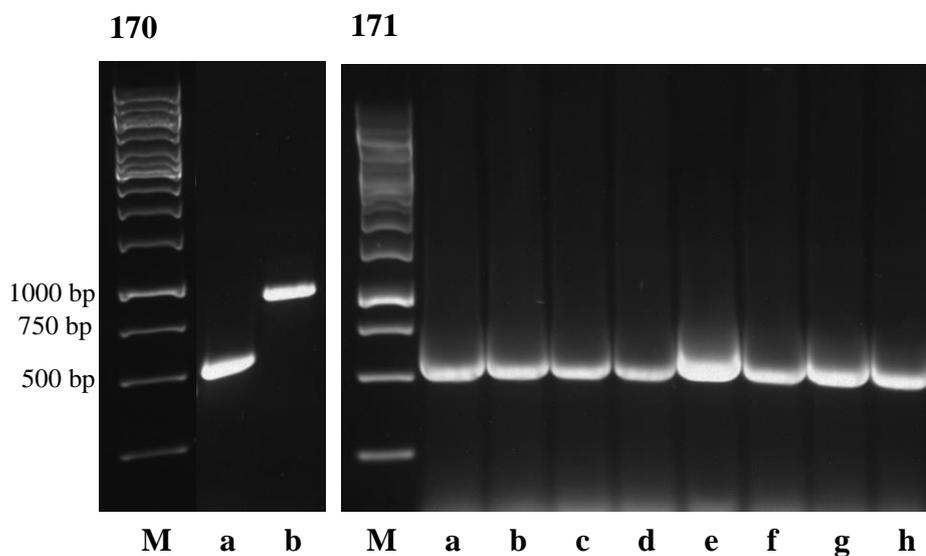


Abbildung 170: Amplifikat der PCR von *Aspf11*. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit der cDNA mit der erwarteten Größe von 618 bp. Spur b zeigt das Amplifikat der Kontroll-PCR mit der chromosomalen DNA mit einer erwarteten Größe von 775 bp

Abbildung 171: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm entstandenen *Aspf11* Klonen im Agarosegel, alle zeigen eine Bande bei der erwarteten Größe von 618 bp (Spuren a-h)

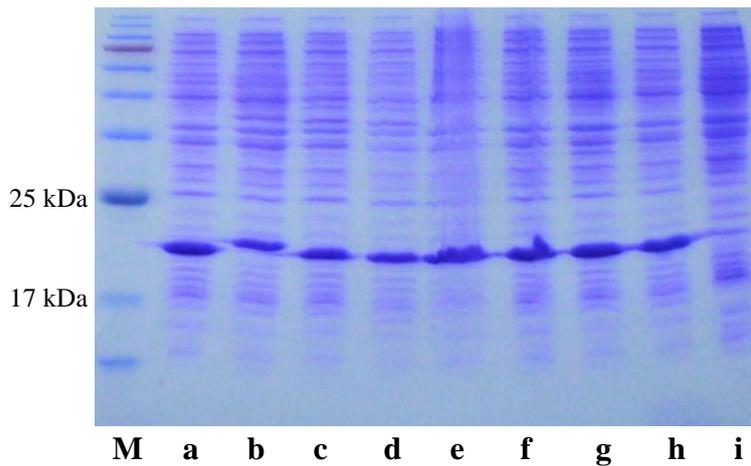


Abbildung 172 A: Coomassie-Gel der Aspfl1 Klone (Rosetta), welche laut PCR die richtige Größe hatten, sie zeigen alle eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 20 kDa (Spuren a-h), Spur i zeigt die Kontrolle ohne IPTG

Proteinseq.	HHHHHHGSMSQVFFDVEYAPVGTAE TSARNCAQSGLDAFGLQSILSILFTDGILLRAVTA	60
Aspfl1	-----MSQVFFDVEYAPVGTAE TSARNCAQSGLDAFGLQSILSILFTDGILLRAVTA	52

Proteinseq.	KVGRIVFNLFDKDVPKTAKNFRELCKRPAGEGYRESTFHRIIPNFMIQGGDFTRGNGTGG	120
Aspfl1	KVGRIVFNLFDKDVPKTAKNFRELCKRPAGEGYRESTFHRIIPNFMIQGGDFTRGNGTGG	112

Proteinseq.	RSIYGDKFADENFSRKHKDKKILSMANAGPNTNGSQFFITTAVTSWLDGKHVVFGEVADE	180
Aspfl1	RSIYGDKFADENFSRKHKDKKILSMANAGPNTNGSQFFITTAVTSWLDGKHVVFGEVADE	172

Proteinseq.	KSYSVVKEIEALGSSSGSVRSNTRPKIVNCGEL	213
Aspfl1	KSYSVVKEIEALGSSSGSVRSNTRPKIVNCGEL	205

Abbildung 172 B: Gegenüberstellung der Aspfl1-Proteinsequenz aus der Datenbank (Aspfl1) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das His-tag ist grün markiert, das rekombinante Protein gelb unterlegt

6.5 Aspfl22/Enolase (Afu6g06770)

Zahl der Introns	3
Gesamtgröße	438AS / 47,3kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	52kDa

Tabelle 53: Informationen zur Enolase

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 174).

Das Gen besitzt, einschließlich der Introns, eine Größe von 1501 bp, ohne Introns umfasst es 1317 bp und sollte, mit den in Tab. 54 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 60°C, amplifiziert werden (Abb. 175). Aufgrund der vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert. Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande mit der erwarteten Größe von 1317 bp, bzw. 1501 bp (Abb. 175). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels der cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die PstI- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass bei drei der entstandenen Klone eine Bande mit der erwarteten Größe von 1317 bp zu sehen war (Abb. 176). Diese drei wurden auf Expression getestet, einer hatte eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 52 kDa.

Eno-BamHI-FOR	GCGGGATCCATGCCTATCTCCAAGATC
Eno-PstI-REV	GCGCTGCAGTTACAGGTTGACGGCAGT

Tabelle 54: Verwendete Oligonukleotide für das Enolase-Konstrukt

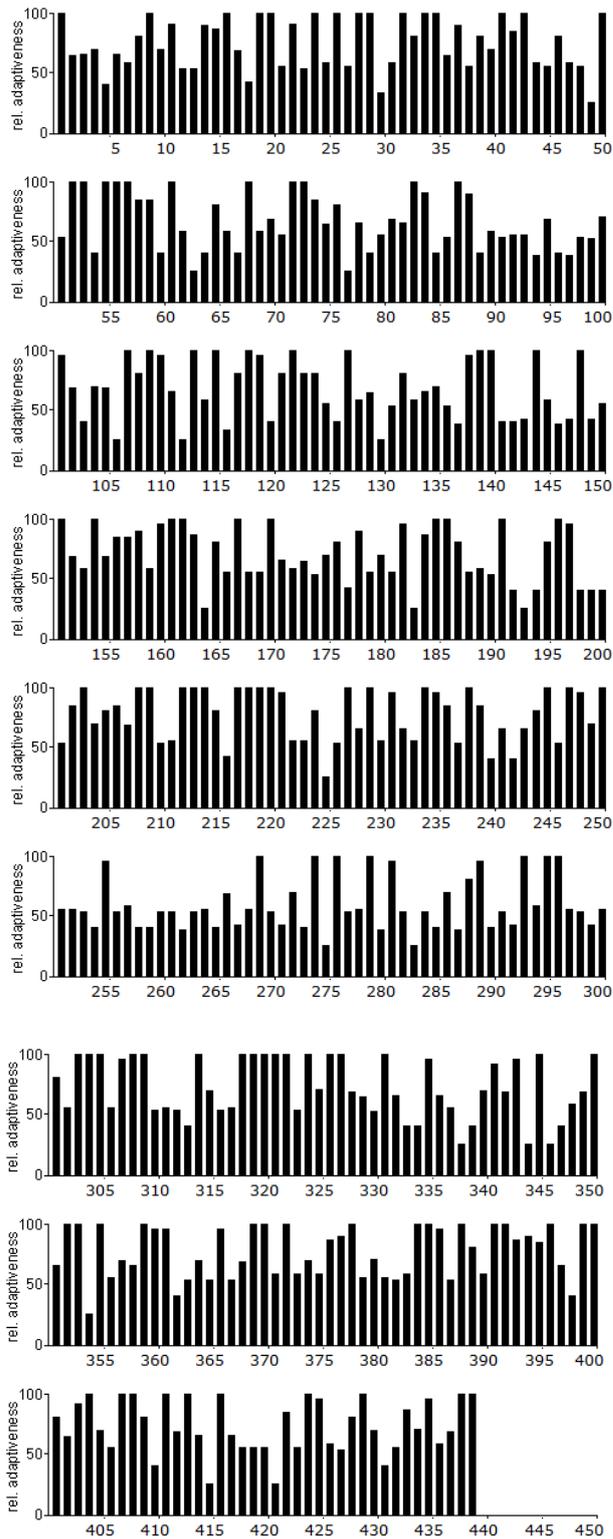


Abbildung 173: Analyse der Sequenz des Enolase-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

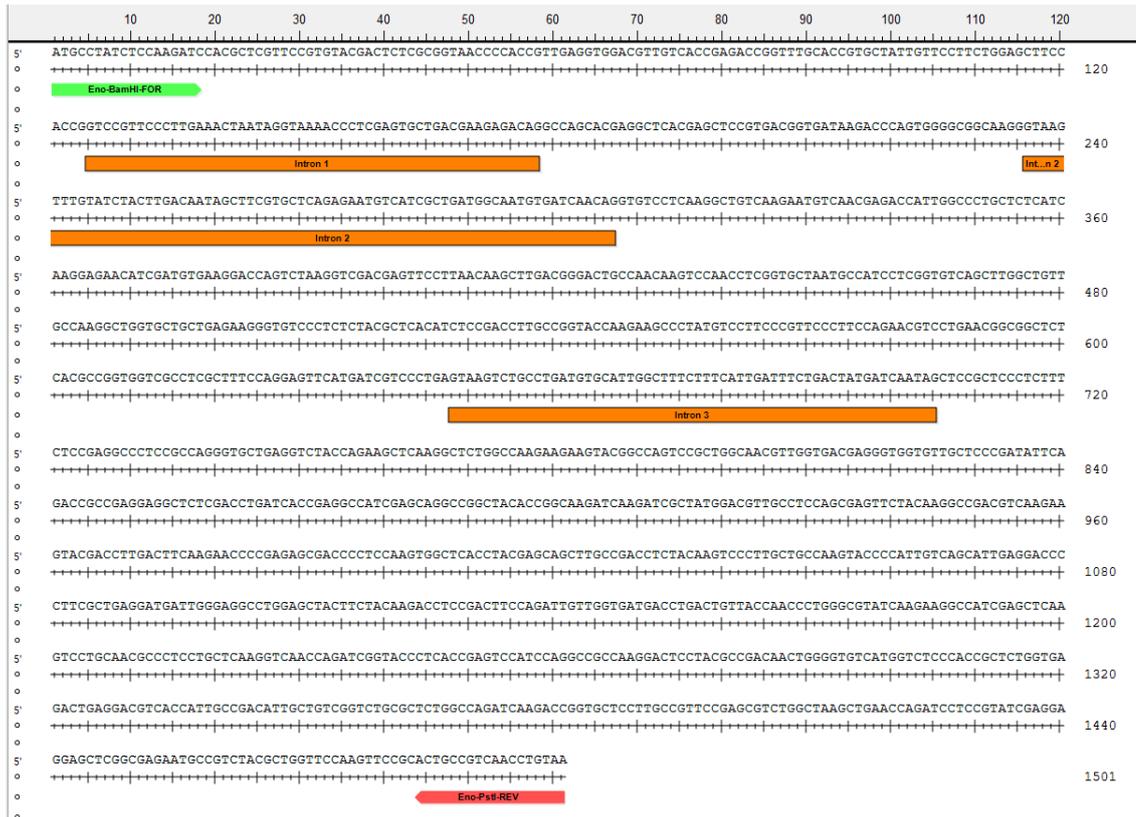


Abbildung 174: Genomische Sequenz des Enolase-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, die Introns orange, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

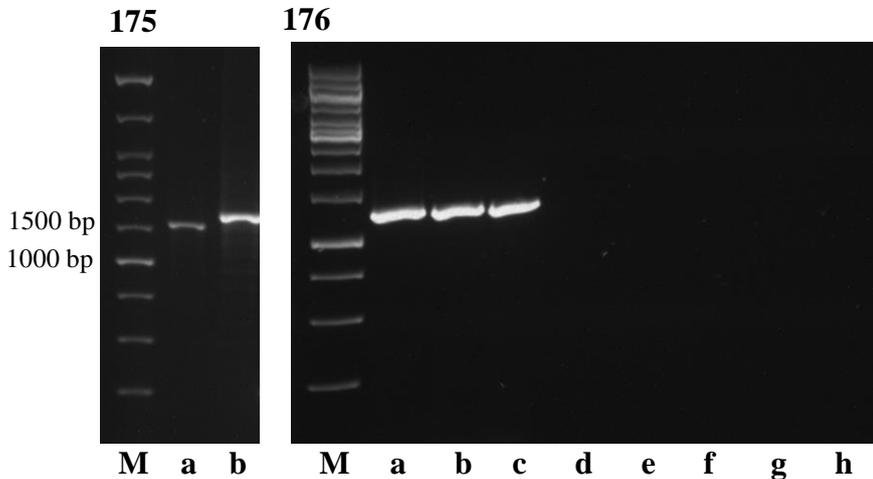


Abbildung 175: Amplifikat der PCR der Enolase. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit der cDNA mit der erwarteten Größe von 1317 bp, Spur b das der chromosomalen DNA mit der erwarteten Größe von 1501 bp

Abbildung 176: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Enolase Klonen im Agarosegel, fünf zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 1317 bp (Spuren a,c,e,g,i)

Ein Expressionsplasmid wurde im Anschluss mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass die gesamte Enolase, unter Auslassung der Introns, erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 177).

Im Anschluss erfolgte die Reinigung über die Talonsäule. Wie in Abb. 178 zu sehen ist, war eine sehr hohe Konzentration an der Enolase in der ersten Elution aufzufinden. Um das im Durchlauf noch vorhandene Protein gewinnen zu können, wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und im Anschluss eluiert. Dabei zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie beim vorherigen Durchgang (Abb. 179). So war der Großteil des Proteins, in einer geringfügig geringeren Konzentration wie im ersten Durchgang, in der ersten Elution zu finden. Dafür war in der zweiten Elution etwas mehr Protein zu finden als während des vorherigen. Da nun ausreichend gereinigtes und konzentriertes Protein vorhanden war, wurde ein nochmaliges Auftragen des Durchlaufs auf die Säulenmatrix verzichtet.

Die anschließende Dialyse auf 1 M Harnstoff und darauffolgende Zentrifugation konnte ohne Verluste der Konzentration erfolgen (Abb. 180).

Die LPS-Messung ergab einen Wert von < 1 EU/ml, somit stand diese Probe für den ELISpot Assay und den Vollblut-ELISA zur Verfügung.

Proteinseq.	-----HHHHHGS	MPISKIHARSVYDSRGNPTVEVDVVTTETGLHRAIVPSGASTGQH	60
Enolase	-----	MPISKIHARSVYDSRGNPTVEVDVVTTETGLHRAIVPSGASTGQH	44

Proteinseq.		EAHEL RDGDKTQWGGKGV LKAVKVNNETIGPALIKENIDVKDQSKVDEFLNKLDGTANKS	120
Enolase		EAHEL RDGDKTQWGGKGV LKAVKVNNETIGPALIKENIDVKDQSKVDEFLNKLDGTANKS	104

Proteinseq.		NLGNAILGVSLAVAKAGAAEKGVPLYAHISDLAGTKKPYVLPVFPQNVLNGGSHAGRL	180
Enolase		NLGNAILGVSLAVAKAGAAEKGVPLYAHISDLAGTKKPYVLPVFPQNVLNGGSHAGRL	164

Proteinseq.		AFQEFMIVPDSAPSFSEALRQAEVYQKLKALAKKKYQGSAGNVGDEGGVAPDIQTAEAA	240
Enolase		AFQEFMIVPDSAPSFSEALRQAEVYQKLKALAKKKYQGSAGNVGDEGGVAPDIQTAEAA	224

Proteinseq.		LDLITEAIEQAGYTGKIKIAMDVASSEFYKADVKKYDLDFKNPESDPSKWLTYEQLADLY	300
Enolase		LDLITEAIEQAGYTGKIKIAMDVASSEFYKADVKKYDLDFKNPESDPSKWLTYEQLADLY	284

Proteinseq.		KSLAAKYPIVSIEDPFAEDDWEAWSYFYKTSDFQIVGDDLTVTNPGRIKKAIELKSCNAL	360
Enolase		KSLAAKYPIVSIEDPFAEDDWEAWSYFYKTSDFQIVGDDLTVTNPGRIKKAIELKSCNAL	344

Proteinseq.		LLKVNQIGTLTESIQAAKDSYADNWGMVSHRSGETEDVTIADIAGVLRSGQIKTGAPCR	420
Enolase		LLKVNQIGTLTESIQAAKDSYADNWGMVSHRSGETEDVTIADIAGVLRSGQIKTGAPCR	404

Proteinseq.		SERLAKLNQILRIEEELGENAVYAGSKFRTAVNL	454

Enolase

SERLAKLNQILRIEELGENAVYAGSKFR~~TAVNL~~

438

Abbildung 177: Gegenüberstellung der Enolase-Proteinsequenz aus der Datenbank (Enolase) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das His-tag ist grün markiert, das rekombinante Protein gelb unterlegt

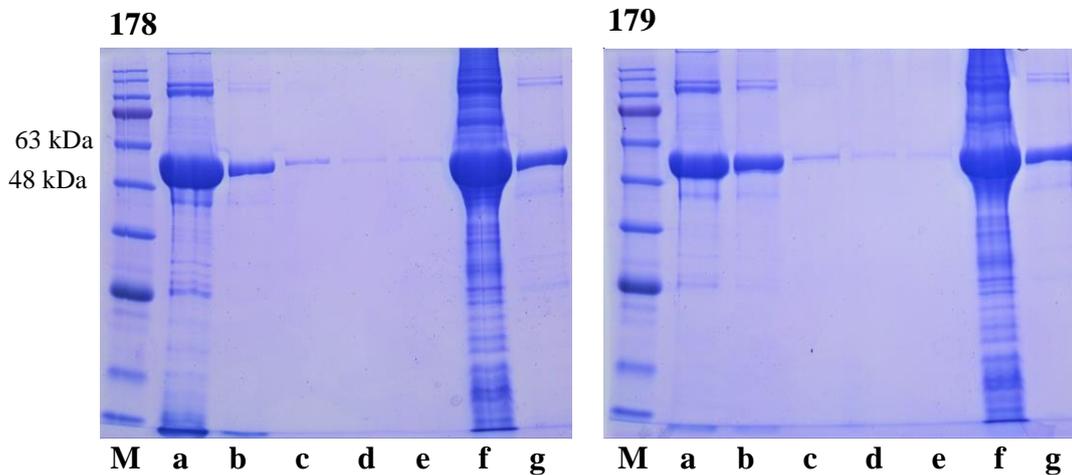


Abbildung 178: Talonreinigung der Enolase. Elutionen 1 bis 5 mit dem Elutionspuffer (Spuren a-e), Spur g zeigt den Durchlauf der Probe, Spur h die Fraktion, welche sich beim Waschschrift mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 179: Zweiter Durchgang der Talonreinigung der Enolase, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 in den Spuren a-e, der Durchlauf ist in Spur f zu sehen, die Fraktion, die sich mit dem *Binding Buffer II* von der Säule lösen ließ, in Spur g

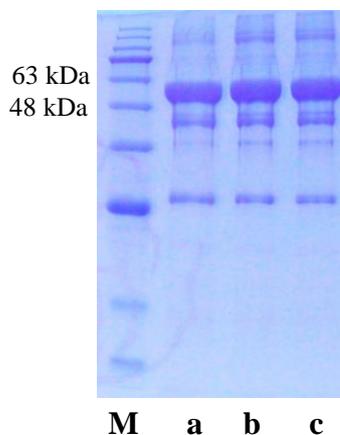


Abbildung 180: Dialyse der Enolase, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

6.6 CipC (Afu5g09330)

Zahl der Introns	2
Gesamtgröße	130AS / 15.0kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	17kDa

Tabelle 55: Informationen zu CipC

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 181)

Das Gen besitzt einschließlich der Introns eine Größe von 593 bp und sollte mit den in Tab. 56 genannten Oligonukleotiden und einem T_m-Wert von 56°C, amplifiziert werden (Abb. 182). Aufgrund des vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert und sollte somit eine Größe von 393 bp haben. Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande mit der erwarteten Größe von 393 bp, bzw. 593 bp (Abb. 183). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels der cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Ein Klon konnte als positiv identifiziert werden (Abb. 184). Dieser wurde anschließend auf Expression getestet, er hatte eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 17 kDa (Abb. 185).

CipC-BamHI-FOR	GCAGGATCCATGGCTGGGGCTGG
CipC-HindIII-REV	GCAAAGCTTTTACCAACGGTTCGAC

Tabelle 56: Verwendete Oligonukleotide für das CipC-Konstrukt

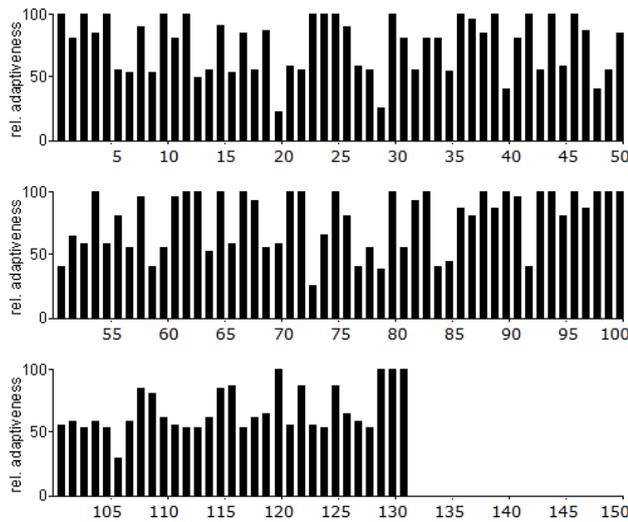


Abbildung 181: Analyse der Sequenz des CipC-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

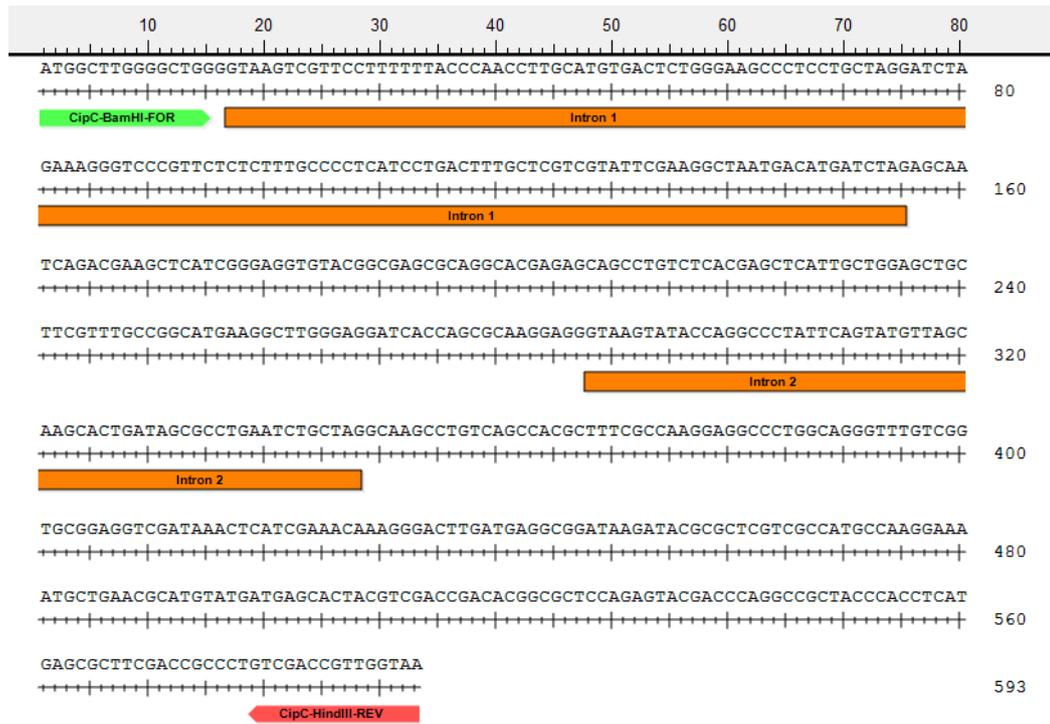


Abbildung 182: Genomische Sequenz des CipC-Gens, die Introns wurden orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

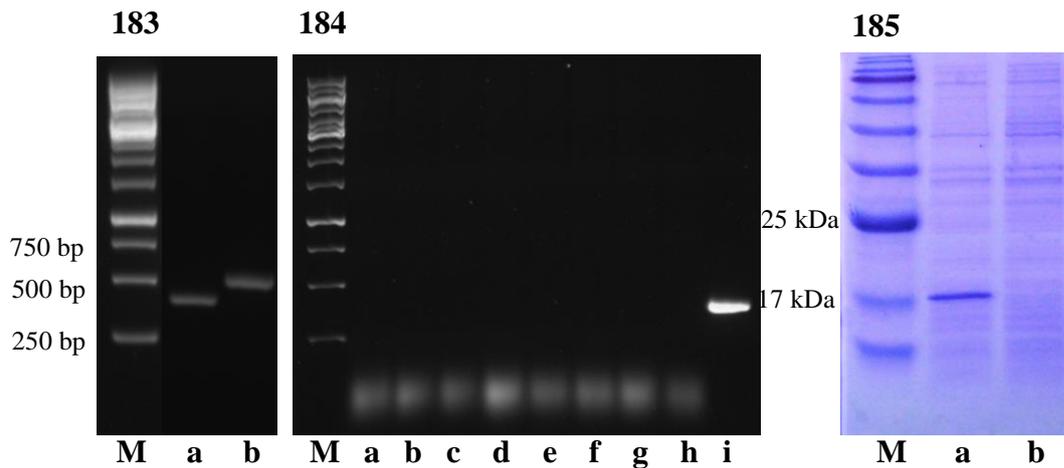


Abbildung 183: Amplifikat der PCR von CipC. Spur a zeigt das Amplifikat aus der PCR mit der cDNA mit der erwarteten Größe von 393 bp, Spur b das der chromosomalen DNA mit der erwarteten Größe von 593 bp.

