

Untersuchung der Adaptation des humanpathogenen Schimmelpilzes
Aspergillus fumigatus an Stress:
Die funktionelle Charakterisierung eines CipC-homologen Proteins



DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Bettina Bauer
aus
München

August 2010

angefertigt
am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchung der Adaptation des humanpathogenen Schimmelpilzes
Aspergillus fumigatus an Stress:
Die funktionelle Charakterisierung eines CipC-homologen Proteins

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Bettina Bauer

Dekan:	Prof. Dr. Benedikt Grothe
1. Gutachter:	Prof. Dr. Heinrich Jung
2. Gutachter:	Prof. Dr. Thorsten Mascher
Sondergutachter:	PD Dr. Frank Ebel

Dissertation eingereicht am: 24.08.2010
Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2011

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den

Bettina Bauer

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Taubitz A., Bauer B., Heesemann J., Ebel F. (2007). Role of Respiration in the Germination Process of the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Microbiol.*, 54(5): 354-60.

Taubitz A. und Bauer B. contributed equally

Bauer B., Schwienbacher M., Israel L., Heesemann J., Ebel F. (2010). Characterization of the CipC- like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*, 53(4): 296-304.

Tagungsbeiträge

Statusworkshop der Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Februar, 2006 in München

Vortrag: Die Rolle der Atmung während der Auskeimung von *Aspergillus fumigatus*

2nd *Advances Against Aspergillosis*, 22.-25.02. 2006 in Athen

Poster: The role of respiration in the germination process of *Aspergillus fumigatus*

58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),

1.-4.10.2006 in Würzburg

Poster: Generation and characterization of monoclonal antibodies against the CipC protein of the human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*

1st Meeting: "Biology of Yeasts and filamentous fungi", 12.-14.10.06 in Frankfurt

Poster: Studies on the CipC protein of the human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* – a protein of unknown function which might be involved in virulence

Statusworkshop der Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 23.-24.02.2007 in Stuttgart

Vortrag: The CipC protein of *Aspergillus fumigatus*

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 30.9.-4.10.2007 in Göttingen

Poster: CipC – an enigmatic fungal protein

1st Life-Science PhD Symposium, 7.12.2007 in München

Poster: CipC – a fungal protein with unknown function

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 21.-24.09.2008 in Dresden

Vortrag: Characterization of a major hyphal protein of the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus* that shows a striking regulation of expression by nitrogen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
A. Einleitung.....	1
1. <i>Aspergillus fumigatus</i> – ein filamentöser Pilz.....	1
2. Lebenszyklus und Morphologie von <i>A. fumigatus</i>	2
3. Klinische Bedeutung von <i>A. fumigatus</i>	3
4. Von <i>A. fumigatus</i> verursachte Krankheiten.....	4
5. Diagnose und Therapie:.....	5
6. Immunreaktion in Antwort auf <i>A. fumigatus</i>	7
7. Virulenz in <i>A. fumigatus</i> ist vielschichtig.....	8
7.1 Das CipC-Protein – ein möglicher virulenzassoziierter Faktor?.....	10
7.2 Die MnSODs von <i>A. fumigatus</i> – mögliche virulenzassoziierte Faktoren?.....	11
8. Zielsetzung der Arbeit.....	12
B. Material und Methoden.....	13
1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide.....	13
2. Zellanzucht.....	17
2.1 Medien.....	17
2.2 Anzucht und Ernte von <i>E. coli</i>	20
2.3 Anzucht und Ernte von <i>A. fumigatus</i>	21
2.4 Anzucht und Kryokonservierung der Zelllinien.....	21
2.5 Wachstumsversuche mit <i>A. fumigatus</i>	22
3. Molekularbiologische und genetische Methoden.....	23
3.1 Amplifizierung von DNS-Fragmenten.....	23
3.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	24
3.3 Isolierung von genomischer DNS aus <i>A. fumigatus</i>	24
3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen.....	25
3.5 Konzentrieren von DNS-Lösungen.....	25

3.6	Agarosegelelektrophorese.....	25
3.7	DNS-Extraktion aus Agarosegelen.....	26
3.8	Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren.....	26
3.9	Transformation von <i>E. coli</i>	27
3.10	Transformation von <i>A. fumigatus</i>	28
3.11	Southern-Blot.....	30
3.12	Sequenzierungen.....	32
4.	Biochemische Methoden.....	32
4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	32
4.2	Fällung von Proteinen.....	33
4.3	Denaturierende Reinigung von Proteinen mit His-Tag.....	33
4.4	Proteinbestimmung.....	33
4.5	Crosslinking.....	34
4.6	Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie).....	34
4.7	Differentielle Zentrifugation von Hyphenproteinextrakten.....	34
4.8	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gel).....	35
4.9	Messung des Sauerstoffverbrauchs von <i>A. fumigatus</i> -Kulturen.....	35
5.	Immunologische Methoden.....	36
5.1	Western-Blot.....	36
5.2	Nachweis von Proteinen mittels ELISA (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>).....	37
5.3	Durchflußzytometrie.....	38
6.	Zellbiologische Methoden.....	38
6.1	Generierung von Hybridomzelllinien zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern	38
6.2	Mikroskopische Untersuchungen.....	41
7.	Bioinformatische Methoden.....	43
8.	Chemikalien, Enzyme und Antikörper.....	43
C.	Ergebnisse.....	44