Abbildung 184: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CipC Klonen im Agarosegel, einer zeigt eine Bande mit der erwarteten Größe von 393 bp (Spur i)

Abbildung 185: Coomassie-Gel eines Lysats des CipC Klon, in Spur a ist eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 17 kDa zu sehen, Spur b zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Die Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* ergab, dass das gesamte Gen, ohne Introns, erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 186).

Auch ein Western Blot mit dem spezifischen Antikörper α CipC-K96-C3 konnte dies bestätigen (Abb. 187).

Bei der Reinigung löste sich dieses Protein bereits beim Waschschriff mit dem *Binding buffer* II vollständig und sauber von der Säule (Abb. 189). Der Durchlauf zeigte, dass nicht alles Protein an die Säule gebunden hatte (Abb. 188). Da jedoch eine ausreichende Menge an gereinigtem und konzentriertem CipC gewonnen werden konnte, wurde auf ein erneutes Auftragen auf die Säulenmatrix verzichtet. Bei der darauf erfolgten Dialyse konnte bereits makroskopisch gesehen werden, dass das Protein ausgefallen war. Dies wurde nach der Zentrifugation der dialysierten Probe noch deutlicher, da sich ein Pellet gebildet hatte. Wie in Abb. 190 zu sehen ist, bestätigte das Coomassie-Gel diesen Verdacht. So erfolgte im Anschluss eine Resuspendierung des Pellets mit dem Überstand (Abb. 191). CipC war das einzige Protein, welches in dem Puffer mit 1M Harnstoff ausfiel.

Die LPS-Konzentration wurde mit < 1 EU/ml gemessen und somit stand CipC für T-Zell-Analysen zur Verfügung, wenn auch nicht als lösliches Protein.

Proteinseq.	HHHHHGHSHVISSIAS	MAWGWEQSDEAHREYGERRHESLSHEL IAGAASFAGMKAWED	60
CipC	-----	MAWGWEQSDEAHREYGERRHESLSHEL IAGAASFAGMKAWED	44

Proteinseq.		HQRKEGKPVSHAFAKEALAGFVGA EVDKLIETKGLDEADKIRARRHAKENAERMYDEHYV	120
CipC		HQRKEGKPVSHAFAKEALAGFVGA EVDKLIETKGLDEADKIRARRHAKENAERMYDEHYV	104

Proteinseq.		DRHGAPEYDPGRYPPHERFDRPVDRW	146
CipC		DRHGAPEYDPGRYPPHERFDRPVDRW	130

Abbildung 186: Gegenüberstellung der CipC-Proteinsequenz aus der Datenbank (CipC) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.). Das rekombinante Protein ist gelb unterlegt, das His-tag aus dem Vektor ist grün markiert

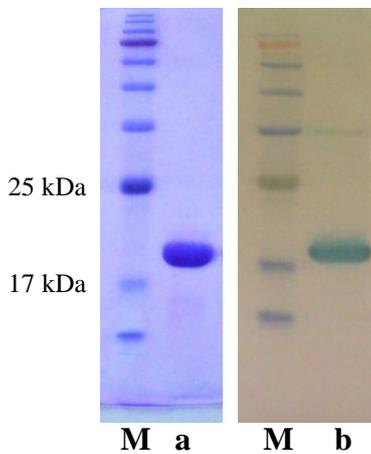


Abbildung 187: Coomassie-Gel und Western Blot von CipC. Spur a zeigt das Coomassie-Gel des gereinigten His₆-CipC, Spur b den entsprechenden Western Blot mit dem spezifischen Antikörper α CipC-K96-E3.

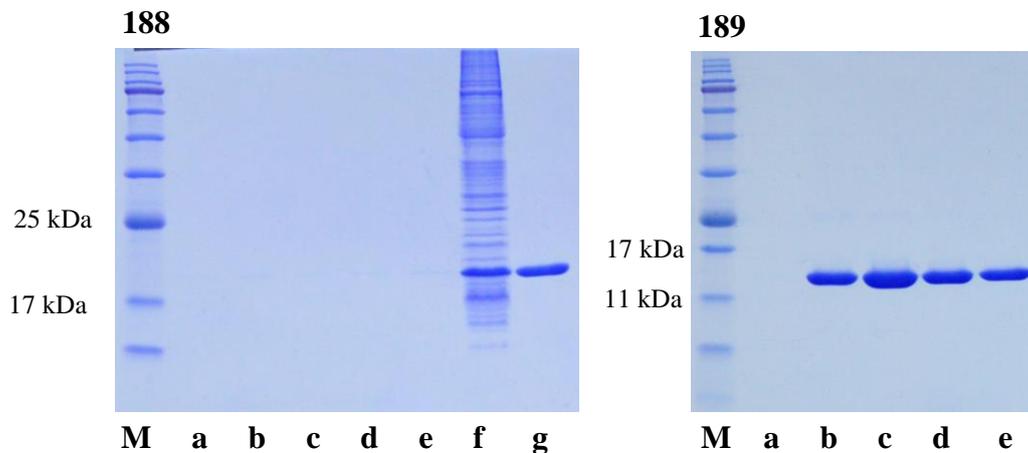


Abbildung 188: Talonreinigung von CipC (Elutionen). Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem Elutionspuffer, Spur f zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur g die Fraktion, welche sich beim Waschschrift mit

Binding Buffer II gelöst hatte

Abbildung 189: Talonreinigung von CipC (Washfraktionen) Elutionen 1 bis 5 (Spuren a-e) mit dem *Binding Buffer II*

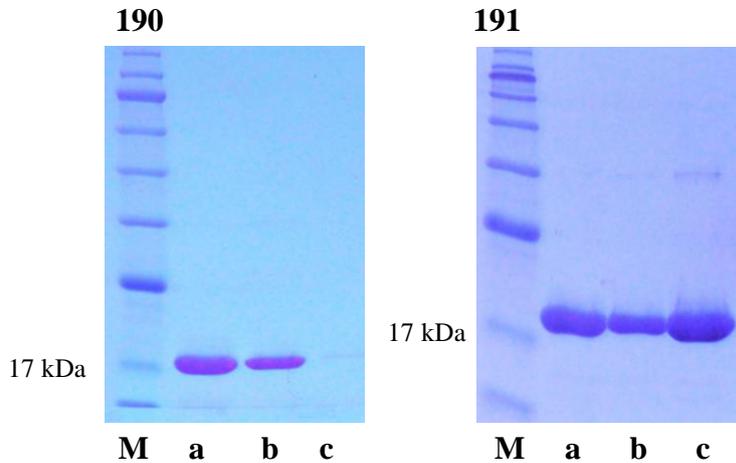


Abbildung 190: Dialyse von CipC, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und Überstand nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

Abbildung 191: Zustand von CipC vor der Dialyse (Spur a), danach (Spur b) und das resuspendierte Pellet (Spur c)

7. Nicht erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf12/Hsp90	Afu5g04170
Smt1	Afu3g09320

Tabelle 57: Liste aller nicht erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine

7.1 Aspf12 (Afu5g04170)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	706AS /80,6 kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	71kDa

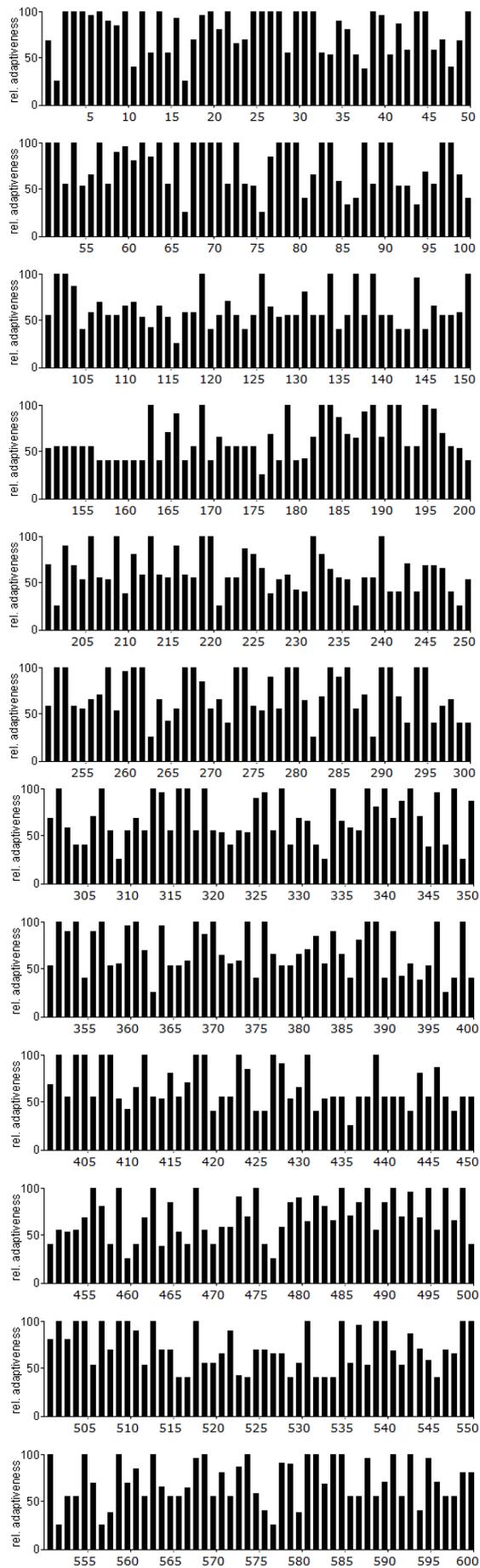
Tabelle 58: Informationen zu Aspf12

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 192).

Das Gen besitzt einschließlich des einen Introns eine Größe von 2182 bp, ohne Intron umfasst es 2121 bp und sollte, mit den in Tab. 59 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 55°C, amplifiziert werden (Abb. 193). Aufgrund der Intronstrukturen und der großen Größe, sollte das Gen erst ab dem 2. Exon mit chromosomaler DNA amplifiziert werden, sodass es eine Größe von 1848 bp haben sollte, was sich im Agarosegel bestätigen ließ (Abb. 194). Anschließend wurde es über die BamHI- und die HindIII- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass keiner der entstandenen Klone das Konstrukt aufgenommen hatte. Auch eine Klonierung in den *E. coli*-Rosetta-Stamm brachte nur negative Klone hervor (Abb. 195). Aus Zeitgründen wurde nach mehreren Fehlversuchen die Herstellung eingestellt. Das geplante rekombinante Protein sollte eine Größe von 71 kDa besitzen (Abb. 196).

Aspf12-BamHI-FOR	GTAGGATCCAACCTCGGTACCATTGCC
Aspf12-HindIII-REV	GTAAAGCTTCTAGTCAACCTCCTCCAT

Tabelle 59: Verwendete Oligonukleotide für das Aspf12-Konstrukt



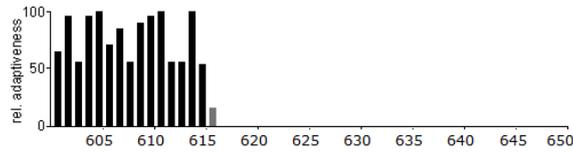


Abbildung 192: Analyse der Sequenz des AspF12-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

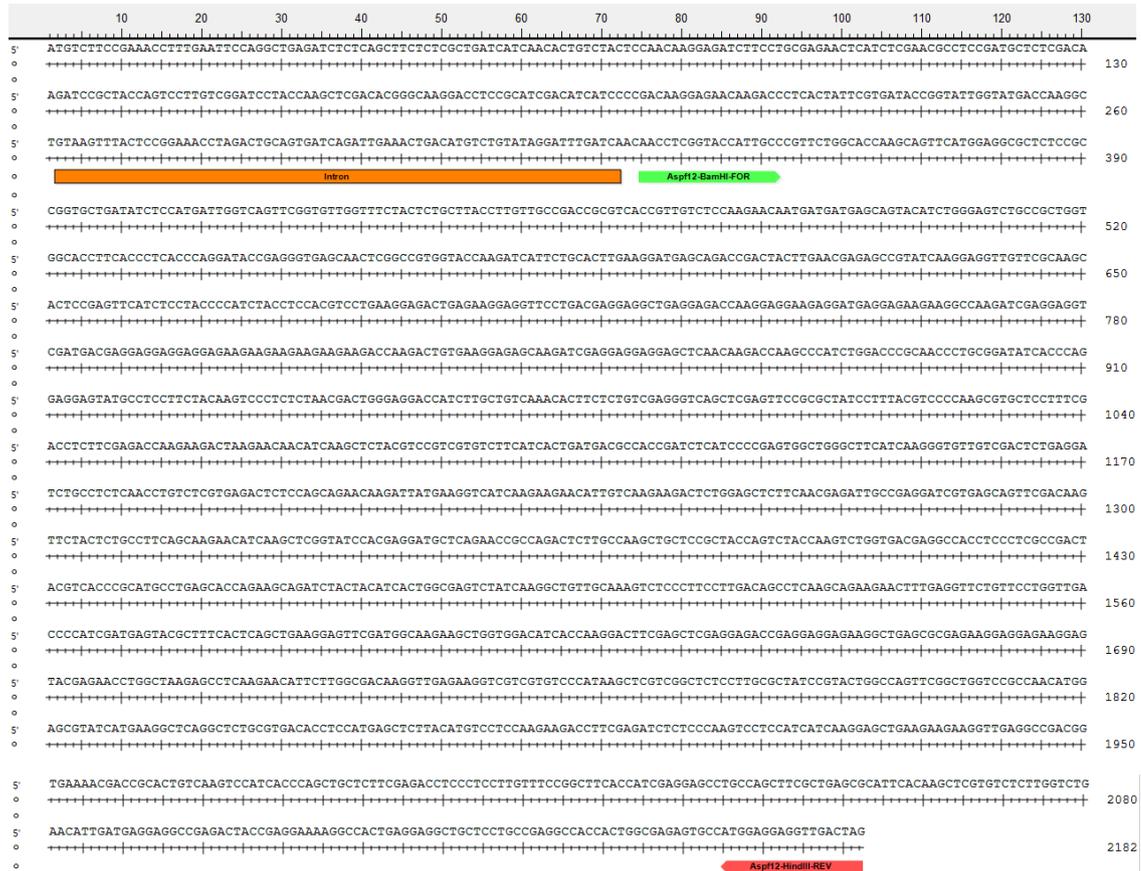


Abbildung 193: Genomische Sequenz des AspF12-Gens, das Intron wurde orange markiert, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

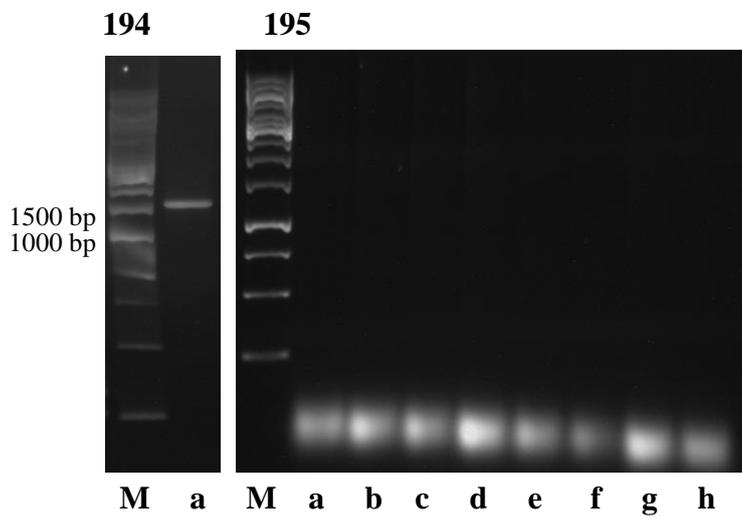


Abbildung 194: Amplifikat der PCR von Aspf12. Spur a zeigt das Amplifikat aus der PCR, es besitzt die erwartete Größe von 1848 bp

Abbildung 195: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm entstandenen Aspf12 Klonen im Agarosegel, keiner zeigt eine Bande mit der erwarteten Größe von 1848 bp

```

1  MSSETFEFQA EISQLLSLII NTVYSNKEIF LRELISNASD ALDKIRYQSL
51  SDPTKLDTGK DLRIDIIPDK ENKTLTIRDT GIGMTKADLI NNLGTIARSG
101 TKQFMEALSA GADISMIGQF GVGFYSAVLV ADRVTVVSKN NDDEQYIWES
151 AAGGTFTLTQ DTEGEQLGRG TKIILHLKDE QTDYLNESRI KEVVRKHSEF
201 ISYPIYLHVL KETEKEVPDE EAEETKEEED EEKAKIEEV DDEEEEEKKK
251 KKKTKTVKES KIEEEELNKT KPIWTRNPAD ITQEEYASFY KSLSDWEDH
301 LAVKHFSVEG QLEFRAILYV PKRAPFDLFE TKKTKNNIKL YVRRVFITDD
351 ATDLIPEWLG FIKGVVDSED LPLNLSRETL QQNKIMKVIK KNIVKKTLEL
401 FNEIAEDREQ FDKFYSAFSK NIKLGIHEDA QNRQTLAKLL RYQSTKSGDE
451 ATSLADYVTR MPEHQKQIYY ITGESIKAVA KSPFLDSLKQ KNFEVLFLVD
501 PIDEYAFTQL KEFDGKKLVD ITKDFELEET EEEKAEREKE EKEYENLAKS
551 LKNILGDKVE KVVVSHKLVG SPCAIRTGQF GWSANMERIM KAQALRDTSM
601 SSYMSSKKTf EISPKSSIIK ELKKKVEADG ENDRTVKSIT QLLFETSLLV
651 SGFTIEEPAS FAERIHKLVS LGLNIDEEAE TTEEKATEEA APAEATTGES
701 AMEEVD

```

Abbildung 196: Proteinsequenz von Aspf12, gelb unterlegt ist das geplante rekombinante Protein

7.2 Smt1 (Afu4g09190)

Zahl der Introns	0
Gesamtgröße	401AS /44,6 kDa
Signalsequenz	nein
Größe des His ₆ -Proteins	48kDa

Tabelle 60: Informationen zu Smt1

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 197).

Das Gen sollte mit den in Tab. 61 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 58°C amplifiziert werden (Abb. 198). Die Größe des Amplifikats stimmte mit der erwarteten von 1206 bp überein (Abb. 199) und so konnte das PCR-Produkt gereinigt und anschließend über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert werden. Die bei dieser Transformation entstandenen Klone wurden per PCR überprüft, drei konnten als positiv identifiziert werden (Abb. 200). Bei der darauffolgenden Überprüfung auf Expression zeigte sich bei keinem der Klone eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 48 kDa. Auch eine Umklonierung in einen anderen *E. coli*-Stamm (Rosetta) brachte keine exprimierenden Klone hervor (Abb. 201). Die Sequenzierung eines Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 202). Da auch bei der zuvor stattgefundenen Analyse der Sequenz des Smt1-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* keine Hinweise für eine fehlende Expression zu finden waren, wurden aus Zeitgründen keine weiteren Versuche unternommen.

Smt1-BamHI-FOR	ACTGGATCCATGATGGAAACACAGACC
Smt1-HindIII-REV	ACTAAGCTTTCACCGCGAAGGCTTTTG

Tabelle 61: Verwendete Oligonukleotide für das Smt1-Konstrukt

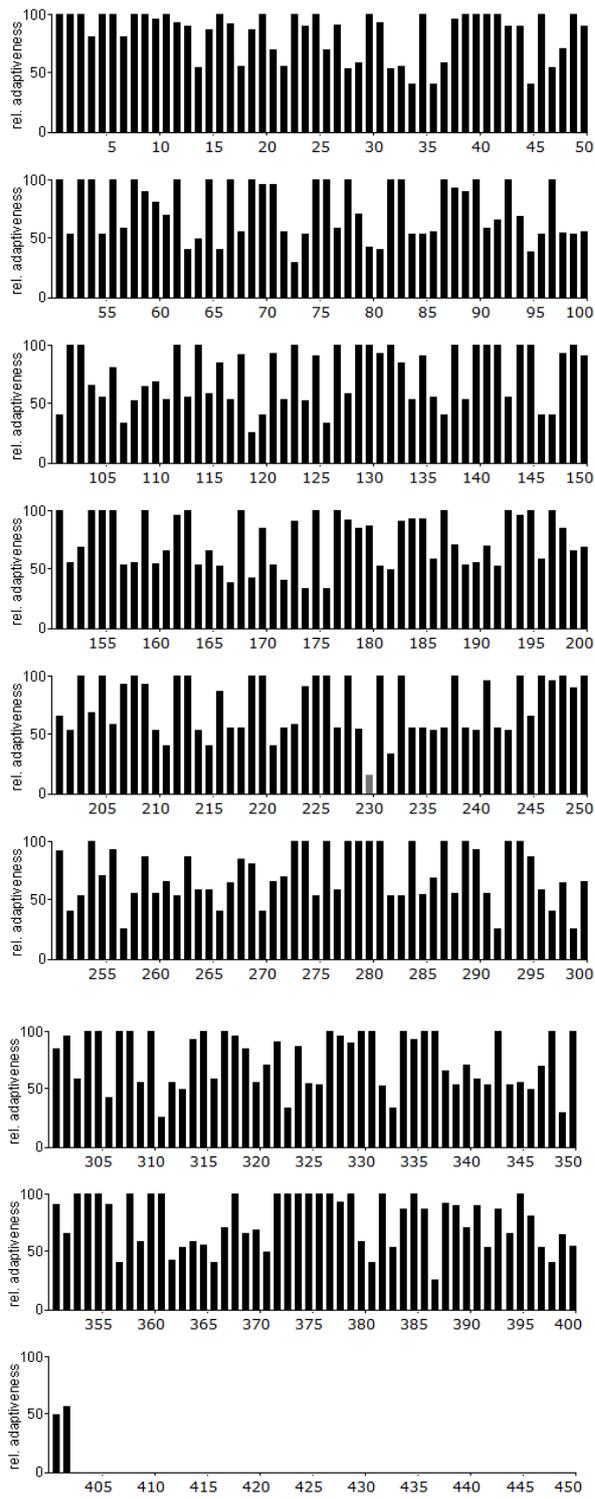


Abbildung 197: Analyse der Sequenz des Smt1-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

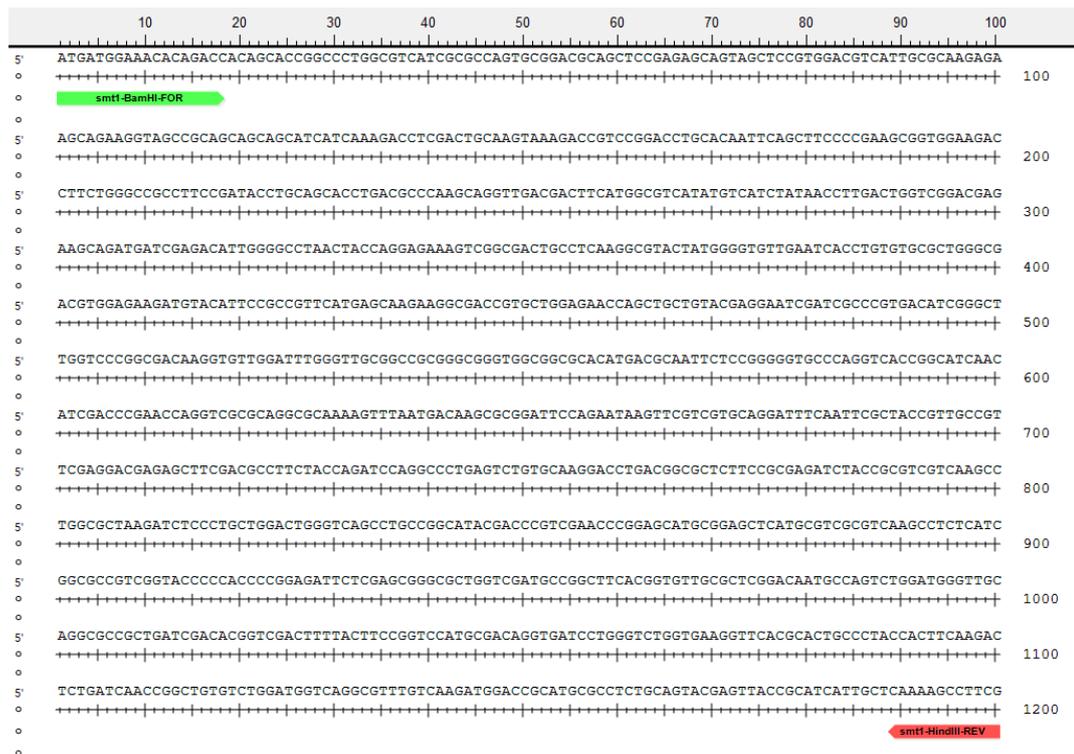


Abbildung 198: Genomische Sequenz des Smt1-Gens, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

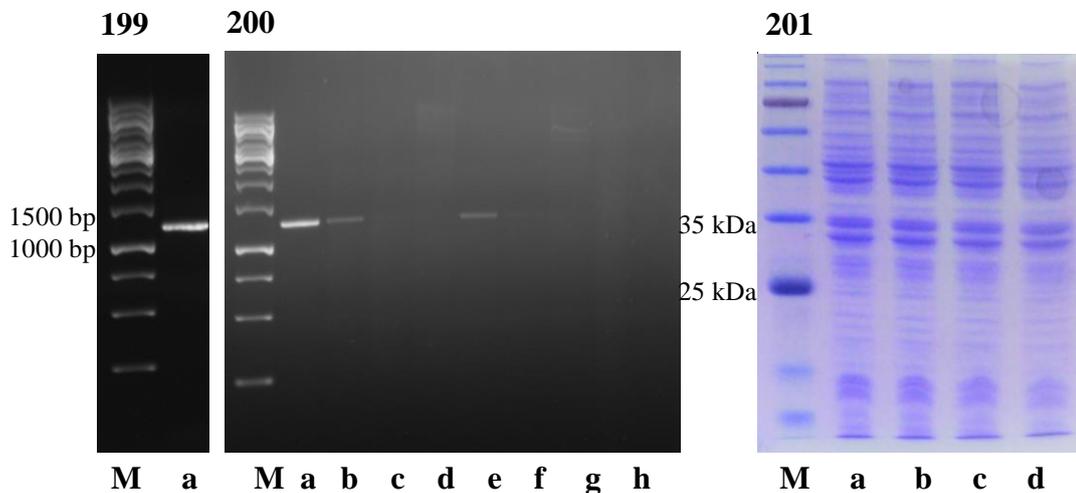


Abbildung 199: Amplifikat der PCR von smt1. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit der erwarteten Größe von 1206 bp

Abbildung 200: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation in *E. coli* (M15) entstandenen Smt1 Klone im Agarosegel, drei zeigen Banden mit der erwarteten Größe von 1206 bp (Spuren a,b,e)

Abbildung 201: Coomassie-Gel der Smt1 Klone (M15), keiner zeigt eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 48 kDa (Spuren a-c), die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG ist in Spur d zu sehen

Proteinseq.	HHHHHGSMMETQTTAPALASSRQCGRSSESSSSVDVIAQEKQKVA AAAASSKTSTASKD	60
Smt1	-----MMETQTTAPALASSRQCGRSSESSSSVDVIAQEKQKVA AAAASSKTSTASKD *****	52
Proteinseq.	RPDLHNSASPKRWKTFWAAFRYLQHLTPKQVDDFMASYVIYNLDWSDEKQMIETLGPNYQ	120
Smt1	RPDLHNSASPKRWKTFWAAFRYLQHLTPKQVDDFMASYVIYNLDWSDEKQMIETLGPNYQ *****	112
Proteinseq.	EKVGDCCLKAYYGVLNHLICALGDVEKMYIPPFMSKKATVLENQLLYEESIARDIGLGPQDK	180
Smt1	EKVGDCCLKAYYGVLNHLICALGDVEKMYIPPFMSKKATVLENQLLYEESIARDIGLGPQDK *****	172
Proteinseq.	VLDLGCGRGRVAAHMTQFSGGAQVTGINIDPNQVAQAQKFNDKRGFQNKFFVQDFNSLPL	240
Smt1	VLDLGCGRGRVAAHMTQFSGGAQVTGINIDPNQVAQAQKFNDKRGFQNKFFVQDFNSLPL *****	232
Proteinseq.	PFEDESFDAFYQIQALSLCKDLTALFREIYRVVVKPGAKISLLDWVSLPAYDPSNPEHAEL	300
Smt1	PFEDESFDAFYQIQALSLCKDLTALFREIYRVVVKPGAKISLLDWVSLPAYDPSNPEHAEL *****	292
Proteinseq.	MRRVKPLIGAVGTPTPEILERALVDAGFTVLRSDNASLDGLQAPLIDTVDFYFRSMRQVI	360
Smt1	MRRVKPLIGAVGTPTPEILERALVDAGFTVLRSDNASLDGLQAPLIDTVDFYFRSMRQVI *****	352
Proteinseq.	LGLVKVHALPYHFCTLINRLCLDGQAFVKMDRMLCSTSYRIIAQKPSR	409
Smt1	LGLVKVHALPYHFCTLINRLCLDGQAFVKMDRMLCSTSYRIIAQKPSR *****	401

Abbildung 202: Gegenüberstellung der Smt1-Proteinsequenz aus der Datenbank (Smt1) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Smt1). Das His-tag ist grün dargestellt, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt

8. Erfolgreich hergestellte Konidienproteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte Konidienproteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Pst2	Afu1g02820
CcpA	Afu1g13670

Tabelle 62: Liste aller erfolgreich hergestellten Konidienproteine

8.1 Pst2 (Afu1g02820)

Zahl der Introns	3
Gesamtgröße	203AS / 21,8kDa
Signalsequenz	1-22
Größe des His ₆ -Proteins	18kDa

Tabelle 63: Informationen zu Pst2

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 203).

Das Gen besitzt einschließlich der Introns und der Signalsequenz eine Größe von 799 bp, unter Auslassung dieser umfasst es 558 bp und sollte mit den in Tab. 64 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 59°C amplifiziert werden (Abb. 204). Aufgrund der vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert. Parallel zu diesem Ansatz wurde eine PCR mit chromosomaler DNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das Agarosegel zeigte bei den beiden Amplifikaten jeweils eine Bande mit der erwarteten Größe von 558 bp, bzw. 799 bp (Abb. 205). Anschließend wurde das Amplifikat, welches mittels der cDNA hergestellt wurde, gereinigt und über die BamHI- und die HindIII-Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass bei fünf der entstandenen Klone eine Bande mit der erwarteten Größe zu sehen war (Abb. 206). Diese wurden anschließend auf Expression getestet, zwei hatten eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 18 kDa.

Pst2- BamHI-FOR	GCAGGATCCTACTCCATGTACGGCCAC
Pst2-HindIII-REV	GCAAAGCTTTCACGCGAAGTTGACCTT

Tabelle 64: Verwendete Oligonukleotide für das Pst2-Konstrukt

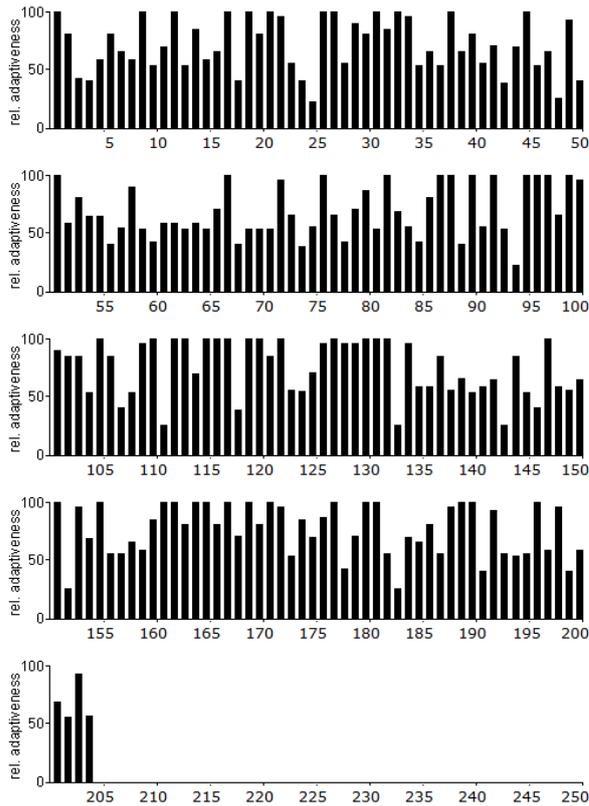


Abbildung 203: Analyse der Sequenz des Pst2-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

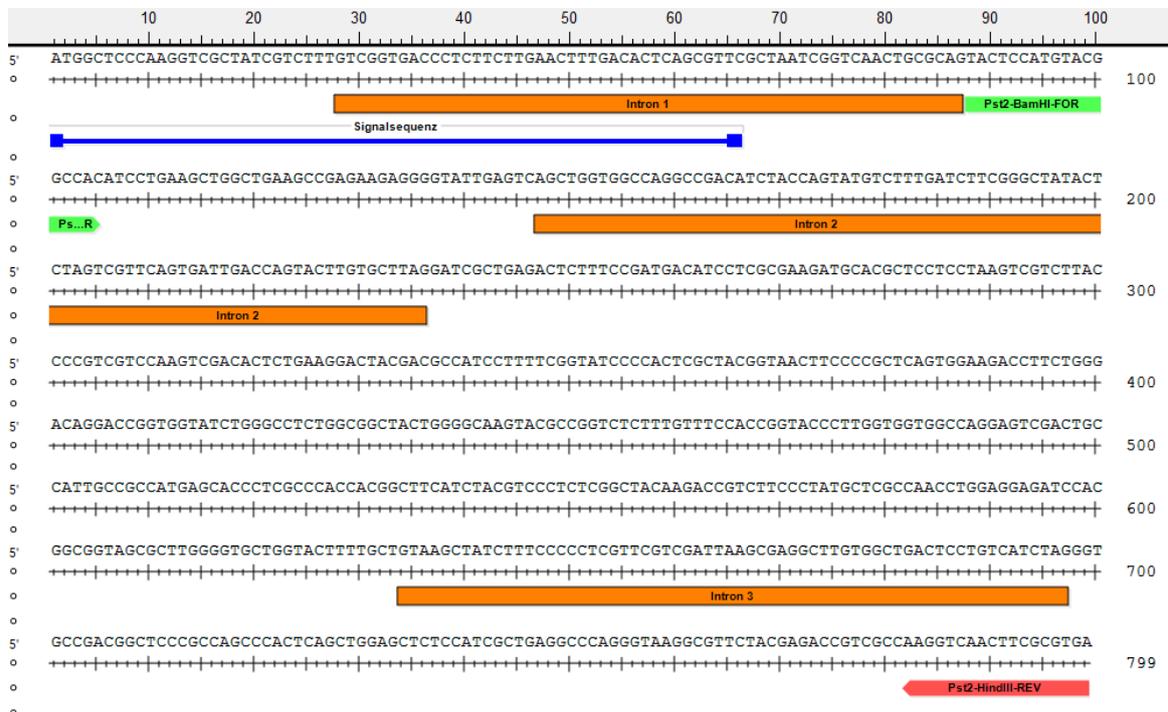


Abbildung 204: Genomische Sequenz des Pst2-Gens, die Signalsequenz wurde blau markiert, die Introns orange, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot dargestellt

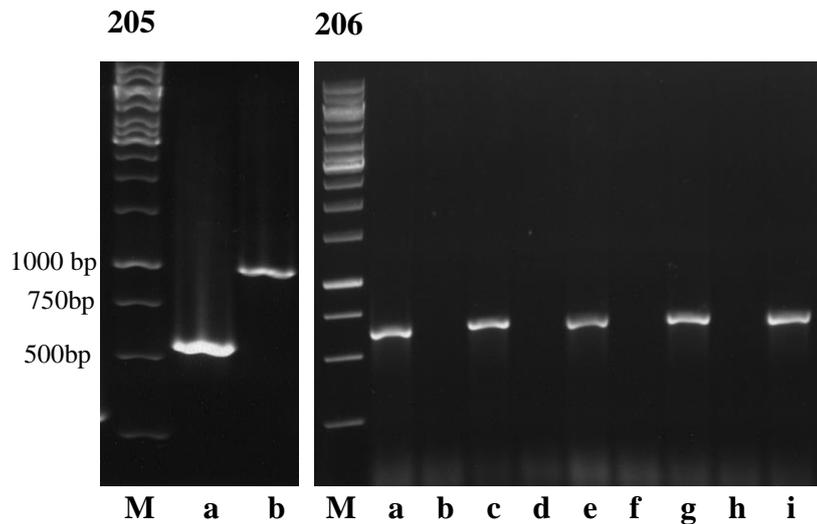


Abbildung 205: Amplifikat der PCR von Pst2. Spur a zeigt das Amplifikat der PCR mit der cDNA mit der erwarteten Größe von 558 bp, Spur b das der chromosomalen mit der erwarteten Größe von 799 bp

Abbildung 206: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen Pst2 Klonen im Agarosegel, fünf zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 558 bp (Spuren a,c,e,g,i)

Bei der im Anschluss stattgefundenen Sequenzierung eines Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer* konnte nachgewiesen werden, dass der gewünschte Bereich erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 207).

Die Elution bei der anschließenden Reinigung über die Talonsäule erfolgte bei diesem Protein über den Elutionspuffer. Im ersten Durchgang war die größte Menge Protein in Elution zwei zu finden, in den darauffolgenden drei Elutionsfraktionen ließ sich kein Protein mehr aus der Säule lösen (Abb. 208). Da im Durchlauf erkennbar war, dass dort noch rekombinantes Protein vorhanden war, wurde dieser ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und eluiert. Bei diesem zweiten Durchgang konnte dabei ein ähnliches Ergebnis erzielt werden, so war auch hier in der zweiten Elution der größte Anteil an Protein vorhanden (Abb. 209).

Die nach der Dialyse (Abb. 210) stattgefundenene LPS-Messung ergab einen Wert von 4,72 EU/ml, somit stand die Probe für den Einsatz im ELISpot Assay zur Verfügung.

Proteinseq.	-----HHHHHGGSEKRGIESAGGQADIYQIAETLSDDILAKMHAPPKSSYP	46
Pst2	MAPKVAIVFYSMYGHILKLAEA EKRGIESAGGQADIYQIAETLSDDILAKMHAPPKSSYP	60
	* : :*****	
Proteinseq.	VVQVDTLKDYDAILFGIPTRYGNFPAQWKTFFWDRTGGIWAASGGYWGKYAGLFVSTGTLGG	106
Pst2	VVQVDTLKDYDAILFGIPTRYGNFPAQWKTFFWDRTGGIWAASGGYWGKYAGLFVSTGTLGG	120

Proteinseq.	GQESTAIAAMSTLAHHGFIYVPLGYKTVFPMLANLEEIHGGSAAWGAGTFAGADGSRQPTQ	166
Pst2	GQESTAIAAMSTLAHHGFIYVPLGYKTVFPMLANLEEIHGGSAAWGAGTFAGADGSRQPTQ	180

Proteinseq.	LELSIAEAQGGKAFYETVAKVNFA	189
Pst2	LELSIAEAQGGKAFYETVAKVNFA	203

Abbildung 207: Gegenüberstellung der Pst2-Proteinsequenz aus der Datenbank (Pst2) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Das His-tag ist grün markiert, die Signalsequenz rot. Das rekombinante Protein ist gelb unterlegt

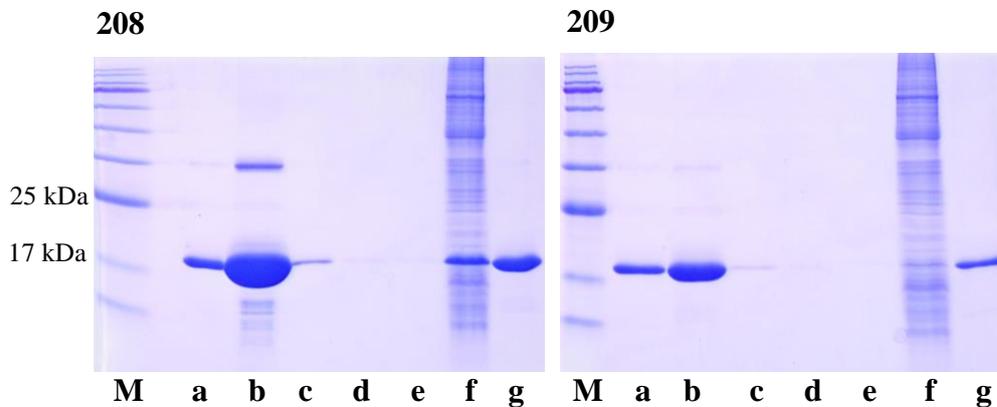


Abbildung 208: Talonreinigung von Pst2. Elutionen 1 bis 5 mit dem Elutionspuffer (Spuren a-e), Spur g zeigt den Durchlauf der Probe durch die Säule, Spur h die Fraktion, welche sich mit dem *Binding Buffer II* gelöst hatte

Abbildung 209: Zweiter Durchgang der Talonreinigung von Pst2, der Durchlauf aus dem ersten Durchgang wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen. Zu sehen sind die Elutionen 1 bis 5 in den Spuren a-e, der Durchlauf ist in Spur f und die Fraktion, die sich mit dem *Binding buffer II* von der Säule lösen ließ, ist in Spur g zu sehen

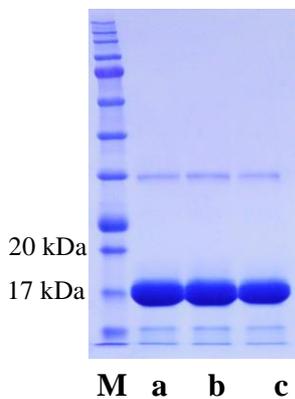


Abbildung 210: Dialyse von Pst2, vorher (Spur a), nachher (Spur b) und nach anschließender Zentrifugation (Spur c)

8.2 CcpA (Afu1g13670)

Zahl der Introns	1
Gesamtgröße	235AS / 25,5kDa
Signalsequenz	1-22
Größe des His ₆ -Proteins	28kDa

Tabelle 65: Informationen zu CcpA

Vor der Amplifikation wurde eine *codon usage* erstellt, kein Bereich wurde als ungünstig für eine Expression vorhergesagt (Abb. 211).

Das Gen besitzt einschließlich des Introns und der Signalsequenz eine Größe von 757 bp und sollte mit den in Tab. 66 genannten Oligonukleotiden und einem Tm-Wert von 66°C amplifiziert werden (Abb. 212). Es enthält im Bereich der Signalsequenz ein Intron, somit konnte es mit chromosomaler DNA amplifiziert werden und sollte so eine Größe von 690 bp besitzen. Wie in Abb. 213 zu sehen ist, konnte ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 690 bp hergestellt werden. Anschließend wurde das Amplifikat gereinigt und über die KpnI- und die Sall- Schnittstellen in den Vektor pQE30 kloniert und in *E. coli* (M15) transformiert. Die bei dieser Transformation entstandenen Klone wurden per PCR überprüft, sechs konnten als positiv identifiziert werden (Abb. 214). Bei der darauffolgenden Überprüfung auf Expression zeigte sich bei drei Klonen eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 28 kDa (Abb. 215).

Eine Sequenzierung eines Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte (Abb. 216).

Auf eine Reinigung mußte bei diesem Protein aus Zeitgründen verzichtet werden.

CcpA-KpnI-FOR	AGGGTACCGTCACCGTGGCATCAGCGCTC
CcpA-Sall-REV	AGTGTCGACTCACCGGAAACCGAGCACCTT

Tabelle 66: Verwendete Oligonukleotide für das CcpA-Konstrukt

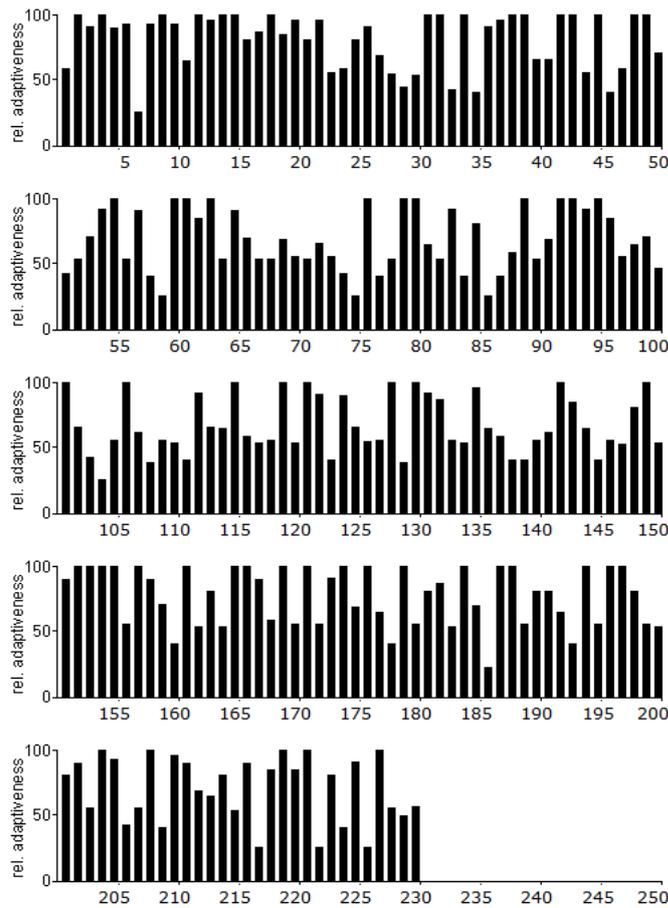


Abbildung 211: Analyse der Sequenz des CcpA-Gens mit der *codon usage* von *E. coli*.

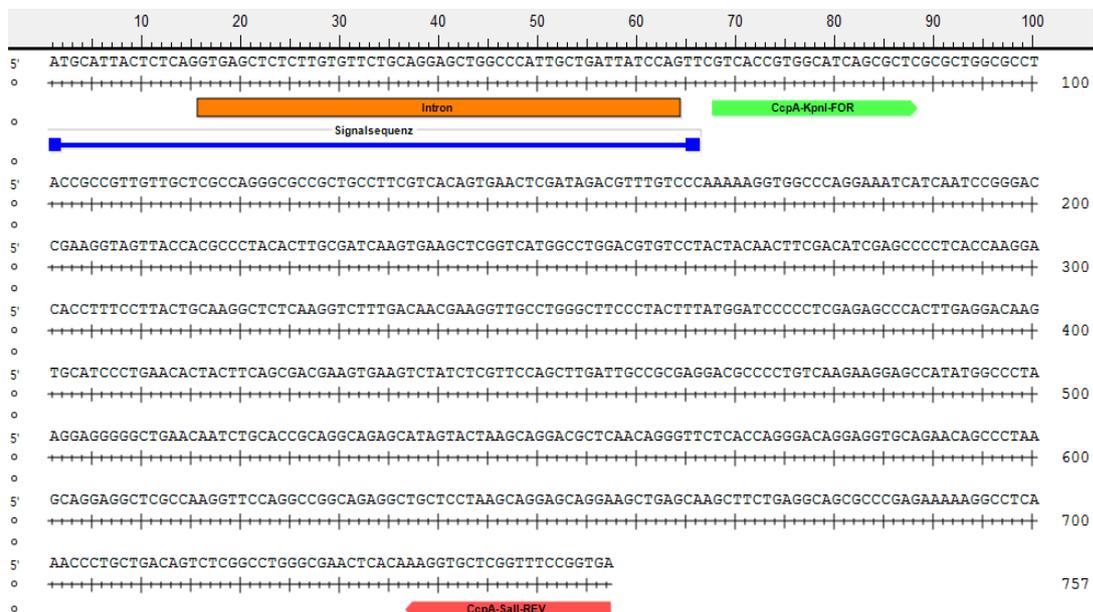


Abbildung 212: Genomische Sequenz des CcpA-Gens, das Intron ist orange dargestellt, die Signalsequenz blau, der *forward primer* ist grün und der *reverse primer* rot markiert

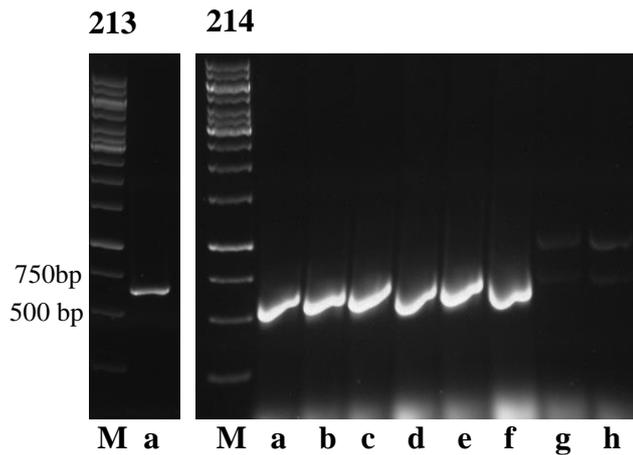


Abbildung 213: Amplifikat der PCR von CcpA. Spur a zeigt das Amplifikat mit der erwarteten Größe von 690 bp

Abbildung 214: Auftrennung der PCR-Produkte von den bei der Transformation entstandenen CcpA Klonen im Agarosegel, sechs Klone (Spuren a-f) zeigen eine Bande mit der erwarteten Größe von 690 bp

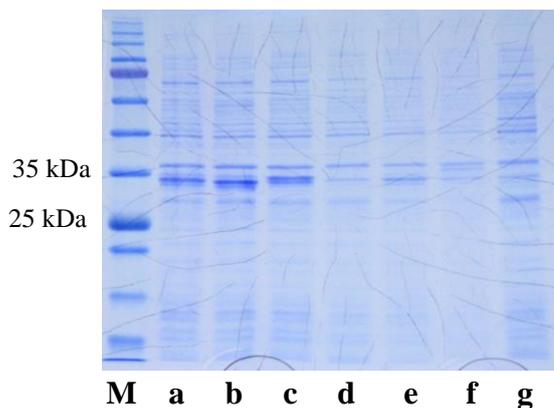


Abbildung 215: Coomassie-Gel der CcpA Klone. Drei zeigen eine induzierte Bande mit der erwarteten Größe von 28 kDa (Spuren a-c), Spur g zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von IPTG

Proteinseq.	-----HHHHGSRQGAAAFVTVNSIDVCPKKVAQEIIINPGPKVVTTPTYTC	50
CcpA	MHYSQFVTVASALALAPTAVVARRQGAAAFVTVNSIDVCPKKVAQEIIINPGPKVVTTPTYTC	60
	: : :*****	
Proteinseq.	DQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPYCKALKVFDNEGCLGFPTLWIIPLESPLDKCIP	110
CcpA	DQVKLGHGLDVSYYNFDIEPLTKDTFPYCKALKVFDNEGCLGFPTLWIIPLESPLDKCIP	120

Proteinseq.	EHYFSDEVKSISFQLDCREDAPVKKEPYGPKKEGAEQSAPQAEHSTKQDAQQGS HQGQEVQ	170
CcpA	EHYFSDEVKSISFQLDCREDAPVKKEPYGPKKEGAEQSAPQAEHSTKQDAQQGS HQGQEVQ	180

Proteinseq.	NSPKQEARQGSRPAAEAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLGFR	225
CcpA	NSPKQEARQGSRPAAEAPKQEQEAEQASEAAPEKKASNPADSLGLGELTKVLGFR	235

Abbildung 216: Gegenüberstellung der CcpA-Proteinsequenz aus der Datenbank (CcpA) und der aus der Sequenzierung abgeleiteten Sequenz (Proteinseq.) Die Signalsequenz wurde rot markiert, das rekombinante Protein wurde gelb unterlegt, das His-tag grün markiert

V. DISKUSSION

1. Auswahl *A. fumigatus*-spezifischer Antigene

Die vorliegende Doktorarbeit entstand als Teil eines Projekts an dem zwei Arbeitsgruppen und eine Biotech-Firma beteiligt waren. Es sollte untersucht werden, ob sich mit Hilfe rekombinanter *A. fumigatus* Proteine die Aspergillus-spezifische T-Zell-Antwort im Menschen abbilden lässt und ob dies die Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren ermöglicht.

Um herauszufinden welche Antigene sich für den Nachweis einer T-Zell-Antwort eignen könnten, musste zum einen berücksichtigt werden, dass *A. fumigatus* sowohl T_H1, als auch T_H2-Antworten hervorrufen kann, zum anderen musste die Vielfältigkeit der *A. fumigatus*-Antigene berücksichtigt werden. Unterschieden werden kann beispielsweise zwischen Hyphen- und Konidienproteinen. Beide Morphotypen treten bei Erkrankungen auf, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Konidien spielen vor allem am Anfang einer Infektion eine Rolle. Der erste Kontakt mit *A. fumigatus* besteht bei der Einatmung von Konidien in die Lunge. Konidien werden im weiteren Krankheitsverlauf in der Regel nicht gebildet, das heißt T-Zell-Antworten gegen solche Proteine können nur zu Beginn einer Infektion oder bei hoher Sporenbelastung in der Luft entstehen. Hyphen und Myzel sind vor allem bei weiter fortgeschrittenen Erkrankungen von Bedeutung. Eine weitere Unterscheidung kann anhand der Lokalisation der Proteine erfolgen. Sekretierte Proteine könnten für eine Immunantwort besonders zugänglich sein und daher früher im Infektionsgeschehen eine Rolle spielen. Zellwand- und cytosolische Proteine müssen erst für das Immunsystem zugänglich gemacht werden und treten daher erst später im Infektionsgeschehen auf.

Somit stellte die Auswahl geeigneter Antigene eine erste große Herausforderung bei dieser Arbeit dar, für deren Herstellung musste dann im weiteren Verlauf eine Methode etabliert werden.

1.1 Bekannte T-Zell-Antigene

Seit der Veröffentlichung des Genoms von *A. fumigatus* ist bekannt, dass es für 9936 putative Genprodukte kodiert (NIERMAN et al., 2005). Viele dieser annotierten Proteine sind bisher nicht funktionell charakterisiert worden.

Die erste Studie, die sich mit dem Einfluss eines *A. fumigatus*-Antigen auf die T-Zell-Antwort beschäftigte, stammt aus dem Jahre 2000 (CENCI et al., 2000). Später folgten weitere Veröffentlichungen, in der Regel wurde dabei die T-Zell-Antwort von maximal drei oder vier Antigenen untersucht (KURUP et al., 2001; KURUP et al., 2006; DIAZ-AREVALO et al., 2013; JOLINK et al., 2013). Eine weitere Studie stellte fest, dass verschiedene fungale Bestandteile unterschiedliche und vor allem unterschiedlich starke T-Zell-Antworten hervorrufen. Prinzipiell können cytosolische, Zellwand- und sekretierte Proteine unterschieden werden. So sollen vor allem sekretierte und Zellwandproteine eine starke T-Zell-Antwort hervorrufen, Polysaccharide dagegen eher eine geringe (BOZZA et al., 2009). Eine andere Arbeitsgruppe konnte dies später bestätigen (POTENZA et al., 2013). Von den Hauptallergenen ging man allgemein davon aus, dass sie vor allem eine T_H2 -Antwort hervorrufen sollen. 2010 sollten erstmals alle 17 Hauptallergene untersucht werden, der Arbeitsgruppe gelang jedoch nur die Herstellung von sieben rekombinanten Proteinen (CHAUDHARY et al., 2010). Daher war auch bei unserem Vorhaben damit zu rechnen, dass die Herstellung aller geplanten Zielproteine nicht gelingen würde.

Da bisher nur wenige Antigene auf ihre T-Zell-Antwort untersucht wurden, war daher Ziel dieses Projekts 20 *A. fumigatus*-Antigene herzustellen, um sie auf ihre T-Zell-Antwort untersuchen zu können.

Sekretierte Proteine sollen bevorzugt eine T_H2 -Antwort induzieren, die durch IL-4 vermittelt wird (BOZZA et al., 2009). Ihre Sekretion variiert stark in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen und sie werden vor allem mit allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (BOZZA et al., 2009). Außerdem sollen sie eine besonders starke Produktion von T-Zellen hervorrufen (BOZZA et al., 2009; POTENZA et al., 2013).

Im Folgenden werden zunächst die Proteine vorgestellt, von denen schon bekannt war, dass sie eine T-Zell-Antwort auslösen. Danach folgen weitere Proteine, die zusätzlich untersucht werden sollten.

Ein erstes Zielprotein und in diesem Fall auch ein bekanntes Allergen ist Asp1, das auch als Mitogillin bezeichnet wird. Es ist ein sekretiertes Ribotoxin und damit ein spezifischer und sehr potenter Inhibitor der eukaryotischen Translation (MENZ et al., 2003). Es besitzt zytotoxische Eigenschaften, wird während einer Infektion exprimiert und wurde mit einer T_H2-Antwort assoziiert (KURUP et al., 2001).

Auch Asp5, eine sekretierte Protease, soll eine nicht-protective T_H2-Antwort vermitteln (BOZZA et al., 2009). Seine Expression ist abhängig von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors PrtT (SHARON et al., 2009). Eine Deletion des PrtT-Gens zeigte jedoch, dass dies zwar einen negativen Einfluss auf die Expression der Proteasen von *A. fumigatus* hat, dazu gehören Asp13, Asp5/Mep1 und Asp10/Pep1, es aber bei leukopenischen Mäusen im Mausmodell zu keiner Abschwächung der Virulenz kommt. Daraus lässt sich folgern, dass das Asp5/Mep1 und die anderen sekretierten Proteasen keine Auswirkung auf die Virulenz bei der pulmonaren Aspergillose besitzen (BERGMANN et al., 2009; REICHARD et al., 1997). Anders als Asp5, löst Asp10 jedoch eine T_H1-Antwort aus, durch die ein protektiver Schutz gegen Infektionen mit *A. fumigatus*, über die vermehrte Ausschüttung von IFN- γ und IL-10, vermittelt wird (BOZZA et al., 2009; POTENZA et al., 2013). Die T-Zell-Antwort von Asp13 ist bisher noch nicht bekannt. Da es bei Proteomanalysen von Patienten, die an cystischer Fibrose leiden, identifiziert werden konnte, wurde es als ein mögliches therapeutisches Angriffsziel diskutiert (LU-PING et al., 2000; RAMIREZ-GARCIA et al., 2018).

Ein weiteres bekanntes T-Zell-Antigen aus der Gruppe der sekretierten Proteine ist Asp4, welches mit einer allergischen T_H2-Antwort assoziiert wird (KURUP et al., 2001). Daneben kann es für diagnostische Zwecke zur Unterscheidung von *A. fumigatus*-sensibilisierten Patienten mit und ohne ABPA dienen (HEMMANN et al., 1999), denn IgE-Antikörper gegen Asp4 lassen sich nur bei ABPA-Patienten nachweisen und ermöglichen so eine Differenzialdiagnose von ABPA mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von über 90 % (MENZ et al., 2003).

Bereits zwei Studien handeln die Chitosanase B als vielversprechendes Protein im Hinblick auf die Verbesserung diagnostischer Testverfahren. Daher wurde auch sie mit in diese Arbeit aufgenommen (SCHWIENBACHER et al., 2005;

RAMIREZ-GARCIA et al., 2018).

Ein noch nicht auf seine T-Zell-Antwort untersuchtes Protein ist das Hämolysin. Dieses Toxin ist in der Lage an Erythrozyten unterschiedlicher Tierarten zu binden und eine Hämolyse hervorzurufen (YOKOTA et al., 1977). Dabei besteht die Basis ihres hämolytischen Effekts auf einer direkten Interaktion zwischen dem Toxin und der Plasmamembran sensitiver Erythrozyten, bei der diese geschädigt wird (BERNHEIMER, 1974). Der genaue Mechanismus, wie das Hämolysin die Membran schädigt, ist bisher jedoch nicht vollständig geklärt (YOKOTA et al., 1977).

Eine zweite große Gruppe sind die **Zellwandproteine**. Die Zellwand von *A. fumigatus* besteht aus verschiedenen Polysacchariden, wie β -1,3-D-Glucan, β -1,6-D-Glucan und Galaktomannan, sie bewirken eine Cytokinantwort im infizierten Wirt, rufen aber eher eine geringe Aktivität von T-Zellen hervor (BOZZA et al., 2009; POTENZA et al., 2013).

Zu den Zellwandproteinen, die eine starke T-Zell-Antwort hervorrufen, gehören AspF9/Crf1 und Gel1 (*glucan elongation glucanosyl transferase*), sie sind beide über einen GPI-Anker an der Zellwand befestigt. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass AspF9/Crf1 eine gesteigerte Aktivität von T_H1-Zellen auslöst und somit einen, über IFN- γ induzierten, protektiven Schutz gegen Infektionen mit *A. fumigatus* vermittelt (BOZZA et al., 2009; CHAUDHARY et al., 2010; POTENZA et al., 2013; JOLINK, 2017). Daher könnte sich dieses Antigen für die Entwicklung eines Impfstoffes eignen. Spezifische IgE-Antikörper aus dem Serum von ABPA Patienten binden an AspF9/Crf1, wohingegen es zu keiner spezifischen Bindung von Antikörpern aus Asthma Patienten kommt, welche laut Hautprick Test allergisch auf *A. fumigatus* reagieren (BANERJEE et al., 2001). Von Gel1 ist bekannt, dass es eine protektive T_H1-Antwort auslöst, die durch eine Ausschüttung von IFN- γ vermittelt wird. Daneben konnte gezeigt werden, dass es eine sehr hohe T-Zell-Antwort hervorruft (BOZZA et al., 2009).

Ein weiteres Zellwandprotein, das laut einer Studie eine starke T-Zell-Antwort auslöst, ist AspF2. Sein Einsatz als möglicher Impfstoff wurde bereits 2000 in einer Studie beurteilt (CENCI et al., 2000). Aus dieser geht hervor, dass AspF2 eine hohe Ausschüttung von IL-4 auslöst und somit eine T_H2-Antwort vermittelt, die keinen protektiven Schutz gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* bildet. Für

einen Einsatz als Impfstoff ist es daher ungeeignet (CENCI et al., 2000). Es kann Einfluss auf die Zink-Homöostase nehmen und ermöglicht so eventuell dem Pilz der Opsonierung und der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten zu entgehen und somit von der Immunabwehr verschont zu bleiben. (DASARI et al., 2018).

Ebenfalls eine starke T_H2 -Aktivität soll laut einer Studie aus dem Jahre 2009 die Katalase Cat1 auslösen. Dabei soll sie eine hohe Produktion von IL-4 und gleichzeitig eine geringe von IFN- γ , IL-10 und IL-17 hervorrufen (BOZZA et al., 2009). Eine spätere Arbeitsgruppe konnte dies jedoch nicht bestätigen (JOLINK et al., 2013). Um eine endgültige Aussage bezüglich der T-Zell-Antwort treffen zu können, müssten daher weitere Untersuchungen stattfinden. Es handelt sich also um ein interessantes Antigen.

Ein Zellwandprotein, das ebenfalls eine über IL-4 vermittelte T_H2 -Antwort auslöst und daher eher mit einem allergischen oder invasiven Verlauf in Verbindung gebracht wird, ist Asp17/MP1. Jedoch soll es, anders als Cat1, keine starke T-Zell-Antwort hervorrufen (CHAUDHARY et al., 2010).

Ein bisher auf seine T-Zell-Antwort noch nicht untersuchtes Protein ist Ecm33. Es ist ein über einen GPI-Anker an der Zellwand lokalisiertes Protein. Es scheint vor allem für den Zellwandaufbau eine Rolle zu spielen. Versuche mit Deletionsmutanten zeigten, dass diese eine erhöhte Auskeimungsrate der Konidien, sowie eine erhöhte Resistenz der Konidien gegenüber der Abtötung durch Phagozyten besaßen. Im Gegensatz dazu stieg die Anfälligkeit des Myzels gegenüber neutrophilen Angriffen an. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Konidien dieser Mutanten einen größeren Durchmesser hatten und mehr Chitin in ihrer Zellwand war (CHABANE et al., 2006).

Ein weiteres, hinsichtlich seiner T-Zell-Antwort unbekanntes Protein ist *cspA* (*cell surface protein A*). Es ist über einen GPI-Anker an der Zellwand lokalisiert und es konnte nachgewiesen werden, dass es vor allem für die Stabilität der Pilzzellwand von Bedeutung ist. Eine Deletion von *cspA* führte zu einer Schwächung der Zellwand, wohingegen es bei einer Überexpression zu einer steigenden Resistenz und einer herabgesetzten Auskeimung der Konidien kommt. Eine Doppeldeletion von *cspA* zusammen mit Ecm33 oder Gel2-Gen führte zu

einer deutlichen Reduzierung der Adhäsion der Konidien, einer steigenden Desorganisation der Konidienzellwand und einer negativ beeinträchtigten Schichtung von Chitin und β -Glucan. Des Weiteren konnte bei dieser Doppeldeletion beobachtet werden, dass die Konidien anfälliger für die Phagozytose und Abtötung durch Makrophagen, sowie der Schädigung durch Hyphen durch Neutrophile waren (LEVDANSKY et al., 2010).

Die Gruppe der **cytosolischen Proteine** umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, von denen teilweise bereits bekannt war, ob und welche T-Zell-Antwort sie hervorrufen.

Einer Arbeitsgruppe gelang es, mithilfe einer Impfung von Aspf3 einen protektiven Schutz bei immunsupprimierten Mäusen vor einer Infektion mit *A. fumigatus* herzustellen. Dafür nutzten sie eine verkürzte allergisch-inaktive Version von rekombinantem Aspf3, welches die Aktivierung von T_H1-Zellen förderte und somit den Schutz aufbaute (DIAZ-AREVALO et al., 2011). In allergischen Patienten wird Aspf3 auch von IgE-Antikörpern gebunden. Es ist sowohl bei ABPA als auch bei 84% der Asthmapatienten mit *A. fumigatus*-Sensibilisierung zu finden, was eine Unterscheidung dieser zwei Krankheitsbilder aufgrund alleiniger Bestimmung von Aspf3 nicht möglich macht (MENZ et al., 2003). Aspf3 ist ein peroxisomales Protein (CARBERRY et al., 2012). Ein wichtiger Bestandteil der antifungalen Immunantwort ist die Produktion von ROS durch Immunzellen, welche bei immunsupprimierten Patienten herabgesetzt ist. Das Peroxiredoxin Aspf3 inaktiviert die von den Immunzellen produzierten ROS und kann somit eine Rolle bei der Virulenz von *A. fumigatus* spielen (HILLMANN et al., 2016).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Aspf11 und Aspf22 eine IFN- γ Bildung induzieren und damit wahrscheinlich eine protektive T_H1-Antwort auslösen (CHAUDHARY et al., 2010).

Zu den cytosolischen Proteinen, die im Gegensatz zu den oben genannten eine schwache Ausschüttung von IL-4, hervorrufen, gehören Aspf6 und Aspf12. Sie scheinen daher eine nicht-protektive T_H2-Antwort zu vermitteln (KURUP et al., 2001; CHAUDHARY et al., 2010). Aspf12 gehört in die Gruppe der *heat shock proteins 90* (Hsp90). Dies sind Chaperone und kommen in allen Eukaryonten vor. Sie sind in der Lage andere Proteine unter Stressbedingungen bei der Faltung oder

der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur zu helfen, sie schützen sie daher vor Denaturierung und werden unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert (WHITESELL & LINDQUIST, 2005; ALBRECHT et al., 2010). Für *A. fumigatus* scheint das Hsp90 essentiell zu sein und auch eine Rolle bei der Konidienbildung zu spielen (LAMOTH et al., 2012). Asp6 spielt, wie bereits Asp4, vor allem bei der Differenzialdiagnose der ABPA eine Rolle, denn nur ABPA-Patienten bilden spezifische IgE-Antikörper gegen Asp6 (HEMMANN et al., 1999). Das Asp6 ist eine Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD). Typisch für die Mn-abhängige SOD ist, dass sie in den Mitochondrien vorkommt (CRAMERI & BLASER, 1995). Da SOD ROS entgiften können, wird vermutet, dass sie eine wichtige Rolle für die Virulenz von *A. fumigatus* spielen (IMLAY, 2008).

Ein weiteres Protein, welches noch nicht weiter auf seine Funktion als T-Zell-Antigen untersucht wurde, ist das Allergen Asp8. Es ist ein ribosomales Protein und deswegen auch unter dem Namen rpp2 bekannt (putative ribosomale protein P2). Auch CipC wurde noch nicht näher auf seine T-Zell-Antwort untersucht. Der Name CipC steht für Concanamycin A induziertes Protein C und ist ursprünglich auf Arbeiten in *A. nidulans* zurückzuführen. Dort ist es, anders als in *A. fumigatus*, durch Concanamycin A oder Stress induziert (MELIN et al., 2002). Für *A. fumigatus* wurde es als Protein beschrieben, das Hyphen-spezifisch gebildet wird und in den Hyphenextrakten eines der quantitativ dominierenden Proteine ist (BAUER et al., 2010).

Im weiteren Verlauf des Projekts wurden noch zwei weitere Konidienproteine, Pst2 und CcpA, mit aufgenommen, für keines der beiden war bisher die T-Zell-Antwort untersucht worden. Von Pst2 weiß man, dass es Oxidoreduktasen-Aktivität besitzt und es wird, da es die Oxidation von NAD(P)H katalysiert, in die Gruppe der Dehydrogenasen eingeteilt (BRANDT, 2014).

1.2 Weitere Auswahlkriterien

Ein weiterer Faktor, der bei der Auswahl geeigneter Antigene berücksichtigt werden musste, war die Tatsache, dass die Klonierungen in *E. coli*-Bakterien stattfanden. Dies brachte zum einen die Schwierigkeit mit sich, dass die für die Klonierung vorgesehenen Konstrukte eine Größe von circa 40 kDa nicht überschreiten sollten, da sich dies negativ auf eine Expression auswirken könnte, zum anderen durften die klonierten Sequenzen keine Intronstrukturen enthalten. In der chromosomalen DNA vieler *A. fumigatus*-Gene finden sich aber Exon-Intron-Strukturen. Die codierenden Regionen werden Exons genannt, die nicht codierenden Regionen Introns. Die Sequenz eines Gens kann durch Introns in mehrere Exonregionen aufgeteilt sein. Da Bakterien jedoch keinen Spleißapparat besitzen, können sie die Intron-Information nicht verarbeiten. Es musste daher eine Lösung gefunden werden, die auch die Expression von Genen ermöglichte, die Introns enthielten. Bei einigen Zielgenen wurden lediglich Teilsequenzen ohne Introns amplifiziert. Da sich dieses Vorgehen jedoch für eine Vielzahl der Proteine nur bedingt eignete, wurden im weiteren Verlauf des Projekts Introns zunächst mit Hilfe von Fusions-PCRs aus den Zielgenen entfernt. Diese Methode stellte sich jedoch als aufwendig heraus und es wurde nach einer Alternative gesucht. So wurde schließlich die Herstellung von cDNA eingeführt. Die ersten Klonierungsversuche verliefen sehr vielversprechend und so wurde für die Amplifikation von *A. fumigatus*-Genen, die Introns enthalten, später durchgehend cDNA eingesetzt.

Des Weiteren musste berücksichtigt werden, dass einige Proteine Signalsequenzen beinhalten. Vor allem Proteine, die für den Export aus dem Cytoplasma bestimmt sind, tragen an ihrem N-Terminus eine solche Signalsequenz. Diese wird während oder kurz nach dem Transport des Proteins über die Cytoplasmamembran durch eine Signalpeptidase abgespalten. Da sie im reifen Protein fehlen, sollten Signalsequenzen nicht im rekombinanten Protein enthalten sein und wurden durch entsprechende Wahl der Oligonukleotide nicht mit amplifiziert.

1.3 Ausgewählte Antigene

Bei der Auswahl der Antigene, die für die Herstellung vorgesehen waren, galt es demnach mehrere Faktoren zu berücksichtigen:

- Die Antigene sollten eine T-Zell-Antwort hervorrufen können
- Die drei Hauptgruppen sollten mit mindestens jeweils drei Proteinen vertreten sein

Aufgrund dessen wurden die folgenden 27 Proteine ausgewählt:

Antigen	Genbank-ID	Lokalisation	T-Zell-Antwort	Referenz
Aspf1/Mitogillin	Afu5g02330	sekretiert	T _H 2/T _H 17	KURUP et al., 2001
Aspf4	Afu2g03830	sekretiert	T _H 2/T _H 17	KURUP et al., 2001
Aspf5/Mep1	Afu8g07080	sekretiert	T _H 2/T _H 17	BOZZA et al., 2009
Aspf7	Afu4g06670	sekretiert	unbekannt	CHAUDHARY et al., 2010
Aspf10/Pep1	Afu5g13300	sekretiert	T _H 1	BOZZA et al., 2009
Aspf13/Alp1	Afu2g12630	sekretiert	unbekannt	LU-PING et al., 2000 / RAMIREZ-GARCIA et al., 2018
Aspergillopepsin	Afu7g01200	sekretiert	unbekannt	RAMIREZ-GARCIA et al., 2018
CsnB	Afu4g01290	sekretiert	unbekannt	SCHWIENBACHER et al., 2005 / RAMIREZ-GARCIA et al., 2018
Hly	Afu3g00590	sekretiert	unbekannt	YOKOTA et al., 1977
FG-GAP	Afu1g04130	sekretiert	unbekannt	
Aspf2	Afu4g09580	Zellwand	T _H 2/T _H 17	CENCI et al., 2000
Aspf9/Crf1	Afu1g16190	Zellwand	T _H 1	BOZZA et al., 2009 / JOLINK et al., 2013 / CHAUDHARY et al., 2010 / POTENZA et al., 2013
Aspf17/mp1	Afu4g03240	Zellwand	T _H 2/T _H 17	CHAUDHARY et al., 2010
CspA	Afu3g08990	Zellwand	unbekannt	LEVDANSKY et al., 2010
Ecm33	Afu4g06820	Zellwand	unbekannt	CHABANE et al., 2006
Gel1	Afu2g01170	Zellwand	T _H 1	BOZZA et al., 2009
Cat1(N-term.)	Afu3g02270	Zellwand	T _H 1/T _H 2/T _H 17	BOZZA et al., 2009 / JOLINK et al., 2013
Aspf3/Pmp	Afu6g02280	cytosolisch	T _H 1	DIAZ-AREVALO et al., 2013
Aspf6/MnSOD	Afu1g14550	cytosolisch	T _H 2/T _H 17	CHAUDHARY et al., 2010 / KURUP et al., 2001

Aspf8	Afu2g10100	cytosolisch	unbekannt	SANTOS-BALLESTA et al., 2002
Aspf11	Afu2g03720	cytosolisch	T _H 1	CHAUDHARY et al., 2010
Aspf12/Hsp90	Afu5g04170	cytosolisch	T _H 2/T _H 17	CHAUDHARY et al., 2010
Aspf22/EnoA	Afu6g06770	cytosolisch	T _H 1	CHAUDHARY et al., 2010
Smt1	Afu3g09320	cytosolisch	unbekannt	
CipC	Afu5g09330	cytosolisch	unbekannt	MELIN et al., 2002 / BAUER et al., 2010
Pst2	Afu1g02820	Konidienprotein	unbekannt	BRANDT et al., 2014
CcpA	Afu1g13670	Konidienprotein	unbekannt	VOLTERSEN et al., 2018

Tabelle 67: Übersicht aller geplanten Antigene

2. Herstellung rekombinanter Proteine

Die Herstellung rekombinanter Proteine erfolgte dabei wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Im Laufe des Projekts fanden dabei folgende Anpassungen statt.

2.1 Anpassungen

2.1.1 Medien für die Gewinnung von cDNA

Üblicherweise wurde für die Amplifikation von Genen, welche Introns in ihren Genomsequenzen enthielten, cDNA verwendet. Für die Herstellung dieser cDNA wurde Myzel einer über-Nacht-Kultur des AfS35-Stammes verwendet, das in AMM-Medium angewachsen war.

Bei einigen sekretierten Proteasen, wie Aspf5 oder Aspf10, konnte mittels der cDNA jedoch kein Amplifikat hergestellt werden. Aufgrund der in beiden Proteinen vorkommenden Introns musste das Expressionskonstrukt jedoch von cDNA amplifiziert werden. Bei beiden Konstrukten lag der Misserfolg bei der Amplifikation nicht an den Oligonukleotiden, da beide Gene von genomischer DNA amplifiziert werden konnten. Aspf5 ist eine sekretierte Metalloprotease, Aspf10 eine sekretierte, saure Protease. Die Expression von Proteasen ist stark davon abhängig, welche Stickstoffquelle zur Verfügung steht und so wurden die Wachstumbedingungen für die Gewinnung der cDNA verändert. Sekretierte Proteasen werden vor allem dann gebildet, wenn der Pilz auf externe Proteine als

Kohlenstoff- und Stickstoffquelle angewiesen ist. In einer Veröffentlichung wurde ein *Skim Milk Medium* erfolgreich benutzt, dieses soll die Bildung von Proteasen stimulieren (SHARON et al., 2009). Im Falle von Aspf10 konnte das Gen somit erfolgreich amplifiziert werden, bei Aspf5 gelang dies jedoch nicht. Daraus lässt sich folgern, dass es auch bei den sekretierten Proteasen Unterschiede bei den optimalen Expressionsbedingungen gibt und dies bei der Herstellung zu berücksichtigen ist. Möglicherweise lassen sich die Anzuchtbedingungen für Aspf5 noch weiter optimieren, dies müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Interessant wäre beispielsweise herauszufinden, inwieweit sich eine Veränderung der Konzentrationen der Stickstoffquelle auf das Wachstumsverhalten des Pilzes oder die Sekretion von Proteasen auswirkt.

2.1.2 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation in *E. coli* wurde üblicherweise der M15-Stamm verwendet. Bei auftretenden Expressionsproblemen konnte eine Umklonierung in den Rosetta-Stamm, bei einigen zuvor nicht exprimierenden Proteinen eine Expression hervorrufen. Es handelt sich beim Rosetta-Stamm um ein Derivat des BL21-Bakterienstammes, der über weitere tRNAs verfügt, die *E. coli* normalerweise nicht bildet. *Codon usage*-Analysen wurden für alle Expressionskonstrukte durchgeführt, um so Hinweise zu bekommen, ob Expressionsprobleme an Codons lagen, die von *E. coli* nicht oder kaum verwendet werden (TEGEL et al., 2010). Vom Stamm BL21 ist bekannt, dass er vergleichsweise große Mengen an Proteinprodukt liefern kann (NOLL et al., 2013). Ein Wechsel des Bakterienstamms zum Rosetta-Stamm konnte beispielsweise bei Aspf11, das zuvor nicht exprimiert werden konnte, eine Expression hervorrufen. Bei anderen, wie Aspf7, blieb dieser Ansatz jedoch erfolglos. Somit stellte ein Umklonieren zumindest in einigen Fällen eine Lösung für vorhandene Expressionsprobleme dar. Falls auch wiederholte Klonierungs- und Transformationsversuche in den Rosetta-Stamm negativ ausfielen, wurden weitere Bemühungen aus Zeitgründen eingestellt.

2.1.3 Bewertung unterschiedlicher Aufschlussmethoden

Der Aufschluss der *E. coli* Zellen gestaltete sich anfangs als schwierig. Unterschiedliche Methoden wie Ultraschall, die Verwendung des Fastprep96 (MP Biomedicals) oder ein spezielles Puffersystem (B-PER®) lieferten nicht die gewünschten Ergebnisse. Am zuverlässigsten zeigte sich schließlich ein mehrmaliges Einfrieren bei -20°C und darauffolgendes Auftauen bei 50°C . Ob es noch effektivere Verfahren für den Aufschluss gibt, müsste in weiteren Versuchen abgeklärt werden. Für die verwendete Methode spricht jedoch der geringe materielle Aufwand, auch ist sie leicht durchzuführen. Jedoch ist das Einfrieren und Auftauen sehr zeitintensiv und musste über mehrere Tage stattfinden. Schnellere Ergebnisse könnten mit einer Veränderung der Temperaturbedingungen erzielt werden. Statt die Probe bei -20°C einzufrieren, könnte man auf flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -196°C zurückgreifen. Jedoch besteht hier die Gefahr, dass das Protein dabei erheblich geschädigt werden könnte (LESCH, 2003). Auch ein Auftauen bei höheren Temperaturen wurde wegen der Gefahr des Denaturierens des Proteins nicht unternommen.

2.1.4 Puffer

Zu Beginn der Reinigungen liefen diese äußerst erfolgreich und vielversprechend. Im Verlauf des Projektes trat jedoch das Problem auf, dass rekombinantes Protein nicht mehr an die Säulenmatrix gebunden hatte und sich somit in Durchlauf I befand. Dies konnte auch bei zuvor bereits erfolgreich gereinigten Proteinen beobachtet werden, somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Ursache in der zu reinigenden Probe lag. Da Proteine äußerst sensibel auf pH-Wert-Verschiebungen reagieren, wurde eine pH-Wert-Messung der eingesetzten Puffer vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass der pH-Wert stabil bei 7,4 und somit nicht Ursache der Fehlversuche war. Dennoch wurden daraufhin sämtliche Puffer neu hergestellt. Die Reinigung des ersten darauffolgenden Proteins verlief positiv, rekombinantes Protein hatte an die Säulenmatrix gebunden und konnte anschließend erfolgreich herausgelöst werden. Bei den folgenden Reinigungen trat das Problem jedoch erneut auf. Nachdem dieses Phänomen mehrmals auftrat, wurde dazu übergegangen die Puffer am Tag der Reinigung frisch herzustellen

und auf eine Lagerung im Kühlschrank zu verzichten. Nach dieser Umstellung traten keine Probleme mehr auf. Somit wird für zukünftige Arbeiten empfohlen, die Puffer unmittelbar vor der Proteinreinigung neu herzustellen.

2.1.5 Proteinreinigung

Zu Beginn des Projekts wurden Proteine versuchsweise mit Protino® Ni-NTA Agarose der Firma Macherey-Nagel gereinigt. Das Prinzip beruht auf einer Immobilisierten-Metallionen-Affinitätschromatographie (ADAMAMA-MORAITOU et al.). Dabei gehen die sich in einer Säulenmatrix befindenden zweiwertigen Nickel-Ionen eine Bindung mit den Polyhistidinen der rekombinanten Proteine ein. Die anschließende Elution erfolgte dabei über Imidazol. Erste Versuche waren jedoch nicht erfolgreich und so wurden die Proteine schließlich über die Talonsäule (TaKaRa) gereinigt.

Die Proteine wurden anfangs drei Mal auf die Säulenmatrix aufgetragen und anschließend eluiert. Bei der Analyse der einzelnen Fraktionen im SDS-PAGE zeigte sich jedoch, dass im aufgefangenen Proben-Durchlauf bei einigen Proteinen immer noch sehr viel rekombinantes Protein vorhanden war. Es hatte somit nicht an die Säulenmatrix gebunden. Auffällig war, dass dieses Phänomen oftmals bei Proben auftrat, in denen eine sehr hohe Ausgangskonzentration an rekombinantem Protein vorhanden war. Wahrscheinlich waren bei derart hohen Konzentrationen alle in der Säulenmatrix befindlichen Kobalt-Ionen bereits besetzt und die Kapazität der Matrix somit überschritten. Um die noch im Durchlauf enthaltenen rekombinanten Proteine dennoch zu gewinnen, wurde der Durchlauf am Folgetag erneut drei Mal auf die Säulenmatrix aufgetragen und nach dem üblichen Protokoll eluiert. Dafür wurde die bereits verwendete Talonsäule zuvor mit 5 ml 20% Ethanol gewaschen. In der Regel konnte mit diesem erneuten Durchgang das restliche rekombinante Protein aus der Probe gewonnen werden.

2.1.6 Dialyse

Die Herstellung der Antigene erfolgte mit einem Harnstoffgehalt von 4 M, zum einen konnte damit erreicht werden, dass denaturierende Bedingungen herrschten

und Proteine somit in Lösung gebracht wurden. Zum anderen sollte sich eine gewisse Konzentration an Harnstoff positiv auf die biologische Wirksamkeit von T-Zell-Antigenen auswirken (BARABAS, 2007).

Erste Versuche des Kooperationspartners zeigten jedoch, dass sich eine Harnstoffkonzentration von 4 M in der Probe auch nach der jeweiligen Verdünnung toxisch auf die T-Zellen auswirkte, daher wurde der Harnstoffgehalt weiterer Proben auf maximal 1 M reduziert.

Da sich eine Harnstoffkonzentration von 4 M bei der Herstellung der Antigene bewährt hatte, wurde nach der Proteinreinigung eine Dialyse auf 1 M Harnstoff durchgeführt. Dies geschah mithilfe der *Slide-A-Lyzer®10K Dialysis Cassettes*. Da die Möglichkeit bestand, dass der reduzierte Harnstoffgehalt zu Löslichkeitsproblemen führt, wurde die Probe am Ende abzentrifugiert und ein Aliquot des löslichen Überstands im SDS-Gel untersucht.

Da die Handhabung dieser Dialysekassetten recht umständlich war und es den Herstellungsprozess der Antigene noch weiter in die Länge zog, sollte für zukünftige Arbeiten in Betracht gezogen werden, die Proteine von Beginn an in 1 M Harnstoffpuffer herzustellen.

2.1.7 LPS

Der LPS-Gehalt des gereinigten Antigens sollte so gering wie möglich gehalten werden, da LPS zu falschpositiven Reaktionen der T-Zellen führen kann. Die LPS-Messungen erfolgten durch den Kooperationspartner in Regensburg.

Zu Beginn des Projektes waren die produzierten Antigene für den Einsatz und die Etablierung eines ELISpot-Assays vorgesehen, der LPS-Gehalt sollte hierfür bei <100 EU/ml liegen.

Im Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass die Antigene in einem Vollblut-ELISA eingesetzt werden sollten, dafür musste der Grenzwert für den LPS-Gehalt auf 1 EU/ml herabgesetzt werden.

Um die LPS-Werte so gering wie möglich zu halten, musste sichergestellt werden, dass sämtliche für die Produktion der gereinigten rekombinanten Proteine benutzten Gefäße und Messinstrumente zuvor bei 180° C sterilisiert wurden.

Auch bei den verwendeten Chemikalien musste darauf geachtet werden, dass sie nicht verunreinigt waren. Die gesamte Pufferherstellung musste so steril wie möglich gehalten werden, jegliche Kontamination mit LPS galt es zu vermeiden. Als Wasser wurde steriles, pyrogenfreies Wasser für Injektionszwecke verwendet.

Die ersten Messungen waren recht erfolgsversprechend, lediglich FGgap, CsnB und Hly zeigten erhöhte Werte von 798 EU/ml, beziehungsweise 180,79 EU/ml und 182 EU/ml. Auffällig war, dass FGgap auch in späteren Reinigungsversuchen deutlich erhöhte LPS-Werte aufwies (>100 EU/ml). Möglicherweise sind einige Antigene anfälliger für eine Kontamination mit LPS als andere, dieser Theorie müsste in weiteren Versuchen noch nachgegangen werden. Bei Aspf4 konnten bei mehreren Reinigungen jeweils sehr niedrige LPS-Werte erzielt werden (<1 EU/ml), dies würde für die genannte Theorie sprechen. Dagegen zeigten LPS-Messungen von Hly sehr unterschiedliche Ergebnisse: In einem ersten Reinigungsversuch belief sich der LPS-Gehalt auf 182 EU/ml, in einem zweiten konnte ein Wert von nur 1,55 EU/ml erzielt werden. Auch bei Aspf9 gab es oft sehr weit auseinanderreichende Werte von 1,2 EU/ml bis zu 75 EU/ml. Aspf6 zeigte sich ähnlich, so wurde bei einem Reinigungsversuch ein LPS-Wert von <1 EU/ml gemessen, ein zweiter Versuch lieferte hingegen ein Ergebnis von >100 EU/ml. Eine Vorhersage bezüglich des LPS-Gehalts einzelner Proteine, war daher nicht möglich.

Um eine LPS-Kontamination durch die verwendeten Puffer auszuschließen, wurden auch hier LPS-Messungen vorgenommen. Die Werte dieser Messungen lagen bei allen Proben bei <1 EU/ml, somit konnten die Puffer als Quelle von Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

2.1.7.1 Endotoxin-Reinigungs-Säulen

Um den Gehalt an LPS zu senken, wurden zwei Proteine, Aspf6/MnSOD und Aspf9/Crf1, versuchsweise mit *PierceTM High Capacity Endotoxin Removal Wash Columns* der Firma ThermoFisher nachgereinigt.

Die Ergebnisse dieser Reinigungen waren jedoch nicht erfolgreich. So kam es bei Aspf6/MnSOD zu einem vollständigen Verlust des Proteins. Die LPS-Messung

von AspF9/CrF1 lag auch nach der Reinigung über die Endotoxin-Säulen bei >100 EU/ml.

Eine LPS-Abreicherung über die Endotoxin-Säulen wird daher nicht empfohlen.

2.1.7.2 ClearColi™-K12-Stamm

Bei dem ClearColi™-K12 (Firma Lucigen) handelt es sich um einen Bakterienstamm, der genetisch verändertes LPS enthält, welches keine Immunantwort in Säugerzellen auslösen soll, dadurch soll es zu einer Endotoxinreduktion um 99% kommen.

Am Ende dieser Arbeit wurde AspF9/CrF1 in diesen Stamm kloniert, dabei entstand ein Klon mit einem ähnlichen Expressionslevel wie es zuvor mit dem Stamm M15 erreicht worden war. Die anschließende Reinigung wurde nach dem üblichen Schema vollzogen.

Die LPS-Messung lieferte einen Wert von <1 EU/ml. Das Ergebnis dieses ersten Versuches lässt somit vermuten, dass der Einsatz des ClearColi-Stammes zu empfehlen ist. Weitere Versuche, die diese Vermutung bestätigen, konnten aufgrund der mangelnden Zeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden und sollten daher in weiteren Arbeiten unternommen werden. Dieser erste Ansatz erscheint dennoch sehr vielversprechend.

3. Auswertung der bearbeiteten Antigene

Von den ursprünglich geplanten 27 *A. fumigatus*-Antigenen konnten 19 erfolgreich hergestellt werden. Proteine galten als erfolgreich hergestellt, wenn ein exprimierender Klon identifiziert werden konnte, auch wenn eine Reinigung aus Zeitgründen nicht mehr bei allen durchgeführt werden konnten. Eine Auflistung ist in Tab.68 zu sehen.

Antigen	Genbank-ID	Lokalisation	Herstellung
Aspf1/Mitogillin	Afu5g02330	sekretiert	erfolgreich
Aspf4	Afu2g03830	sekretiert	erfolgreich
Aspf13/Alp1	Afu2g12630	sekretiert	erfolgreich
CsnB	Afu4g01290	sekretiert	erfolgreich
Hly	Afu3g00590	sekretiert	erfolgreich
FG-GAP	Afu1g04130	sekretiert	erfolgreich
Aspf5/Mep1	Afu8g07080	sekretiert	negativ
Aspf7	Afu4g06670	sekretiert	negativ
Aspf10/Pep1	Afu5g13300	sekretiert	negativ
Aspergillopepsin	Afu7g01200	sekretiert	negativ
Aspf2	Afu4g09580	Zellwand	erfolgreich
Aspf9/Crf1	Afu1g16190	Zellwand	erfolgreich
Ecm33	Afu4g06820	Zellwand	erfolgreich
Gel1	Afu2g01170	Zellwand	erfolgreich
Cat1(N-term.)	Afu3g02270	Zellwand	erfolgreich
Aspf17/mp1	Afu4g03240	Zellwand	negativ
CspA	Afu3g08990	Zellwand	negativ
Aspf3/Pmp	Afu6g02280	cytosolisch	erfolgreich
Aspf6/MnSOD	Afu1g14550	cytosolisch	erfolgreich
Aspf8	Afu2g10100	cytosolisch	erfolgreich
Aspf11	Afu2g03720	cytosolisch	erfolgreich
Aspf22/EnoA	Afu6g06770	cytosolisch	erfolgreich
CipC	Afu5g09330	cytosolisch	erfolgreich
Aspf12/Hsp90	Afu5g04170	cytosolisch	negativ
Smt1	Afu3g09320	cytosolisch	negativ
Pst2	Afu1g02820	Konidienprotein	erfolgreich
CcpA	Afu1g13670	Konidienprotein	erfolgreich

Tabelle 68: Übersicht aller erfolgreich und nicht erfolgreich hergestellten Antigene

Die Arbeiten an den erfolgreich hergestellten Proteinen werden im weiteren Text kurz diskutiert werden. Alle Expressionskonstrukte wurden sequenziert, dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den aus dem Stamm AfS35 klonierten Sequenzen und den aus dem Stamm AfS293 stammenden Sequenzen der AspGD-Datenbank. Dies zeigt, dass Gene in *A. fumigatus* hochkonserviert sind.

4. Erfolgreich hergestellte Proteine

4.1 Sekretierte Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine aufgeführt

Antigen	Genbank-ID
Aspf1/Mitogillin	Afu5g02330
Aspf4	Afu2g03830
Aspf13/Alp1	Afu2g12630
CsnB	Afu4g01290
Hly	Afu3g00590
FG-GAP	Afu1g04130

Tabelle 69: Übersicht aller erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine

4.1.1 Aspf1/Mitogillin

Das Gen konnte erfolgreich mit chromosomaler DNA amplifiziert werden. Anders als einer früheren Arbeitsgruppe gelang es, Aspf1 als rekombinantes Protein mit einem guten Expressionslevel herzustellen. Dieser gelang keine Amplifikation des Gens (CHAUDHARY et al., 2010).

Nach dem Umpuffern auf 1 M Harnstoff war das Ergebnis der LPS-Messung 3,98 EU/ml. Dieser moderate Wert war ausreichend für den ELISpot Assay, aber noch zu hoch für den Vollblut-ELISA. Bei ersten Versuchen des Kooperationspartners zeigten sich beim ELISpot Assay keine signifikanten T-Zell-Reaktionen, weitere Untersuchungen folgen noch.

4.1.2 Aspf4

Das Gen wurde ohne den Teil, der für die Signalsequenz kodiert, erfolgreich mit chromosomaler DNA amplifiziert und es konnte ein Klon im M15-Stamm identifiziert werden, welcher eine gute Expression zeigte. Einer vorherigen Arbeitsgruppe gelang dies nicht, sie versuchten, Aspf4 in das pTrcHis2 Expressionssystem zu klonieren. Sie vermuteten, dass Aspf4 schädlich für *E. coli* sein könnte und es daher zu keiner Expression gekommen war (CHAUDHARY et al., 2010), dies kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit aber ausgeschlossen

werden.

Nach dem Umpuffern lag der LPS-Gehalt bei 0,45 EU/ml. Bei anschließend stattgefundenen Reinigungen konnten ebenfalls Werte von < 1 EU/ml erreicht werden. Die Probe konnte somit auch im Vollblut-ELISA eingesetzt werden. Laut der bisherigen Literatur ist Aspf4 mit einer T_H2-Antwort assoziiert (KURUP et al., 2001), erste Untersuchungen des Kooperationspartners mit dem ELISpot Assay zeigten jedoch, dass Aspf4 eine IFN- γ Ausschüttung hervorbrachte. Dabei wurden die IFN- γ Produktionen nach Stimulation von unterschiedlich stark *A. fumigatus*-exponierten Probanden untersucht. Die Gruppe der gering exponierten Probanden zeigten dabei eher geringe Ausschüttungen, die stark exponierten zeigten deutlich höhere Anzahlen an Spots. Im Vergleich mit dem käuflich erwerblichen *A. fumigatus*-Lysat war es mit Aspf4 besser möglich, zwischen den zwei Gruppen zu unterscheiden. Daher scheint Aspf4 ein vielversprechendes T-Zell-Antigen zu sein und wurde in einem weiteren Versuch im Vollblut-ELISA eingesetzt. Hier konnte bei gesunden Spendern eine hohe IFN- γ Produktion beobachtet werden. Somit gehört Aspf4, zusammen mit Aspf6 und Aspf9, zu den Antigenen, die in weiteren T-Zell-Versuchen eingesetzt werden.

4.1.3 Aspf13

Dieses Gen wurde ohne den für die Signalsequenz kodierenden Teil mit chromosomaler DNA amplifiziert und es konnten exprimierende Klone hergestellt werden. Das Expressionslevel war durchschnittlich. Einer früheren Abreitsgruppe gelang ebenfalls die Herstellung von Aspf13, sie klonierten es in das pTrcHis2 Expressionssystem (CHAUDHARY et al., 2010).

Die Probe wurde umgepuffert, die Daten der LPS-Messung liegen bisher noch nicht vor.

4.1.4 CsnB

Dieses Gen konnte ohne Intron und den Teil, der für die Signalsequenz kodiert, mit cDNA amplifiziert und anschließend kloniert werden. Das Expressionslevel war hoch.

Nach Dialyse wurde eine LPS-Konzentration von 180,79 EU/ml gemessen, da dieser Wert deutlich oberhalb des Grenzwerts von 1 EU/ml lag, wurde die Probe erneut gereinigt. Hierbei wurde ein Wert von 0,23 EU/ml erzielt. Die Probe konnte somit im Vollblut-ELISA eingesetzt werden. Erste Ergebnisse lassen jedoch noch keine Aussagen bezüglich der T-Zell-Antwort zu.

4.1.5 Hämolysin/AspHS

Das Gen besitzt ein Intron und konnte erfolgreich mit cDNA amplifiziert werden. Bei der Klonierung konnten Klone identifiziert werden, die ein gutes Expressionslevel hatten.

Nach Dialyse wurde die LPS-Konzentration bestimmt, sie war mit einem Wert von 182 EU/ml deutlich zu hoch. Bei einem weiteren Reinigungsversuch wurde ein LPS-Wert von 1,55 EU/ml gemessen, somit kann es im ELISpot Assay eingesetzt werden, die Ergebnisse liegen bisher noch nicht vor.

4.1.6 FG-GAP

Das Gen konnte erfolgreich ohne Signalsequenz mit chromosomaler DNA amplifiziert werden. Ein stark exprimierender Klon konnte identifiziert werden.

Die nach der Dialyse stattgefundene LPS-Messung ergab einen Wert von 798 EU/ml, daher wurde das FG-GAP nachgereinigt. Bei dieser Nachreinigung konnte der Wert auf 11,1 EU/ml gesenkt werden. Somit eignete es sich weder für den ELISpot Assay noch den Vollblut-ELISA. Bei weiteren Reinigungen wurden ebenfalls Werte von >100 EU/ml gemessen. Die reproduzierbar hohen LPS-Konzentrationen in diesen Proben legen nahe, dass das FG-GAP-Protein eine höhere Affinität für LPS besitzt als andere Proteine. Dennoch ist die Herstellung des Proteins an sich als erfolgreich einzustufen, eine Expression in ClearColi wäre hier sehr sinnvoll.

4.2 Zellwandproteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte Zellwandproteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf2	Afu4g09580
Aspf9/Crf1	Afu1g16190
Ecm33	Afu4g06820
Gel1	Afu2g01170
Cat1(N-term.)	Afu3g02270

Tabelle 70: Übersicht aller erfolgreich hergestellten Zellwandproteine

4.2.1 Aspf2

Aufgrund der vorhandenen Intronstrukturen wurde für die Amplifikation cDNA verwendet. Die Sequenzierung eines gut exprimierenden Klon bestätigte, dass das Gen erfolgreich ohne Intron und Signalsequenz in den Vektor kloniert werden konnte.

Eine Dialyse und eine LPS-Messung fanden bei diesem Protein nicht statt, aber prinzipiell war dieser Versuchsteil erfolgreich. Auch einer früheren Arbeitsgruppe gelang es, einen exprimierenden Klon herzustellen, sie nutzten dafür das pTrcHis2 Expressionssystem (CHAUDHARY et al., 2010).

4.2.2 Aspf9/Crf1

Das Gen von Aspf9 enthält Intronstrukturen und da zu Beginn des Projektes noch keine cDNA vorhanden war, wurde für die Amplifikation des Zielgens die Methode der Fusions-PCR genutzt.

Die entstandenen Klone wurden anschließend auf Expression getestet. Auffällig hierbei war, dass alle Klone eine induzierte Bande mit einem ähnlichen Expressionslevel bei einer Größe von 25 kDa hatten, die eigentliche Größe des Aspf9-Proteins jedoch bei 40 kDa liegen sollte.

In den Coomassie-Gelen der darauffolgenden Reinigung gab es meist zwei Banden. Die obere Bande stimmte mit der erwarteten Größe von etwa 50 kDa überein, die untere Bande war bei etwa 25 kDa zu beobachten. Daraus entstand

die Annahme, dass es sich bei der oberen Bande um das Gesamtprotein handelte und die untere Bande ein degradiertes Fragment darstellte.

Die Sequenzierung erfolgte erst verspätet und zeigte, dass die Fusion der beiden DNA-Fragmente erfolgreich war, es jedoch durch eine Deletion an Position 752 zu einer Verschiebung des Leserasters und dann kurz darauf zum Kettenabbruch gekommen war. Von den 367 Aminosäuren des reifen Proteins waren also nur 193 Aminosäuren in dem verkürzten rekombinanten Protein, sowie zusätzlich 12 proteinfremde Aminosäuren am C-Terminus. Alle der acht getesteten Klone zeigten diese Mutation. Somit kam es zu einer neuen Interpretation der beiden Banden, die im Coomassie-Gel der Reinigung zu sehen war. Die untere Bande war demnach das volle Länge Protein, während es sich bei der oberen Bande um ein Dimer handelte.

Die Mutation war jedoch nicht auf den von uns verwendeten Stamm AfS35 zurückzuführen, da es bei einem Folgeversuch mit cDNA gelang, das gesamte Gen zu amplifizieren und dieses keine Punktmutation hatte.

Beim verkürzten Aspf9 kam es bei voneinander unabhängigen Reinigungen zu sehr unterschiedlichen LPS-Werten von 1,2 EU/ml bis zu > 100 EU/ml.

In einem folgenden Versuch wurde eine Aspf9 Probe mit >100 EU/ml über eine Endotoxin-Säule nachgereinigt (*PierceTM High Capacity Endotoxin Removal Wash Columns*, ThermoScientific). Jedoch kam es hierbei zu keiner erfolgreichen LPS-Abreicherung, der Wert war mit > 100 EU/ml genauso hoch wie zuvor.

Eine weitere Möglichkeit den LPS-Gehalt zu reduzieren, sollte über eine Transformation in einen gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm (ClearColiTM-K12, Lucigen) in einem ersten Versuch getestet werden.

Für die Klonierung wurde das verkürzte Aspf9-Plasmid eingesetzt. Es konnte ein Klon mit einem ähnlichen Expressionslevel wie die Klone im M15-Stamm identifiziert werden. Die nach der Reinigung durchgeführte LPS-Bestimmung lieferte einen Wert von < 1 EU/ml und die Probe war somit für den ELISpot Assay und den Vollblut-ELISA geeignet.

Aspf9 wurde bereits in mehreren vorangegangenen Arbeiten als Antigen, das eine starke T-Zell-Antwort hervorrufen soll, identifiziert. Über eine gesteigerte

Aktivität von TH1-Zellen, soll es in der Lage sein, einen über IFN- γ induzierten, protektiven Schutz gegen Infektionen mit *A. fumigatus* zu vermitteln (BOZZA et al., 2009; CHAUDHARY et al., 2010; POTENZA et al., 2013; JOLINK et al., 2017). Obwohl von unserem Kooperationspartner nur das gekürzte Aspf9 Produkt eingesetzt wurde, konnte bei Aspf9 auch hier sowohl im ELISpot Assay als auch im Vollblut-ELISA vor allem eine starke IFN- γ Ausschüttung gemessen werden. In einer weiteren Studie des Würzburger Partners, die die Zytokinproduktion von unterschiedlich stark *A. fumigatus*-exponierten Probandengruppen vergleicht, war mit dem verkürzten Aspf9 eine Unterscheidung der beiden Gruppen anhand ihrer IFN- γ -Ausschüttung möglich. So zeigten niedrig exponierte Probanden, im Vergleich zu den hoch exponierten, deutlich geringere Ausschüttungen von IFN- γ . Die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen hinsichtlich der T-Zell-Reaktion stimmen daher mit der bisherigen Literatur überein. Diese Daten sollen demnächst publiziert werden. Ein Einsatz von Aspf9 in noch folgenden Untersuchungen ist geplant.

Am Ende dieser Arbeit wurde auch noch ein Expressionskonstrukt aus cDNA hergestellt. Hierfür wurden die bereits bei der Fusions-PCR eingesetzten äußeren Primer verwendet. Das Gen konnte erfolgreich amplifiziert werden. Die Sequenzierung eines exprimierenden Klon zeigte, dass der gewünschte Genabschnitt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte und keine Punktmutation nachweisbar war. Aus Zeitgründen fand keine Reinigung statt, aber es steht nun ein Expressionskonstrukt für weitere Versuche zur Verfügung, da Aspf9 sicher auch in Folgearbeiten eingesetzt wird.

4.2.3 Ecm33

Aufgrund der Intronstrukturen wurde das Gen über die Methode der Fusions-PCR amplifiziert und es konnten erfolgreich, wenn auch nur schwach, exprimierende Klone hergestellt werden.

Auf eine Reinigung wurde aus Zeitgründen verzichtet, dennoch steht nun ein Expressionkonstrukt zur Verfügung, welches in weiteren Versuchen eingesetzt werden kann.

4.2.4 Gel1

Das Gen wurde ebenfalls mit der Methode der Fusions-PCR amplifiziert. Es konnte ein relativ schwach exprimierender Klon identifiziert werden.

Bei der darauffolgenden Reinigung waren die Proteinkonzentrationen in allen Elutionen gleichmäßig verteilt, jedoch verhältnismäßig gering. Das meiste Protein war noch im Durchlauf aufzufinden. Beim erneuten Auftragen des Proteins zeigte sich ein ähnliches Bild wie im ersten Durchgang. Dieses Protein zeigte also eine auffallend geringere Bindung an die Talon-Matrix.

Es konnte eine Probe mit einem LPS-Wert mit < 1 EU/ml hergestellt werden, die in den weiteren Tests eingesetzt werden wird.

4.2.5 Cat1 (N-Terminus)

Da das Cat1-Gen sehr groß ist, sollte nur der Bereich, der die N-terminale Hälfte ohne Signalsequenz kodiert, amplifiziert werden, aufgrund der Introns wurde dafür cDNA verwendet. Es konnte ein gut exprimierender Klon identifiziert werden.

Nach der Dialyse erfolgte die LPS-Messung, welche einen Wert von < 1 EU/ml lieferte und damit unterhalb des Grenzwertes war. Das rekombinante Cat1-Protein stand somit für T-Zell-Analysen zur Verfügung. Erste Ergebnisse des Kooperationspartners im ELISpot Assay zeigen, dass es zu einer verhältnismäßig hohen Ausschüttung von IFN- γ kommt, es konnte jedoch noch keine Signifikanz aufgezeigt werden und muss daher weiter getestet werden. Dieses vorläufige Ergebnis widerspricht einer Studie aus dem Jahre 2009, laut ihr soll Cat1 eine starke T_H2-Aktivität auslösen, mit einer hohen Produktion von IL-4 und gleichzeitig einer geringen von IFN- γ , IL-10 und IL-17 (BOZZA et al., 2009). Eine spätere Arbeitsgruppe konnte dies jedoch nicht bestätigen (JOLINK et al., 2013). Um eine endgültige Aussage bezüglich der T-Zell-Antwort auf Cat1 treffen zu können, sind daher weitere Tests geplant.

4.3 Cytosolische Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Aspf3/Pmp	Afu6g02280
Aspf6/MnSOD	Afu1g14550
Aspf8	Afu2g10100
Aspf11	Afu2g03720
Aspf22/EnoA	Afu6g06770
CipC	Afu5g09330

Tabelle 71: Übersicht aller erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine

4.3.1 Aspf3

Es konnte ein exprimierender Klon mit einem guten Expressionslevel hergestellt werden. Auch einer früheren Arbeitsgruppe war es bereits gelungen das rekombinante Aspf3 herzustellen (CHAUDHARY et al., 2010).

Nach Dialyse wurde eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen. Das rekombinante Protein stand damit für T-Zell-Versuche zur Verfügung. Bisherige Ergebnisse des Kooperationspartners lassen jedoch noch keine Aussagen bezüglich der T-Zell-Reaktion zu. Laut Literatur soll es über eine Aktivierung von T_H1 -Zellen einen protektiven Schutz vermitteln (DIAZ-AREVALO et al., 2011).

4.3.2 Aspf6

Das Gen besitzt zwei Introns und konnte erfolgreich mit cDNA amplifiziert werden. Ein gut exprimierender Klon konnte identifiziert werden.

Nach Dialyse wurde eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen werden. Bei einem weiteren Reinigungsversuch, der nötig war, da dieses Protein in mehreren Stimulationsversuchen eingesetzt wurde, ergab sich ein LPS-Wert von > 100 EU/ml. Bei dem Versuch die Probe über eine Endotoxinsäule zu reinigen ging sämtliches Protein verloren. Der Einsatz dieser Säulen wird daher für zukünftige Arbeiten nicht empfohlen. In weiteren Versuchen sollte Aspf6 in dem bereits bei Aspf9 erfolgreich getesteten ClearColi-Stamm exprimiert werden. Dies

konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden. In ersten Untersuchungen im Vollblut-ELISA konnte der Kooperationspartner eine vermehrte IFN- γ Produktion bei gesunden Spendern nachweisen, daher wurde Asp6 für die Weiterentwicklung dieses Verfahrens ausgewählt. Weitere Untersuchungen werden folgen.

4.3.3 Asp8

Das Gen besitzt sowohl ein Intron als auch eine Signalsequenz und wurde daher aus cDNA amplifiziert. Ein gut exprimierender Klon konnte hergestellt werden. Eine vorangegangene Arbeitsgruppe war dies im pTrcHis2 Expressionssystem nicht gelungen (CHAUDHARY et al., 2010)

Bei der anschließenden Reinigung wurde beobachtet, dass sich das rekombinante Protein bereits vollständig beim Waschschrift mit dem *Binding Buffer II* von der Matrix löste. Nach Umpuffern wurde eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen. Somit stand die Probe für T-Zell-Analysen zur Verfügung. Im ELISpot Assay wurden zwei Gruppen von Probanden miteinander verglichen, die eine Gruppe bestand aus gegenüber *A. fumigatus* gering exponierten Probanden, die andere aus hoch exponierten. Die Gruppe der gering exponierten Probanden zeigte dabei im Vergleich zur anderen Gruppe deutlich geringere IL-5 Ausschüttungen. Weitere Daten liegen derzeit noch nicht vor, es sind jedoch weitere Untersuchungen geplant.

4.3.4 Asp11

Aufgrund der Intronstrukturen wurde cDNA für Amplifikation des Gens verwendet. In einem ersten Klonierungsversuch in den M15-Stamm, konnten keine positiven Klone identifiziert werden. Einer früheren Arbeitsgruppe war die Herstellung und Reinigung von Asp11 jedoch im pTrcHis2 Expressionssystem gelungen (CHAUDHARY et al., 2010). Daraufhin wurde das Expressionsplasmid in den *E. coli*-Rosetta-Stamm transformiert. Von acht Klonen zeigten acht eine induzierte Bande auf der richtigen Höhe. Sie hatten alle ein ähnlich gutes Expressionlevel. Über einen Wechsel des Bakterienstammes konnte somit das Problem der fehlenden Expression im Falle des Asp11 gelöst werden.

Auf eine Reinigung wurde bei diesem Protein aus Zeitgründen verzichtet, dennoch ist der Versuch Aspf11 als rekombinantes Protein herzustellen als positiv zu bewerten.

4.3.5 Aspf22/Enolase

Aufgrund der drei Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert. Es konnte ein gut exprimierender Klon hergestellt werden. Dies gelang einer früheren Arbeitsgruppe im pTrcHis2 Expressionssystem nicht (CHAUDHARY et al., 2010).

Nach Umpuffern konnte eine LPS-Konzentration von < 1 EU/ml gemessen werden. Somit stand dieses Protein für T-Zell-Analysen zur Verfügung. Bei einem ersten ELISpot Assay konnte beobachtet werden, dass es, wie bereits Aspf8, zu einer unterschiedlich hohen Ausschüttung von IL-5 kommt, wodurch unterschiedlich stark *A. fumigatus*-exponierte Probanden unterschieden werden konnten. So zeigte auch hier die Gruppe der hoch exponierten Probanden eine deutlich höhere Ausschüttung von IL-5 im Vergleich zur gering exponierten Gruppe. Weitere Untersuchungen sollen auch hier noch folgen.

4.3.6 CipC

Das Gen besitzt zwei Introns, daher wurde für die PCR cDNA eingesetzt. Es konnte erfolgreich amplifiziert und anschließend ein exprimierender Klon hergestellt werden.

Bei der Talonreinigung löste sich dieses Protein bereits sauber beim Waschschrift mit dem *Binding buffer* II von der Säule.

Bei der darauf erfolgten Dialyse konnte bereits makroskopisch beobachtet werden, dass das Protein im Puffer mit 1 M Harnstoff ausgefallen war. Dies wurde nach der Zentrifugation der dialysierten Probe noch deutlicher, da sich ein Pellet gebildet hatte. Auch das Coomassie-Gel bestätigte diesen Verdacht. So erfolgte eine Resuspendierung des Pellets mit dem Überstand. CipC war das einzige Protein, das bei der Dialyse ausfiel.

Die LPS-Konzentration wurde mit < 1 EU/ml gemessen und daher stand diese Probe für T-Zell-Analysen zur Verfügung. Ähnlich wie bei Aspf8 und Aspf22 kommt es im ELISpot Assay zu schwankenden Ausschüttungen von IFN- γ und IL-5 bei unterschiedlich stark exponierten Menschen gegenüber *A. fumigatus*. Bei hoch exponierten Probanden konnten, im Vergleich zur Gruppe der gering exponierten, sowohl deutlich höhere IFN- γ Werte als auch deutlich erhöhte IL-5 Werte gemessen werden. Auch mit diesem Protein soll daher eine Unterscheidung zwischen hoch- und niedrig exponiert möglich sein. Es werden weitere Untersuchungen folgen.

4.4 Konidienproteine

In der folgenden Tabelle sind alle erfolgreich hergestellte Konidienproteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID
Pst2	Afu1g02820
CcpA	Afu1g13670

Tabelle 72: Übersicht aller erfolgreich hergestellten Konidienproteine

4.4.1 Pst2

Aufgrund der vorhandenen Intronstrukturen wurde das Gen mittels cDNA amplifiziert. Ein gut exprimierender Klon konnte hergestellt werden und das rekombinante Protein ließ sich gut reinigen. Nach Umpuffern wurde ein LPS-Gehalt von 4,72 EU/ml gemessen. Diese Probe eignet sich daher nur für den Einsatz in einem ELISpot Assay. Erste Untersuchungen lassen jedoch noch keine Aussage hinsichtlich der T-Zell-Antwort zu.

4.4.2 CcpA

Das Gen enthält im Bereich der Signalsequenz ein Intron, da die Signalsequenz nicht für die Klonierung vorgesehen war und das Oligonukleotid dementsprechend positioniert wurde, konnte es mit chromosomaler DNA amplifiziert werden. Ein Klon mit einem eher geringen Expressionslevel konnte hergestellt werden. Auf eine Reinigung wurde bei diesem Protein aus Zeitgründen

verzichtet, dennoch ist die Herstellung als positiv einzustufen.

5. Nicht erfolgreich hergestellte Proteine

5.1 Sekretierte Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte sekretierte Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID	Problem
Aspf5/Mep1	Afu8g07080	Gen nicht amplifizierbar
Aspf7	Afu4g06670	Keine Expression
Aspf10/Pep1	Afu5g13300	Keine positiven Klone
Aspergillopepsin	Afu7g01200	Keine Expression

Tabelle 73: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten sekretierten Proteine

5.1.1 Aspf5/Mep1

Das entsprechende Gen enthält vier Introns, daher musste für die Amplifikation cDNA verwendet werden. Die durchgeführten Versuche verliefen jedoch negativ. Dies lag nicht an den verwendeten Oligonukleotiden, da das Gen von genomischer DNA amplifizierbar war. Aspf5 ist eine sekretierte Protease, diese werden vor allem dann verstärkt gebildet, wenn der Pilz auf externe Proteine als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle angewiesen ist, daher wurden die Wachstumsbedingungen für die Gewinnung der cDNA verändert (MONOD et al., 2002). Außerdem gab es bereits Veröffentlichungen, in denen Aspf5 erfolgreich als exprimierendes rekombinantes Protein hergestellt werden konnte. Diese Arbeitsgruppe arbeitete mit einem *Skim Milk Medium*, welches die Bildung von Proteasen stimulieren soll. Dies enthielt 1% Glukose, 1% Magermilch, 0,1% Casaminsäure, 7mM KCl, 2mM MgSO₄, 50mM Na₂HPO₄, 0,05% Triton X-100 und Spurenelementen (SHARON et al., 2009). Doch auch so ließ sich Aspf5 nicht erfolgreich amplifizieren, das lag nicht an der cDNA, da dank ihr Aspf10, eine weitere sekretierte Protease, erfolgreich amplifiziert werden konnte. Auf weitere

Versuche wurde aus Zeitgründen verzichtet.

5.1.2 Aspf7

Das Gen konnte ohne Signalsequenz erfolgreich amplifiziert werden. Bei der anschließenden Klonierung und Transformation in den M15-*E. coli*-Stamm entstanden Klone, die mittels PCR überprüft wurden. Die dabei als positiv identifizierten Klone wurden im Anschluss auf Expression getestet, welche jedoch bei allen negativ ausfiel. Auch ein erneutes Klonieren brachte keine exprimierenden Klone hervor.

Eines der Expressionsplasmide wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass das gesamte Gen in den Vektor kloniert werden konnte. Auch bei der Analyse der sequenz des Aspf7-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* wurden keine Bereiche gefunden, die sich ungünstig auf eine Expression auswirken sollten. Das Aspf7-Plasmid wurde daraufhin in einen anderen *E. coli*-Stamm (Rosetta) transformiert. Bei dieser Transformation entstanden abermals Klone, die laut PCR positiv waren. Bei der anschließenden Überprüfung auf Expression zeigte sich jedoch auch hier, dass keiner der Klone eine induzierte Bande zeigte. Erneutes Klonieren und Transformieren in den Rosetta-Stamm brachten ebenfalls keinen exprimierenden Klon hervor und daher wurde aus Zeitgründen von weiteren Bemühungen abgesehen. Zu klären bleibt, ob ein anderer Bakterienstamm zu einer Expression geführt hätte. Einer früheren Arbeitsgruppen gelang die Herstellung eines exprimierenden Klons (CRAMERI, 1998). Dagegen gelang einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls nicht, einen exprimierenden Klon herzustellen (CHAUDHARY et al., 2010).

5.1.3 Aspf10/Pep1

Aufgrund der vorhandenen Intronstrukturen wurde cDNA eingesetzt. Zunächst gelang jedoch keine erfolgreiche Amplifikation. Dies lag nicht an den verwendeten Oligonukleotiden, da das Gen von genomischer DNA amplifizierbar war. Wie Aspf5 gehört auch Aspf10 zu den sekretierten Proteasen, daher wurde für die Amplifikation in einem weiteren Versuch cDNA eingesetzt, welche aus

einem Pilz hergestellt wurde, der in einem *Skim Milk Medium* angewachsen war. Das Gen konnte so erfolgreich amplifiziert werden. Bei der anschließenden Klonierung und Transformation in den M15-*E. coli*-Stamm, konnte jedoch keiner als positiv identifiziert werden. Die Klone, die dabei entstanden, wurden per PCR überprüft. Dabei konnte jedoch kein Klon als positiv identifiziert werden. Bei der Überprüfung der Restriktionsstellen in den Primern, konnten keine Fehler festgestellt werden. Auch ein Wechsel des Bakterienstammes zu Rosetta lieferte nur negative Klone.

Nach mehreren Fehlversuchen wurden die Bemühungen daher aus Zeitgründen eingestellt. Dennoch war es dank des Wechsels des Anzuchtmediums für die cDNA im Falle des Aspf10 möglich, zumindest das Gen herzustellen. Einer früheren Arbeitsgruppe gelang es ebenfalls nicht, exprimierende Klone herzustellen. Sie vermutete, dass sich Aspf10 schädlich auf die *E. coli*-Bakterien auswirkte (CHAUDHARY et al., 2010).

5.1.4 Aspergillopepsin

Das Gen besitzt eine Signalsequenz und konnte erfolgreich, ohne Signalsequenz, amplifiziert werden. Bei denen aus der Klonierung in *E. coli* (M15) entstandenen Klone konnte jedoch keiner als positiv identifiziert werden. Daraufhin fand eine Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm statt. Bei dieser Transformation entstanden Klone, welche laut Überprüfung mittels PCR das Konstrukt zwar aufgenommen hatten, jedoch zeigte keiner dieser positiven Klone eine induzierte Bande. Bei einem der Klone, welcher laut PCR die richtige Größe hatte, das Protein jedoch nicht exprimierte, wurde eine Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* durchgeführt. Diese bestätigte, dass das gesamte Gen, ohne Signalsequenz, erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte. Da die Analyse der Sequenz des Aspergillopepsin-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* ebenfalls keine Hinweise für die fehlende Expression lieferte, wurde auf weitere Bemühungen wurde aus Zeitgründen verzichtet.

5.2 Zellwandproteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte Zellwandproteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID	Problem
Aspf17/MP1	Afu4g03240	Keine Expression
CspA	Afu3g08990	Keine Expression

Tabelle 74: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten Zellwandproteine

5.2.1 Aspf17

Das Gen konnte erfolgreich ohne Signalsequenz mit chromosomaler DNA amplifiziert werden. Bei der Überprüfung der laut PCR positiven Klone, die aus der Klonierung in *E. coli* (M15) entstanden waren, konnte jedoch keiner unter ihnen identifiziert werden, der eine induzierte Bande zeigte. Eine Analyse der Sequenz des Aspf17-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* lieferte keine Erklärung für die fehlende Expression. Auch eine Transformation in den Rosetta-*E. coli*-Stamm brachte keine exprimierenden Klone hervor. Einer der Klone wurde mit dem *pQE30-forward-primer* sequenziert. Dieser zufolge konnte das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden. Bei einer früheren Veröffentlichung konnte Aspf17 erfolgreich exprimiert und im Anschluss gereinigt werden, sie nutzten das pTrcHis2 Expressionssystem (CHAUDHARY et al., 2010). Aus Zeitgründen wurde von weiteren Klonierungsversuchen abgesehen, für zukünftige Versuche könnte jedoch auf pTrcHis2 zurückgegriffen werden.

5.2.2 CspA

Aufgrund der vorhandenen Introns wurde das Gen mit cDNA amplifiziert und konnte, ohne Signalsequenz, erfolgreich hergestellt werden. Dennoch konnte keiner der Klone bei der Transformation in den M15-Stamm als positiv identifiziert werden. Daraufhin wurde das gereinigte und geschnittene PCR-Produkt neu in den Vektor kloniert und anschließend in den Rosetta-Stamm transformiert. Bei dieser Transformation entstanden laut PCR zwar positive Klone, keiner von ihnen zeigte jedoch im Anschluss eine induzierte Bande. Die Sequenzierung eines Expressionsplasmids mit dem *pQE30-forward-primer*

bestätigte, dass das Gen erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte. Auch die Analyse der Sequenz des CspA-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* lieferte keine Hinweise für die fehlende Expression.

Aus Zeitgründen wurden daher keine weiteren Versuche unternommen.

5.3 Cytosolische Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle nicht erfolgreich hergestellte cytosolische Proteine aufgeführt.

Antigen	Genbank-ID	Problem
Aspf12/Hsp90	Afu5g04170	Keine positiven Klone
Smt1	Afu3g09320	Keine Expression

Tabelle 75: Übersicht aller nicht erfolgreich hergestellten cytosolischen Proteine

5.3.1 Aspf12

Aufgrund der Intronstrukturen und der großen Größe, sollte das Gen erst ab dem 2. Exon amplifiziert werden, daher konnte für die PCR chromosomale DNA verwendet werden. Keiner der Klone aus der Transformation in M15 konnte als positiv identifiziert. Auch eine Transformation in den Rosetta-Stamm lieferte nur negative Klone und somit wurde die Herstellung nach mehreren Fehlversuchen aus Zeitgründen eingestellt, obwohl es bereits eine Veröffentlichung gibt, in der der Aspf12 erfolgreich hergestellt und gereinigt werden konnte (CHAUDHARY et al., 2010). In zukünftigen Arbeiten sollten daher die Bemühungen wieder aufgenommen werden.

5.3.2 Smt1

Das Gen konnte erfolgreich amplifiziert werden. Keiner der Klone aus der Transformation in M15, der bei der Überprüfung per PCR als positiv identifiziert werden konnte, zeigte jedoch eine Expression. Auch bei einer Umklonierung in den Rosetta-Stamm konnten keine exprimierenden Klone hergestellt werden. Eine

Sequenzierung mit dem *pQE30-forward-primer* bestätigte, dass das Konstrukt erfolgreich in den Vektor kloniert werden konnte. Da auch die Analyse der Sequenz des Smt1-Gens mit der *codon usage* von *E. coli* keine Bereiche vorhersagte, die sich ungünstig auf die Expression auswirken sollten, wurde von weiteren Bemühungen aus Zeitgründen daher abgesehen.

6. Konklusion und Ausblick

Nicht alle der ursprünglich geplanten 27 Antigenen konnten erfolgreich hergestellt werden. Der Grund warum acht von ihnen nicht hergestellt werden konnten, lag bei den meisten daran, dass es zu keiner Expression des rekombinanten Proteins kam. Bei einem Protein, das zuvor ebenfalls nicht exprimierte, konnte ein Wechsel des Bakterienstammes zu einem BL21-Derivat exprimierende Klone hervorbringen. So gelang es durch diesen Wechsel von Aspf11 exprimierende Klone herzustellen, bei anderen Proteinen, wie Aspf7 oder Aspf17, blieben diese Versuche jedoch erfolglos. Auch mit Hilfe der Analyse der *codon usage* konnte in den meisten Fällen keine Ursache für die fehlende Expression gefunden werden. Interessant ist, dass einer anderen Arbeitsgruppe die Herstellung von Aspf17 oder Aspf12 gelang. Andererseits konnten wir dafür andere Antigene herstellen, welche dieser Arbeitsgruppe nicht gelangen, wie Aspf1 oder Aspf13 (CHAUDHARY et al., 2010).

Eine weitere große Herausforderung bei der vorliegenden Arbeit war, dass die LPS-Konzentration in den Proben den Grenzwert von 1 EU/ml nicht überschreiten durften, da LPS zu falschpositiven Reaktionen der T-Zellen führen kann. Ursprünglich war es geplant, die Antigene in einem ELISpot Assay einzusetzen, hierfür hätte die Einhaltung des Grenzwertes von < 100 EU/ml ausgereicht. Im Verlauf des Projektes stellte sich jedoch heraus, dass die T-Zell-Reaktionen in einem Vollblut-ELISA gemessen werden sollten. Diese Methode zeichnete sich als besseres Verfahren für den Einsatz im klinischen Geschehen ab und somit musste eine Lösung gefunden werden, diese geringe LPS-Konzentration in den Proben einzuhalten. Bei der Proteinreinigung über die Talonsäule verliefen die ersten Messungen recht vielversprechend, lediglich drei Proteine zeigten erhöhte Werte (FG-GAP: 798 EU/ml; CsnB: 180,79 EU/ml, Hly: 182 EU/ml). Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu teils sehr schwankenden und deutlich erhöhten

Konzentrationen von LPS. Gerade bei Aspf9, welches sich als eines der Antigene herausstellte, das sich am besten für T-Zell-Messungen eignete, gab es oft sehr weit auseinanderreichende Werte von 1,2 EU/ml bis zu 75 EU/ml. Da auch eine Reinigung über eine Endotoxinsäule erfolglos war, musste daher nach einer anderen Lösung gesucht werden, die eine Herstellung mit konstant niedrigen LPS-Konzentrationen ermöglichte. In einem ersten Versuch wurde ein gentechnisch veränderter Bakterienstamm hierfür erfolgreich eingesetzt und es konnte eine Aspf9-Probe mit einem LPS-Wert von < 1 EU/ml hergestellt werden. Der Einsatz dieses Bakterienstammes scheint also sehr vielversprechend zu sein.

Erste T-Zell-Messungen des Kooperationspartners zeichnen sich als vielversprechend ab. So konnten in einer ersten Studie im ELISpot Assay Unterschiede bei der Zytokinproduktion zwischen Probanden, die gegenüber *A. fumigatus* unterschiedlich stark exponiert sind, gezeigt werden. Dabei zeichnete sich ab, dass vor allem Aspf4, Cat1, CipC und Aspf9 eine erhöhte IFN- γ Produktion bei der gegenüber *A. fumigatus* hoch exponierten Gruppe, im Vergleich zur niedrig exponierten, zu erkennen war. Somit könnte anhand dieser Antigene eine Unterscheidung zwischen hoch und niedrig exponierten Probanden ermöglicht werden. Des Weiteren kam es bei Aspf8, Aspf22, Cat1 und CipC bei der gegenüber *A. fumigatus* hoch exponierten Gruppe ebenfalls zu einer vermehrten Produktion von IL-5, welche somit ebenfalls eine Unterscheidung der beiden Gruppen in niedrig und hoch exponiert zulässt. Sowohl beim ELISpot Assay für IFN- γ als auch beim ELISpot Assay für IL-5 konnten mit Hilfe der Antigene größere Differenzen bei den Spotzahlen der beiden Gruppen gemessen werden, als mit dem kommerziell erhältlichen *A. fumigatus* Lysat. Aufgrund dieser Daten, könnten sich eventuell Oberflächenproteine oder sekretierte Proteine eher für die Analyse von T-Zell-Reaktionen eignen, da jedoch noch nicht von allen hergestellten Antigenen Ergebnisse vorliegen, muss die Vermutung noch bestätigt werden.

Außerdem ist eine weitere Studie mit Patienten in Kooperation mit dem University Hospital of Wales, Cardiff (Wales) geplant. Da die Fallzahlen von Patienten mit ABPA dort höher sind, werden dort Proben von Patienten genommen und im Vollblut-ELISA analysiert werden. Da bisher mit Aspf4, Aspf6 und Aspf9 die besten T-Zell-Reaktionen gemessen werden konnten,

werden diese drei Antigene hierfür eingesetzt.

Mit dieser Arbeit konnte also eine Grundlage für funktionelle Tests und Studien mit verschiedenen Personen- bzw. Patientengruppen gelegt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung und Anwendung einer Methode zur Herstellung von *A. fumigatus*-Antigenen. Der pathogene Schimmelpilz *A. fumigatus* gilt als opportunistischer Infektionserreger sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin.. Dabei beeinflusst vor allem der immunologische Status des Individuums den Verlauf eines Krankheitsgeschehens. So können ganz unterschiedliche Formen wie allergische Reaktionen oder invasive Mykosen auftreten. Besonders problematisch bei Infektionen mit *A. fumigatus* ist, dass Erkrankungen oft erst zu einem Zeitpunkt diagnostiziert werden, zu dem das Krankheitsgeschehen bereits weit fortgeschritten und eine Therapie damit wenig erfolgsversprechend ist.

Eine große Rolle bei der Auseinandersetzung des Immunsystems mit *A. fumigatus* nehmen T-Lymphozyten ein. So können anhand der vorherrschenden T-Zell-Population Aussagen darüber getroffen werden, ob eine Immunität besteht oder es zu einem allergischen oder invasiven Verlauf kommt. In Studien konnten bereits erfolgreich spezifische T-Zellen gegen *A. fumigatus* als Prophylaxe eingesetzt werden. Für den Einsatz spezifischer T-Zellen gegen *A. fumigatus* ist allerdings die erfolgreiche Generierung dieser T-Zellen entscheidend, dafür werden geeignete *A. fumigatus*-Antigene benötigt. Da die Herstellung von *A. fumigatus*-spezifischen Antigenen bisher noch wenig erfolgreich war, war Ziel dieser Arbeit eine Methode zur Herstellung von *A. fumigatus*-spezifischen Antigenen zu etablieren. Bei einem Erfolg sollten diese im Anschluss durch einen Kooperationspartner am Universitätsklinikum Würzburg hinsichtlich ihrer Eignung als T-Zell-Antigene evaluiert werden. Es sollte untersucht werden, ob sich mit Hilfe rekombinanter *A. fumigatus* Proteine die Aspergillus-spezifische T-Zell-Antwort im Menschen abbilden lässt und ob dies die Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren ermöglicht.

Die erste Herausforderung dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Antigene sich für den Nachweis einer T-Zell-Antwort eignen könnten. So erfolgte eine Auswahl anhand der Lokalisation der Proteine. Sekretierte Proteine können früher im Infektionsgeschehen eine Rolle spielen. Zellwand- und cytosolische Proteine

hingegen erst später. Daneben kann zwischen Hyphen- und Konidienproteinen unterschieden werden. Beide Morphotypen treten bei Erkrankungen auf, jedoch ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In früheren Studien wurden zumeist nur drei bis vier Antigene untersucht, Ziel dieser Arbeit war es, möglichst viele rekombinante Antigene herzustellen und sie hinsichtlich ihrer T-Zell-Antwort zu testen. Uns gelang von ursprünglich 27 geplanten Antigenen die Herstellung von 19. Damit verfügen wir nun über eine vergleichsweise große Anzahl rekombinanter *A. fumigatus*-Antigene. Von den acht nicht erfolgreich hergestellten Proteinen war die häufigste Ursache des Misserfolgs, dass es zu keiner Expression des rekombinanten Proteins kam. Zumindest in einem Fall konnte über Umklonieren in einen anderen *E. coli*-Stamm eine Expression hervorgerufen werden.

Eine weitere große Herausforderung bei der vorliegenden Arbeit war, die LPS-Konzentration in den Proben möglichst gering zu halten, da LPS zu falschpositiven Reaktionen der T-Zellen führen kann. Ursprünglich war es geplant, die Antigene in einem ELISpot Assay einzusetzen, hierfür hätte die Einhaltung des Grenzwertes von < 100 EU/ml ausgereicht. Im Verlauf des Projektes stellte sich jedoch heraus, dass die T-Zell-Reaktion in einem Vollblut-ELISA gemessen werden sollten, der Grenzwert der LPS-Konzentration wurde daher auf 1 EU/ml herabgesetzt. Die Proteinreinigung über die Talonsäule lieferte teils deutlich zu hohe LPS-Konzentrationen in den Proben. In einem ersten Versuch stellte sich der Einsatz eines gentechnisch veränderten LPS-freien *E. coli*-Stammes als sehr vielversprechend dar. Weitere Untersuchungen konnten aus Zeitgründen jedoch nicht mehr stattfinden, dies sollte in weiterführenden Arbeiten noch fortgeführt werden. Derzeit läuft eine Studie, in der die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Antigene eingesetzt werden. Nach ersten Ergebnissen scheinen einige Antigene eine Unterscheidung von Probanden zu erlauben, die gegenüber *A. fumigatus* niedrig bzw. hoch exponiert sind. Es müssen jedoch weitere Ergebnisse abgewartet werden. Da die Etablierung des Vollblut-ELISAs sehr vielversprechend anläuft, werden die ersten Ergebnisse bereits auf der Konferenz *Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis* in Lugano vorgestellt werden. Außerdem ist eine weitere Studie in Kooperation mit dem University Hospital of Wales, Cardiff (Wales) geplant. Dort sollen Proben von Patienten mit ABPA im Vollblut-ELISA mit Hilfe unserer hergestellten Antigene analysiert werden.

VII. SUMMARY

The present work dealt with the establishment and application of a method for the production of *A. fumigatus* antigens. The pathogenic mould *A. fumigatus* is considered an opportunistic infectious agent and is becoming increasingly important in both human and veterinary medicine. The immunological status of the individual influences the course of the disease and causes very different forms of disease, ranging from allergic reactions to invasive mycoses. A particular problem with infections caused by *A. fumigatus* is that diseases are often diagnosed at a point in time when the infection is already well advanced and therapy is therefore difficult.

T lymphocytes play a major role in the immune system's response to *A. fumigatus*. Thus, the predominant T-cell population indicates whether a protective immunity exists or whether an allergic or invasive course occurs. In some studies, specific T cells have been successfully used as prophylaxis against *A. fumigatus* infections. However, the successful generation of specific T-cells requires suitable recombinant *A. fumigatus* proteins.

As the production of *A. fumigatus*-specific antigens has not been very successful so far, the aim of this work was to establish a method for the production of *A. fumigatus*-specific antigens. Subsequently, these recombinant proteins were to be evaluated as T-cell antigens by a cooperation partner at the University Hospital of Würzburg. The aim was to investigate whether the recombinant *A. fumigatus* proteins allow a mapping of the Aspergillus-specific T-cell response in humans and whether this is a promising way to develop new diagnostic procedures.

The first challenge of this work was to find out which antigens might be suitable for the detection of a T-cell response. The selection was based on the localisation of the proteins. Secreted proteins can play a role at an early stage of the infection process. Cell wall and cytosolic proteins, however, are more relevant at later time points. In addition, a distinction can be made between hyphal and conidial proteins. Both morphotypes occur in diseases, but at different times. Previous studies commonly investigated only three to four antigens. The aim of this work was to produce as many recombinant antigens as possible and to test them for

their ability to map the *Aspergillus*-specific T cell response. We succeeded in producing 19 of the 27 antigens originally planned, which represents a comparatively large set of recombinant *A. fumigatus* antigens. Of the eight non-successful attempts, the most frequent cause of failure was the lack of expression of the recombinant protein. In at least one case, expression could be induced by cloning into another *E. coli* strain.

Another major challenge in the present work was to keep the LPS concentration in the samples as low as possible, since LPS can lead to false positive T cell reactions. Originally, it was planned to use the antigens in an ELISpot assay, for which compliance with the limit value of < 100 EU/ml would have been sufficient. However, in the course of the project it turned out that a whole blood ELISA was more suitable to measure the T-cell reaction. Consequently, the limit value of the LPS concentration had to be lowered to 1 EU/ml. Protein purification via the talon column resulted in some cases in LPS concentrations in the samples that were clearly too high. In a first trial, the use of a genetically modified LPS-free *E. coli* strain proved to be very promising. However, further investigations could not be carried out due to time constraints and this should be continued in further work.

According to a study that is currently underway, some recombinant antigens allow a differentiation of individuals that are either low or high exposed to *A. fumigatus*. However, further results have to be awaited. As the establishment of the whole blood ELISA is very promising, first results have already been presented at the conference *Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis* in Lugano. Another study is planned in cooperation with the University Hospital of Wales, Cardiff (Wales); samples from ABPA patients will be analyzed using the whole blood ELISA and selected antigens produced in this work.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adamama-Moraitou KK, Pardali D, Day MJ, Denning DW, Papazoglou L, Papastefanou A, Rallis TS. *Aspergillus fumigatus* Bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2011; 47: e13-e8.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV. Surface Hydrophobin prevents Immune Recognition of Airborne Fungal Spores. *Nature* 2009; 460: 1117-21.

Akira S, Takeda K. Toll-like Receptor Signalling. *Nature reviews immunology* 2004; 4: 499.

Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. Integrative Analysis of the Heat Shock Response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC genomics* 2010; 11: 32.

Arné P, Thierry S, Wang D, Deville M, Loc'h L, Desoutter A, Féménia F, Nieguitsila A, Huang W, Chermette R. *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *International journal of microbiology* 2011; 2011: 746356.

Ascioglu S, Rex J, De Pauw B, Bennett J, Bille J, Crokaert F, Denning D, Donnelly J, Edwards J, Erjavec Z. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical infectious diseases* 2002; 34: 7-14.

Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, Nomiyama H, Yoshie O. Identification of CCR6, the Specific Receptor for a Novel Lymphocyte-directed CC Chemokine LARC. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 14893-8.

Balloy V, Chignard M. The Innate Immune Response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection* 2009; 11: 919-27.

Banerjee B, Kurup V, Greenberger PA, Johnson B, Fink J. Cloning and Expression of *Aspergillus fumigatus* Allergen Asp f 16 mediating both Humoral and Cell-mediated Immunity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA). *Clinical & Experimental Allergy* 2001; 31: 761-70.

Barabas SD (2007) Immunologische Mechanismen des Harnstoff-vermittelten Proteintransfers in antigenpräsentierende Zellen und dessen Bedeutung für den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen und ihrer Zielstrukturen (Doktorarbeit). Universität Regensburg, Regensburg

Barachetti L, Mortellaro CM, Di Giancamillo M, Giudice C, Martino P, Travetti O, Miller PE. Bilateral Orbital and Nasal Aspergillosis in a Cat. *Veterinary ophthalmology* 2009; 12: 176-82.

Bardana EJ, Silva-Hutner M. The Clinical Spectrum of Aspergillosis—Part 1: Epidemiology, Pathogenicity, Infection in Animals and Immunology of *Aspergillus*. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1980; 13: 21-83.

Barnes PD, Marr KA. Risks, Diagnosis and Outcomes of Invasive Fungal Infections in Haematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *British journal of haematology* 2007; 139: 519-31.

Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA. *Aspergillus felis* sp. nov., an Emerging Agent of Invasive Aspergillosis in Humans, Cats and Dogs. *PLoS ONE* 2013; 8: e64871.

Bates D, Su L, Yu D, Chertow G, Seger D, Gomes D, Dasbach E, Platt R. Mortality and Costs of Acute Renal Failure associated with Amphotericin B Therapy. *Clinical infectious diseases* 2001; 32: 686-93.

Bauer R (2011) Interaktionen von humanen Immuneffektorzellpopulationen mit dem humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus*, sowie der Einfluss von 40-0-[2-Hydroxyethyl] rapamycin (RAD) auf deren Funktionen (Doktorarbeit). Universität Würzburg, Würzburg

Beck J (2014) Woronin Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphen-Septum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses pathogenen Schimmelpilzes (Doktorarbeit). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Bernheimer AW. Interactions between Membranes and Cytolytic Bacterial Toxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1974; 344: 27-50.

Billen F, Clercx C, Le Garèrès A, Massart L, Mignon B, Peeters D. Effect of Sampling Method and Incubation Temperature on Fungal Culture in Canine Sinonasal Aspergillosis. *Journal of Small Animal Practice* 2009; 50: 67-72.

Bloemendal S, Kück U. Cell-to-cell Communication in Plants, Animals, and Fungi: A Comparative Review. *Naturwissenschaften* 2013; 100: 3-19.

Blomme E, Piero FD, Perle KL, Wilkins PA. Aspergillosis in Horses: A Review. *Equine Veterinary Education* 1998; 10: 86-93.

Bohme A, Ruhnke M, Buchheidt D, Karthaus M, Einsele H, Guth S, Heussel G, Heussel C, Junghanss C, Kern W. Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Treatment of 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* 2003; 82: 133-40.

Bozza S, Clavaud C, Giovannini G, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, D'Angelo C, Perruccio K, Bonifazi P, Zagarella S. Immune Sensing of *Aspergillus*

fumigatus Proteins, Glycolipids and Polysaccharides and the Impact on Th Immunity and Vaccination. *The Journal of Immunology* 2009; 183: 2407-14.

Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J. Interaction of Phagocytes with Filamentous Fungi. *Current opinion in microbiology* 2010; 13: 409-15.

Brandt U. Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In: Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer 2014: 252-6.

Bromley I, Donaldson K. Binding of *Aspergillus fumigatus* Spores to Lung Epithelial Cells and Basement Membrane Proteins: Relevance to the Asthmatic Lung. *Thorax* 1996; 51: 1203-9.

Brown GD. Dectin-1: A Signalling non-TLR Pattern-Recognition Receptor. *Nature reviews immunology* 2006; 6: 33.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science translational medicine* 2012; 4: 16513-
.

Buchheidt D, Spiess B, Cornely O, Vehreschild M, Hamprecht A, Rath P-M, Steinmann J, Groß U, Bader O, Lauten M. Azol-Resistenz bei *Aspergillus fumigatus*–Epidemiologie und Nachweis bei immunsupprimierten Patienten in Deutschland. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2014; 139: 1373-6.

Burnie J. Allergic and Invasive Aspergillosis. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1995; 88: 41.

Camps SM, Dutilh BE, Arendrup MC, Rijs AJ, Snelders E, Huynen MA, Verweij PE, Melchers WJ. Discovery of a HapE Mutation that causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. *PLoS ONE* 2012; 7: e50034.

Carberry S, Molloy E, Hammel S, O’Keeffe G, Jones GW, Kavanagh K, Doyle SJFg, biology. Gliotoxin Effects on Fungal Growth: Mechanisms and Exploitation. *Fungal Genetics and Biology* 2012; 49: 302-12.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (2001) *The Fungi*. Gulf Professional Publishing, San Diego

Carrasco L, Mendez A, Jensen H. Chronic Bronchopulmonary Aspergillosis in a Horse with Cushing's Syndrome. *Mycoses* 1996; 39: 443-7.

Carvalho A, De Luca A, Bozza S, Cunha C, D'Angelo C, Moretti S, Perruccio K, Iannitti RG, Fallarino F, Pierini A. TLR3 Essentially Promotes Protective Class I–Restricted Memory CD8+ T-cell Responses to *Aspergillus fumigatus* in Hematopoietic Transplanted Patients. *Blood* 2012; 119: 967-77.

Cassone A. Fungal Vaccines: Real Progress from Real Challenges. *The Lancet infectious diseases* 2008; 8: 114-24.

Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: When, Where and How. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 519-40.

Cenci E, Mencacci A, Fè d'Ostiani C, Del Sero G, Mosci P, Montagnoli C, Bacci A, Romani L. Cytokine- and T helper-dependent Lung Mucosal Immunity in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *The Journal of infectious diseases* 1998; 178: 1750-60.

Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Fè d'Ostiani C, Mosci P, Bachmann M, Bistoni F, Kopf M. Interleukin-4 causes Susceptibility to Invasive Pulmonary Aspergillosis through Suppression of Protective Type I Responses. *Journal of Infectious Diseases* 1999; 180: 1957-68.

Cenci E, Mencacci A, Bacci A, Bistoni F, Kurup VP, Romani L. T-cell

Vaccination in Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 381-8.

Chabane S, Sarfati J, Ibrahim-Granet O, Du C, Schmidt C, Mouyna I, Prevost M-C, Calderone R, Latgé J-P. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p Influences Conidial Cell Wall Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 3259-67.

Chaudhary N, Staab JF, Marr KA. Healthy Human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* Antigens (*Aspergillus* T Cell Responses). *PLoS ONE* 2010; 5(2)

Cole RJ, Kirksey JW, Dorner JW, Wilson DM, Johnson Jr JC, Johnson AN, Bedell DM, Springer JP, Chexal KK. Mycotoxins Produced by *Aspergillus fumigatus* Species Isolated from Molded Silage. *Journal of agricultural and food chemistry* 1977; 25: 826-30.

Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. Plasmacytoid Dendritic Cells in Immunity. *Nature immunology* 2004; 5: 1219.

Cook W, Campbell R, Dawson C. The Pathology and Aetiology of Guttural Pouch Mycosis in the Horse. *Veterinary Record* 1968; 83: 422-8.

Cramer R, Blaser K. Cloning Allergens from *Aspergillus fumigatus*: The Filamentous Phage Approach. *International archives of allergy and immunology* 1995; 107: 460-1.

Cramer R, Lidholm J, Grönlund H, Stüber D, Blaser K, Menz G. Automated Specific IgE Assay with Recombinant Allergens: Evaluation of the Recombinant *Aspergillus fumigatus* Allergen I in the Pharmacia Cap System. *Clinical & Experimental Allergy* 1996; 26: 1411-9.

Cramer R, Hemmann S, Ismail C, Menz G, Blaser K. Disease-specific

Recombinant Allergens for the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *International Immunology* 1998; 10: 1211-6.

Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* Allergens: From the Nucleotide Sequences to Clinical Applications. *International archives of allergy and immunology* 1998; 115: 99-114.

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 2009; 22: 447-65.

Dasari P, Shopova IA, Stroe M. AspF2 From *Aspergillus fumigatus* Recruits Human Immune Regulators for Immune Evasion and Cell Damage. *Frontiers in Immunology* 2018; 9

De Luca A, Iannitti RG, Bozza S, Beau R, Casagrande A, D'Angelo C, Moretti S, Cunha C, Giovannini G, Massi-Benedetti C. CD4+ T-cell Vaccination Overcomes Defective Cross-presentation of Fungal Antigens in a Mouse Model of Chronic Granulomatous Disease. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122: 1816-31.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization For Research And Treatment Of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group And The National Institute Of Allergy And Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical infectious diseases* 2008; 46: 1813-21.

Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H. Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. *Clinical infectious diseases* 2002; 34: 563-71.

Diaz-Arevalo D, Bagramyan K, Hong TB, Ito JI, Kalkum M. CD4+ T-cells Mediate the Protective Effect of the Recombinant Asp f3-based Anti-aspergillosis Vaccine. *Infection and immunity* 2011; 79: 2257-66.

Diaz-Guerra T, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J. A Point Mutation in the 14 α -sterol Demethylase Gene *cyp51A* contributes to Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47: 1120-4.

Dinareello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, O'Connor JV. Tumor Necrosis Factor (Cachectin) is an Endogenous Pyrogen and Induces Production of Interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine* 1986; 163: 1433-50.

Dobesova O, Schwarz B, Velde K, Jahn P, Zert Z, Bezdekova B. Guttural Pouch Mycosis in Horses: A Retrospective Study of 28 Cases. *Veterinary Record* 2012; 171

Donnelly JP. Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis: Getting Closer But Still A Ways To Go. *Clinical infectious diseases* 2006; 42: 487-9.

Elghazali GE, Paulie S, Andersson G, Hansson Y, Holmquist G, Sun JB, Olsson T, Ekre HP, Troye-Blomberg M. Number of Interleukin-4-and Interferon- γ -secreting Human T-cells reactive with Tetanus Toxoid and the Mycobacterial Antigen PPD or Phytohemagglutinin: Distinct Response Profiles depending on the Type of Antigen used for Activation. *European journal of immunology* 1993; 23: 2740-5.

Enoch D, Ludlam H, Brown N. Invasive Fungal Infections: A Review of Epidemiology and Management Options. *Journal of medical microbiology* 2006; 55: 809-18.

Filler SG, Sheppard DC. Fungal Invasion of Normally Non-phagocytic Host Cells. *PLoS pathogens* 2006; 2: e129.

Garrett WS, Chen L-M, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galán JE, Mellman I. Developmental Control of Endocytosis in Dendritic Cells

by Cdc42. *Cell* 2000; 102: 325-34.

Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The Diagnostic Value of Halo and reversed Halo Signs for Invasive Mold Infections in Compromised Hosts. *Clinical infectious diseases* 2011; 52: 1144-55.

Greene RE, Schlamm HT, Oestmann J-W, Stark P, Durand C, Lortholary O, Wingard JR, Herbrecht R, Ribaud P, Patterson TF. Imaging Findings in Acute Invasive Pulmonary Aspergillosis: Clinical Significance of the Halo Sign. *Clinical infectious diseases* 2007; 44: 373-9.

Groß U (2013) *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Georg Thieme Verlag

Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 2596-602.

Hamilton H, Whitley R, McLaughlin S. Exophthalmos Secondary to Aspergillosis in a Cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2000; 36: 343-7.

Hartmann K, Hein J (2008) *Infektionskrankheiten der Katze*. Schlütersche, Hannover

Hattel A, Drake T, Anderholm B, McAllister E. Pulmonary Aspergillosis associated with Acute Enteritis in a Horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991; 199: 589-90.

Hawksworth DL. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species estimate revisited. *Mycological research* 2001; 105: 1422-32.

Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, Loeffler J, Monod

M, Latgé J-P, Einsele H. Analysis of T-cell Responses to *Aspergillus fumigatus* Antigens in Healthy Individuals and Patients with Hematologic Malignancies. *Blood* 2002; 100: 4521-8.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT Pathway. *Biochemical journal* 1998; 334: 297-314.

Hemmann S, Menz G, Ismail C. Skin Test Reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* Allergens in *A. fumigatus*-sensitized Asthmatic Subjects allows Diagnostic Separation of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis from Fungal Sensitization. *Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 104: 601-7.

Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann J-W, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O. Voriconazole versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. *New England Journal of Medicine* 2002; 347: 408-15.

Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. Knowns and Unknowns of the Alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008; 5: 778-82.

Hill MW, Whiteman C, Benjamin MM, Ball L. Pathogenesis of Experimental Bovine Mycotic Placentitis produced by *Aspergillus fumigatus*. *Veterinary Pathology* 1971; 8: 175-92.

Hill TW, Kafer E. Improved Protocols for *Aspergillus* Minimal Medium: Trace Element and Minimal Medium Salt Stock Solutions. *Fungal Genetic Reports* 2001; 48: 20-1.

Hillmann F, Bagranyan K, Straßburger M. The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Scientific Reports* 2016; 6

Hinson, Moon A, Plummer N. Broncho-Pulmonary Aspergillosis. *Thorax* 1952; 7: 317-33.

Imlay JA. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77: 755-76.

Iyer G, Islam M, Quastel J. Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 1961; 192: 535-41.

Jacobson ER, Cheatwood JL, Maxwell LK. Mycotic Diseases of Reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2000; 9: 94-101.

Jantunen E, Piilonen A, Volin L, Parkkali T, Koukila-Kähkölä P, Ruutu T, Ruutu P. Diagnostic Aspects of Invasive Aspergillus Infections in Allogeneic BMT Recipients. *Bone marrow transplantation* 2000; 25: 867.

Jantunen E, Anttila V-J, Ruutu T. Aspergillus Infections in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Have we made any Progress? *Bone marrow transplantation* 2002; 30: 925 - 9.

Jensen H, Olsen S, Aalbaek B. Gastrointestinal Aspergillosis and Zygomycosis of Cattle. *Veterinary Pathology* 1994; 31: 28-36.

Johne B, Fagerhol M, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen C, Dale I. Functional and Clinical Aspects of the Myelomonocyte Protein Calprotectin. *Molecular Pathology* 1997; 50: 113.

Johnson P, Moore L, Mrad D, Turk J, Wilson D. Sudden Death of two Horses associated with Pulmonary Aspergillosis. *The Veterinary Record* 1999; 145: 16-20.

Jolink H, Meijssen IC, Hagedoorn RS, Arentshorst M, Drijfhout JW, Mulder A,

Claas FH, van Dissel JT, Falkenburg JF, Heemskerk MH. Characterization of the T-Cell-Mediated Immune Response Against the *Aspergillus fumigatus* Proteins Crf1 and Catalase 1 in Healthy Individuals. *The Journal of infectious diseases* 2013; 208: 847-56.

Jolink H (2017) Human T-cell Responses to *Aspergillus fumigatus*: In Healthy Individuals and Patients with *Aspergillus*-related Disease (Doktorarbeit). Universität Leiden, Leiden

Kabilan L, Andersson G, Lolli F, Ekre Hp, Olsson T, Troye-blomberg M. Detection of intracellular Expression and Secretion of Interferon- γ at the Single-cell Level after Activation of Human T cells with Tetanus Toxoid in vitro. *European journal of immunology* 1990; 20: 1085-9.

Kano R, Itamoto K, Okuda M, Inokuma H, Hasegawa A, Balajee SA. Isolation of *Aspergillus udagawae* from a Fatal Case of Feline Orbital Aspergillosis. *Mycoses* 2008; 51: 360-1.

Karhaus M, Buchheidt D. Invasive Aspergillosis: New Insights into Disease, Diagnostic and Treatment. *Current pharmaceutical design* 2013; 19: 3569-94.

Kimmerling EA, Fedrick JA, Tenholder MF. Invasive *Aspergillus niger* with Fatal Pulmonary Oxalosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest* 1992; 101: 870-2.

Klich MA. Identification of Clinically Relevant Aspergilli. *Medical mycology* 2006; 44: 127-31.

Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, Schwarzenberger P, Ye P, Nelson S, Summer WR. IFN- γ and CD8⁺ T cells restore Host Defenses against *Pneumocystis carinii* in Mice depleted of CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 2890-4.

Kotz A (2010) Die Bedeutung von Glycokonjugaten für die Pathogenität und das Wachstum des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* (Doktorarbeit). Ludwig-Maximilians-Universität, München. 182

Krauß D (2015) Identifizierung von Risikofaktoren für die Invasive Aspergillose bei immunsupprimierten Patienten nach haploidenter Stammzelltransplantation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Doktorarbeit). Universität Würzburg, Würzburg. X, 84 Seiten

Kruhm M (2014) Identifizierung und Isolierung *Aspergillus fumigatus* spezifischer T-Zell-Rezeptoren und funktionelle Charakterisierung nach Transfer auf humane T-Zellen (Doktorarbeit). Universität Würzburg, Würzburg. X, 106, IV Bl.

Kurup V, Xia J-Q, Cramer R, Rickaby D, Choi H, Flückiger S, Blaser K, Dawson C, Kelly K. Purified recombinant *A. fumigatus* Allergens induce different Responses in Mice. *Clinical Immunology* 2001; 98: 327-36.

Labelle AL, Hamor RE, Barger AM, Maddox CW, Breaux CB. *Aspergillus flavus* Keratomycosis in a Cat treated with topical 1% Voriconazole Solution. *Veterinary ophthalmology* 2009; 12: 48-52.

Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge JP. Functional Analysis of the Superoxide Dismutase Family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology* 2010; 75: 910-23.

Lamoth F, Juvvadi PR, Fortwendel JR, Steinbach WJ. Heat Shock Protein 90 is required for Conidiation and Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell* 2012; 11: 1324-32.

Lan H, Wu L, Fan K, Sun R, Yang G, Zhang F, Yang K, Lin X, Chen Y, Tian J. Set3 Is Required for Asexual Development, Aflatoxin Biosynthesis, and Fungal Virulence in *Aspergillus flavus*. *Frontiers in microbiology* 2019; 10

Lane J. The Management of Guttural Pouch Mycosis. *Equine veterinary journal* 1989; 21: 321-4.

Las Heras A, Dominguez L, Paya M, Fernandez-Garayzaibal J, Penia L, Mazzucchelli F, Garcia L. Intramammary *Aspergillus fumigatus* Infection in dairy Ewes associated with Antibiotic Dry Therapy. *The Veterinary Record* 2000; 147

Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 1999; 12: 310-50.

Lavigne LM, Albina JE, Reichner JS. β -Glucan is a Fungal Determinant for Adhesion-dependent Human Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 8667-75.

LeBlanc BW, Albina JE, Reichner JS. The Effect of PGG- β -glucan on Neutrophil Chemotaxis in vivo. *Journal of leukocyte biology* 2006; 79: 667-75.

Lee SH, Barnes WG, Schaetzel WP. Pulmonary Aspergillosis and the Importance of Oxalate Crystal Recognition in Cytology Specimens. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1986; 110: 1176-9.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.

Lepage O, Perron M-F, Cadoré J-L. The Mystery of Fungal Infection in the Guttural Pouches. *The Veterinary Journal* 2004; 168: 60-4.

Lepage O, Piccot-Crezollet C. Transarterial Coil Embolisation in 31 Horses (1999–2002) with Guttural Pouch Mycosis: a 2-Year follow-up. *Equine veterinary journal* 2005; 37: 430-4.

Lesch H (2003) Zur thermodynamischen Stabilität von Proteinen (Doktorarbeit).

Technische Universität München

Levdansky E, Kashi O, Sharon H, Shadkchan Y, Osherov N. The *Aspergillus fumigatus* *cspA* Gene encoding a repeat-rich Cell Wall Protein is important for normal Conidial Cell Wall Architecture and Interaction with Host Cells. *Eukaryotic cell* 2010; 9: 1403-15.

Levite M. Neuropeptides, by direct Interaction with T cells, induce Cytokine Secretion and break the Commitment to a Distinct T helper Phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95: 12544-9.

Levitz SM, Farrell TP. Human Neutrophil Degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of leukocyte biology* 1990; 47: 170-5.

Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Generation of Antifungal Effector CD8⁺ T cells in the Absence of CD4⁺ T-cells during *Cryptococcus neoformans* Infection. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 7920-8.

Liu Y-J. IPC: Professional type 1 Interferon-producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 275-306.

Ludwig A, Gatineau S, Reynaud M-C, Cadoré J-L, Bourdoiseau G. Fungal Isolation and Identification in 21 Cases of Guttural Pouch Mycosis in Horses (1998–2002). *The Veterinary Journal* 2005; 169: 457-61.

Luster AD, Leder P. IP-10, a-CXC-Chemokine, elicits a potent Thymus-dependent Antitumor Response in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178: 1057-65.

Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Changes in Epidemiology and Risk

Factors. *Blood* 2002; 100: 4358-66.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables that Affect Performance. *Journal of Infectious Diseases* 2004; 190: 641-9.

Matthiesson A. Allergic Bronchopulmonary Disease caused by Fungi other than *Aspergillus*. *Thorax* 1981; 36: 719.

McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an Opportunistic Human Pathogen. *Cellular microbiology* 2010a; 12: 1535-43.

McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F. NETs formed by Human Neutrophils inhibit Growth of the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection* 2010b; 12: 928-36.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A Human Homologue of the *Drosophila* Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature* 1997; 388: 394.

Meier A, Kirschning C, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced Activation of Murine Macrophages. *Cellular microbiology* 2003; 5: 561-70.

Meler E, Dunn M, Lecuyer M. A retrospective Study of Canine Persistent Nasal Disease: 80 Cases (1998–2003). *The Canadian Veterinary Journal* 2008; 49: 71.

Melin P, Schnürer J, Wagner E. Proteome Analysis of *Aspergillus nidulans* reveals Proteins associated with the Response to the Antibiotic Concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Molecular Genetics and Genomics* 2002; 267: 695-702.

Menz G, Virchow C. Röntgendiagnostik bei allergischer bronchopulmonaler Aspergillose unter Berücksichtigung der Computertomographie. *Atemweg Lungenkrankheiten* 1987; 13: 140-4.

Menz G, Hense G, Willer G (2003) Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA). © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Mezger M, Kneitz S, Wozniok I, Kurzai O, Einsele H, Loeffler J. Proinflammatory Response of Immature Human Dendritic Cells is mediated by Dectin-1 after Exposure to *Aspergillus fumigatus* Germ Tubes. *The Journal of infectious diseases* 2008a; 197: 924-31.

Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat M-R, Wienker TF, Ljungman P, Hebart H, Dornbusch HJ. Polymorphisms in the Chemokine (CXC motif) Ligand 10 are associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem-cell Transplantation and influence CXCL10 Expression in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Blood* 2008b; 111: 534-6.

Möller SA, Borrebaeck CA. A Filter Immuno-plaque Assay for the Detection of Antibody-secreting Cells in vitro. *Journal of immunological methods* 1985; 79: 195-204.

Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted Proteases from Pathogenic Fungi. *International Journal of Medical Microbiology* 2002; 292: 405-19.

Moser M, Cramer R, Menz G, Schneider T, Dudler T, Virchow C, Gmachl M, Blaser K, Suter M. Cloning and Expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* Allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I Skin Test Activity. *The Journal of Immunology* 1992; 149: 454-60.

Muntz F. Oxalate-producing Pulmonary Aspergillosis in an Alpaca. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 631-2.

Nanjappa SG, Klein BS. Vaccine Immunity against Fungal Infections. *Current opinion in immunology* 2014; 27.

Nascimento PA, Picheli FP, Lopes AM, Pereira JF, Santos-Ebinuma VC. Effects of Cholinium-based Ionic Liquids on *Aspergillus niger* Lipase: Stabilizers or Inhibitors. *Biotechnology progress* 2019; 35

Ni K, O'Neill H. The Role of Dendritic Cells in T cell Activation. *Immunology and cell biology* 1997; 75: 223-30.

Nierman WC, Pain A, Anderson MJ. Genomic Sequence of the Pathogenic and Allergenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005; 438(7071): 1151-6.

Nikolaizik W, Brueton M, Warner J. *Aspergillus* Allergy and Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis. *Pediatric Allergy and Immunology* 1991; 2: 83-6.

Noll S, Reyelt J, Rysiok T, Kellner R, Güssow D, Jäkel S, Hager S, Kranz H. Gezielte Optimierung von *Escherichia coli* BL21 (DE3). *BIOspektrum* 2013; 19: 211-3.

Nucci M, Carlesse F, Cappellano P, Varon AG, Seber A, Garnica M, Nouer SA, Colombo AL. Earlier Diagnosis of Invasive Fusariosis with *Aspergillus* Serum Galactomannan Testing. *PLoS ONE* 2014; 9: e87784.

O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard W, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman R. Human Blood contains two Subsets of Dendritic Cells, one immunologically Mature and the other Immature. *Immunology* 1994; 82: 487.

O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a Sexual Cycle in the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457: 471.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal Agents: Mechanisms of Action. *Trends in microbiology* 2003; 11: 272-9.

Offner F, Cordonnier C, Ljungman P, Prentice H, Engelhard D, De Bacquer D, Meunier F, De Pauw B. Impact of Previous Aspergillosis on the Outcome of Bone Marrow Transplantation. *Reviews of Infectious Diseases* 1998; 26: 1098-103.

Ohmori Y, Hamilton TA. A Macrophage LPS-inducible early Gene encodes the Murine Homologue of IP-10. *Biochemical and biophysical research communications* 1990; 168: 1261-7.

Oren I, Goldstein N. Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2002; 8: 195-200.

Ostrosky-Zeichner L. Invasive Mycoses: Diagnostic Challenges. *The American journal of medicine* 2012; 125: 14-24.

Palma AS, Feizi T, Zhang Y, Stoll MS, Lawson AM, Díaz-Rodríguez E, Campanero-Rhodes MA, Costa J, Gordon S, Brown GD. Ligands for the β -glucan Receptor, Dectin-1, assigned using "Designer" Microarrays of Oligosaccharide Probes (Neoglycolipids) generated from Glucan Polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 5771-9.

Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* species. *Clinical microbiology reviews* 2009; 22: 535-51.

Passweg J, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte R, Dufour C, Kuball J, Farge-Bancel D. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Europe 2014: More than 40 000 Transplants annually. *Bone marrow transplantation* 2016; 51: 786.

Patterson R, Greenberger PA, Radin RC, Roberts M. Allergic Bronchopulmonary

Aspergillosis: Staging as an Aid to Management. *Annals of Internal Medicine* 1982; 96: 286-91.

Pérez Pérez V, Corpa J, García Marín JF, Adúriz J, Jensen H. Generalized Aspergillosis in Dairy Sheep. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 1999; 46: 613-21.

Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, Capanni M, Urbani E, Mancusi A, Aversa F. Transferring Functional Immune Responses to Pathogens after Haploidentical Hematopoietic Transplantation. *Blood* 2005; 106: 4397-406.

Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of Invasive Aspergillosis using a Galactomannan Assay: A Meta-analysis. *Clinical infectious diseases* 2006; 42: 1417-727.

Pickett J, Moore C, Beehler B, Gendron-Fitzpatrick A, Dubielzig R. Bilateral Chorioretinitis Secondary to disseminated Aspergillosis in an Alpaca. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 187: 1241-3.

Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, Riva G, Forghieri F, Beauvais A, Beau R, Candoni A, Maertens J, Rossi G. Characterization of Specific Immune Responses to different *Aspergillus* Antigens during the Course of Invasive Aspergillosis in Hematologic Patients. *PLoS ONE* 2013; 8: e74326.

Puntenney SB, Wang Y, Forsberg NE (2003) *Mycotic Infections in Livestock: Recent Insights and Studies on Etiology, Diagnostics and Prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome*. Southwest Nutrition & Management Conference, Phoenix, University of Arizona, Department of Animal Science, Tuscon. 49-63

Ramirez-Garcia A, Pellon A, Buldain I, Antoran A, Arbizu-Delgado A, Guruceaga X, Rementeria A, Hernando FL. Proteomics as a Tool to identify New Targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the Context of Cystic fibrosis. *Mycopathologia* 2018; 183: 273-89.

Richard J, Dvorak T, Ross P. Natural Occurrence of Gliotoxin in Turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* 1996; 134: 167-70.

Rohde M, Schwienbacher M, Nikolaus T, Heesemann J, Ebel F. Detection of early Phase Specific Surface Appendages during Germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *FEMS microbiology letters* 2002; 206: 99-105.

Romani L. Immunity to Fungal Infections. *Nature reviews immunology* 2004; 4: 1 - 23.

Romani L, Puccetti P. Controlling Pathogenic Inflammation to Fungi. *Expert review of anti-infective therapy* 2007; 5: 1007-17.

Romani L. Cell mediated Immunity to Fungi: A Reassessment. *Sabouraudia* 2008; 46: 515-29.

Romani L. Immunity to Fungal Infections. *Nature reviews immunology* 2011; 11: 275.

Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris K. Clinical and Immunologic Criteria for the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Annals of Internal Medicine* 1977; 86: 405-14.

Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by Human Neutrophils is stimulated by a Unique Fungal Cell Wall Component. *Cell host & microbe* 2007; 2: 55-67.

Sarfati J, Jensen H, Latge J. Route of Infections in Bovine Aspergillosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1996; 34: 379-83.

Schaffner A, Douglas H, Braude A, Davis C. Killing of *Aspergillus* Spores depends on the Anatomical Source of the Macrophage. *Infection and immunity*

1983; 42: 1109-15.

Schlam D, Canton J, Carreño M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, Fairn GD. Gliotoxin suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate Homeostasis. *MBio* 2016; 7: e02242-15.

Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. 1998; 41: 89-91.

Schultz RM, Johnson EG, Wisner ER, Brown N, Byrne BA, Sykes JE. Clinicopathologic and Diagnostic imaging Characteristics of Systemic Aspergillosis in 30 Dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 2008; 22: 851-9.

Schwienbacher M, Weig M, Thies S, Regula JT, Heesemann J, Ebel F. Analysis of the Major Proteins secreted by the Human Opportunistic Pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro Conditions. *Sabouraudia* 2005; 43: 623-30.

Serrano-Gómez D, Domínguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbí AL. Dendritic Cell-specific intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing nonintegrin mediates Binding and Internalization of *Aspergillus fumigatus* Conidia by Dendritic Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 5635-43.

Severo L, Bohrer J, Geyer G, Ferreiro L. Invasive Aspergillosis in an Alpaca (*Lama pacos*). *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1989; 27: 193-5.

Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, De Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE. *Aspergillus* and Aspergilloses in Wild and Domestic Animals: A Global Health Concern with Parallels to Human Disease. *Medical mycology* 2015; 53: 765-97.

Seyedmousavi S, Bosco SdM, De Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, Jacobsen

ID, Jensen HE, Martel A, Mignon B. Fungal Infections in Animals: A Patchwork of Different Situations. *Medical mycology* 2018; 56: 165-87.

Sharman M, Mansfield C. Sinonasal Aspergillosis in Dogs: A Review. *Journal of Small Animal Practice* 2012; 53: 434-44.

Sharon H, Hagag S, Osherov N. Transcription Factor PrtT controls Expression of Multiple Secreted Proteases in the Human Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity* 2009; 77: 4051-60.

Sorrer ML. Comorbidities and Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes. *ASH Education Program Book* 2010; 2010: 237-47.

Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD. The beta-glucan Receptor Dectin-1 recognizes Specific Morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 2005; 1: e42.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137: 1142-62.

Strassburg A, J, Dalhoff K, F, Engelmann I, F (2010) *Infektionsdiagnostik in der Pneumologie*. © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

Sun YQ, Xu LP, Liu DH, Zhang XH, Chen YH, Chen H, Ji Y, Wang Y, Han W, Wang JZ. The Incidence and Risk Factors of Invasive Fungal Infection after Haploidentical Haematopoietic Stem Cell Transplantation without in vitro T-cell Depletion. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 997-1003.

Sweeney C, Habecker P. Pulmonary Aspergillosis in Horses: 29 Cases (1974-1997). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; 214: 808-11.

Tanguay S, Killion JJ. Direct Comparison of ELISPOT and ELISA-based Assays for Detection of Individual Cytokine-secreting Cells. *Lymphokine and cytokine research* 1994; 13: 259-63.

Tasker S, Knottenbelt C, Munro E, Stonehewer J, Simpson J, Mackin A. Aetiology and Diagnosis of Persistent Nasal Disease in the Dog: A Retrospective Study of 42 Cases. *Journal of Small Animal Practice* 1999; 40: 473-8.

Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant Human Interferon-inducible Protein 10 is a Chemoattractant for Human Monocytes and T Lymphocytes and promotes T cell Adhesion to Endothelial Cells. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 177: 1809-14.

Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A. Increased Levels of Recombinant Human Proteins with the Escherichia coli Strain Rosetta (DE3). *Protein expression and purification* 2010; 69: 159-67.

Tell LA. Aspergillosis in Mammals and Birds: Impact on Veterinary Medicine. *Medical mycology* 2005; 43: S71-S3.

Théry C, Amigorena S. The Cell Biology of Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Current opinion in immunology* 2001; 13: 45-51.

Thompson GR, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; 29: 103-10.

Thornton BP, Větvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the Sugar Specificity and Molecular Location of the beta-glucan-binding Lectin Site of Complement Receptor Type 3 (CD11b/CD18). *The Journal of Immunology* 1996; 156: 1235-46.

Traunmüller F, Popovic M, Konz K-H, Smolle-Jüttner F-M, Joukhadar C.

Efficacy and Safety of Current Drug Therapies for Invasive Aspergillosis. *Pharmacology* 2011; 88: 213-24.

Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara J-P. Adherence Mechanisms in Human Pathogenic Fungi. *Sabouraudia* 2008; 46: 749-72.

Tsikitis VL, Albina JE, Reichner JS. β -glucan affects Leukocyte Navigation in a Complex Chemotactic Gradient. *Surgery* 2004; 136: 384-9.

Tuon FF. A systematic Literature Review on the Diagnosis of Invasive Aspergillosis using Polymerase Chain Reaction (PCR) from Bronchoalveolar Lavage Clinical Samples. *Revista iberoamericana de micologia* 2007; 24: 89.

Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 2009; 5: e1000639.

Van Der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, Rijnders BJ, Kuijper EJ, Van Tiel FH, Varga J. Aspergillosis due to Voriconazole highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates from Domiciles. *Clinical infectious diseases* 2013; 57: 513-20.

Vaughan L. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Clinical pharmacy* 1993; 12: 24-33.

Wald A, Leisenring W, van Burik J-A, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* Infections in a large Cohort of Patients undergoing Bone Marrow Transplantation. *The Journal of infectious diseases* 1997; 175: 1459-66.

Walsh T, Anaissie E, Denning D, Herbrecht R, Kontoyiannis D, Marr K,

Morrison V, Segal B, Steinbach W, Stevens D. Infectious Diseases Society of America. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327-60.

Wang J, Warris A, Ellingsen E, Jørgensen P, Flo T, Espevik T, Solberg R, Verweij P, Aasen A. Involvement of CD14 and Toll-like Receptors in Activation of Human Monocytes by *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *Infection and immunity* 2001; 69: 2402-6.

Wasylnka JA, Moore MM. *Aspergillus fumigatus* Conidia Survive and Germinate in Acidic Organelles of A549 Epithelial Cells. *Journal of cell science* 2003; 116: 1579-87.

Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the Chaperoning of Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5: 761.

Wiedemann A (2017) Neue Ansätze für die Diagnostik und die Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen (Doktorarbeit). Ludwig-Maximilians-Universität, München

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human Aflatoxicosis in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, potential Health Consequences and Interventions. *The American journal of clinical nutrition* 2004; 80: 1106-22.

Williams R. CCR6 and CCL20: Partners in Intestinal Immunity and Lymphorganogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1072: 52-61.

Wüthrich M, Filutowicz HI, Warner T, Deepe GS, Klein BS. Vaccine Immunity to Pathogenic Fungi overcomes the Requirement for CD4 Help in Exogenous Antigen Presentation to CD8+ T cells: Implications for Vaccine Development in Immune-deficient Hosts. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197: 1405-16.

Wüthrich M, Deepe Jr GS, Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. Annual review of immunology 2012; 30: 115-48.

Xavier MO, Soares MP, Meinerz ARM, Nobre MO, Osório LG, Silva Filho RPd, Meireles MCA. Aspergillosis: A Limiting Factor during Recovery of Captive Magellanic Penguins. Brazilian Journal of Microbiology 2007; 38: 480-4.

Yokota K, Shimada H, Kamaguchi A, Sakaguchi O. Studies on the Toxin of *Aspergillus fumigatus*: VII. Purification and Some Properties of Hemolytic Toxin (Asp-Hemolysin) from Culture Filtrates and Mycelia. Microbiology and immunology 1977; 21: 11-22.

Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, Belladonna ML, Vacca C, Conte C, Mosci P. IL-23 and the Th17 Pathway Promote Inflammation and Impair Antifungal Immune Resistance. European journal of immunology 2007; 37: 2695-706.

Zhang S, Corapi W, Quist E, Griffin S, Zhang M. *Aspergillus versicolor*, a New Causative Agent of Canine Disseminated Aspergillosis. Journal of clinical microbiology 2012; 50: 187-91.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new Classification System and their Role in Immunity. Immunity 2000; 12: 121-7.

Zmeili OS, Soubani A. Pulmonary Aspergillosis: A Clinical Update. Journal of the Association of Physicians 2007; 100: 317-34.

IX. DANKSAGUNG

Mein allergrößter Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer, Prof. Dr. Frank Ebel, der stets ein offenes Ohr für die kleineren und größeren Probleme im Laboralltag hatte und die herausragende Betreuung während der Promotion. Ohne deine Unterstützung hätte ich es nie geschafft und ich möchte mich ganz herzlich bei dir für deine unendliche Geduld, deine Bemühungen und dein Vertrauen bedanken!

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Straubinger für die nette Aufnahme in seinem Lehrstuhl bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen Astrid Thomas und Christoph Kleinemeier bedanken, die mir sowohl im Büro als auch im Labor stets zur Hilfe waren.

Meinen lieben Kolleginnen Anna und Bella möchte ich für die schöne Zeit danken und dafür, dass ihr immer mit Rat zur Seite standet. Egal ob während der Arbeit oder in den Pausen, ohne euch wäre es nicht das Gleiche gewesen und ich werde immer gerne an die Zeit mit euch zurückdenken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung der letzten Jahre! Ohne euch wäre vor allem die letzte Zeit unvorstellbar gewesen und ich weiß nicht, was ich ohne euch gemacht hätte. Ihr seid einfach die Besten!