1.	Das zu CipC homologe Protein aus <i>A. fumigatus</i>	44
1.1	Sequenzanalysen.....	44
1.2	Untersuchungen zur Bildung des CipC-ähnlichen Proteins in <i>A. fumigatus</i>	46
1.3	Untersuchungen zur Bildung und Lokalisation von NrpA in <i>A. fumigatus</i> mit Reporterstämmen.....	72
1.4	Herstellung und Charakterisierung einer <i>A. fumigatus nrpA</i> -Deletions-mutante.....	85
1.5	Die Rolle des NrpA-Proteins während der Virulenz von <i>A. fumigatus</i>	94
2.	Identifizierung der mitochondrialen MnSOD von <i>A. fumigatus</i>	98
2.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die putative mitochondriale MnSOD	98
2.2	Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD	100
2.3	Immunblots von <i>A. fumigatus</i> -Proteinextrakten mit Antikörpern gegen die mitochondriale MnSOD und Asp6f	102
2.4	Expressionsprofil der mitochondrialen MnSOD im Vergleich zu Asp6f	103
2.5	Die mitochondriale MnSOD liegt möglicherweise als Dimer vor	104
2.6	Expression der putativen mitochondrialen MnSOD im Zeitverlauf.....	105
2.7	Expression der putativen mitochondrialen MnSOD in Abhängigkeit der Animpfdichte	106
2.8	Bildung der mitochondrialen MnSOD und Asp6f in Anwesenheit von oxidativem Stress.....	107
3.	Untersuchungen zum anaeroben Wachstum von <i>A. fumigatus</i>	109
3.1	Rolle der Atmung während der Auskeimung.....	109
3.2	Sporen können unter einem Deckgläschen auch im anaeroben Topf auskeimen	113
D.	Diskussion	114
1.	Das NrpA-Protein aus <i>A. fumigatus</i>	114
1.1	NrpA, ein hyphenspezifisches Protein	114
1.2	Grundlegende Erkenntnisse zur NrpA-Bildung	115
1.3	NrpA wird in Abhängigkeit der N-Quelle gebildet.....	116
1.4	NrpA als stressinduziertes Protein.....	120

1.5	Charakterisierung des Phänotyps einer <i>A. fumigatus</i> - Δ <i>nrpA</i> -Mutante.....	123
1.6	Die Rolle von NrpA während der Virulenz.....	125
1.7	Ausblick.....	126
2.	Die putative mitochondriale MnSOD aus <i>A. fumigatus</i>	127
3.	Die Rolle der Atmung während der Auskeimung.....	135
	Zusammenfassung.....	140
	Literaturverzeichnis	143
	Anhang.....	153
	Lebenslauf.....	155
	Danksagung.....	156

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimalmedium
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Carb	Carbpenicillin
Chp	CipC homologes Protein
CipC	Concanamycin A induziertes Protein C
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
dest.	destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
Mb	Megabasen
MOI	„multiplicity of infection“; Anzahl der Bakterien/Viren pro Wirtszelle
NrpA	<i>Nitrogen regulated Protein A</i>
N-Terminus	aminoterminaler Teil eines Proteins
N-Quelle	Stickstoff-Quelle
OD ₅₅₀	optische Dichte bei Wellenlänge 550 nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rotation pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	und andere
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
(x)g	x-faches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	Mol pro Liter
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt

A. Einleitung

1. *Aspergillus fumigatus* – ein filamentöser Pilz

Die Art *Aspergillus fumigatus* wurde 1863 erstmalig von dem deutschen Arzt und Botaniker Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben (Fresenius, 1863). *Fumigatus* leitet sich von dem lateinischen Wort *fumus* ab und bedeutet Rauch. Dies ist wohl als Anlehnung an die Tatsache zu sehen, dass große Mengen der grau-grünen Konidien, wenn sie von der Luft aufgewirbelt werden, wie eine Rauchwolke aussehen. Die Gattung *Aspergillus* wurde schon früher, nämlich 1729, durch den italienischen Gärtner und Botaniker Pietro Antonio Micheli geschaffen. Er wurde durch die Gestalt der Sporenträger dieser Gattung an ein Aspergill (Weihwasserwedel) erinnert und benannte sie deshalb danach. Heute wird diese Gattung oft, auch anhand der Form der Sporenträger, als Gießkannenschimmel bezeichnet. Die Gattung *Aspergillus* umfasst etwa 200 Arten, von denen 40 als pathogen eingestuft werden (Klich, 2006). Bis vor kurzem wurde *A. fumigatus* zu der künstlichen systematischen Klasse der Deuteromycota (*fungi imperfecti*) gezählt. In dieser Klasse sind Pilze zusammengefasst von denen bisher nur eine vegetative Vermehrung über mitotische Sporen bekannt ist. Erst im Januar 2009 wurde die Entdeckung der sexuellen Reproduktion von *A. fumigatus* veröffentlicht (O’Gorman *et al.*, 2009), obwohl schon seit längerem bekannt war, dass dieser Pilz alle dafür nötigen Gene besitzt (Grosse und Krappmann, 2008). Nun kann *A. fumigatus* in seine natürliche Klasse, die Ascomycota gestellt werden. Das Genom von *A. fumigatus* Stamm 293 ist 29,4 Mb groß und auf 8 Chromosomen verteilt. Insgesamt wurden 9926 potentielle Gene identifiziert. Bei 77% der Gene sind die kodierenden Bereiche durch Introns unterbrochen (Niermann *et al.*, 2005).

Die meisten Pilze sind obligat aerob oder fakultativ aerob. Generell wird davon ausgegangen, dass die Anwesenheit von Sauerstoff für die Auskeimung von Sporen essentiell ist (Carlile *et al.* 2001). Wie schon erwähnt gilt auch *A. fumigatus* als obligat aerober Organismus. In seinen natürlichen Habitaten, wie zum Beispiel der Erde, aber auch im menschlichen Organismus können durchaus auch sauerstofflimitierende Bedingungen auftreten, an die sich der Pilz möglicherweise angepasst haben könnte. Es wäre also für einen solchen Organismus von großem Vorteil, auch in Umgebungen mit geringen Sauerstoffkonzentrationen oder mit Sauerstoffmangel zu überleben oder wachsen zu können. Solche Anpassungen sind bei filamentösen Pilzen bereits beschrieben worden. *Aspergillus nidulans* und *Fusarium oxysporum* verfügen z. B. über die Fähigkeit, in anaeroben Umgebungen Ammonium zu fermentieren (Takasaki *et al.*, 2004). Bisher ist allerdings nicht bekannt, ob auch *A. fumigatus* über solche Fähigkeiten verfügt. Als thermotole-

ranter Organismus erfolgt das Wachstum von *A. fumigatus* über ein breites Temperaturspektrum. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 37° C, aber auch bei Temperaturen zwischen 30-45° C ist noch gutes Wachstum zu beobachten. Die maximale Wachstumstemperatur beträgt 52° C, aber der Pilz kann Temperaturen bis zu 70° C überleben (Raper und Fenell, 1965; Kozakiewicz und Smith, 1994). Die Lebensweise von *A. fumigatus* ist saprophytisch und damit chemoorganotroph. Durch ein breites Arsenal von Enzymen und Proteasen kann dieser Pilz nahezu alle Bestandteile von organischem Abfall zersetzen und als Nährstoffquelle nutzen. Als Beispiele können Zucker, Fettsäuren, Proteine, Zellulose, Pektin und Xylan genannt werden (Fogarty, 1994). Diese metabolischen Fähigkeiten bedingen die nahezu ubiquitäre Verbreitung des Pilzes und seine wichtige Rolle im globalen C- und N-Kreislauf.

2. Lebenszyklus und Morphologie von *A. fumigatus*

Viele Pilze können, sobald das Myzel Kontakt zur Luft hat, mitotische Sporen generieren, die auch als Konidien bezeichnet werden. Sie dienen als Verbreitungseinheit und stellen andererseits sicher, dass der Pilz auch widrige Lebensumstände überdauern kann. In den Konidien werden große Mengen des kompatiblen Soluts Trehalose eingelagert, welches für ein Langzeitüberleben der Sporen notwendig ist. Mutanten, die nicht fähig sind Trehalose in ihre Sporen einzulagern, generieren Konidien, die nicht lange lebensfähig sind und zudem äußerst empfindlich auf Hitze und oxidativen Stress reagieren (Ni und Yu, 2007). Die Konidien von *A. fumigatus* haben etwa einen Durchmesser von 2-3 µm und werden durch die Luft verbreitet. Ihre Oberfläche ist von einer hydrophoben Hülle, der sogenannten „Rodlet-layer“ umgeben. Diese Struktur wird von den beiden Hydrophobinen RodA und RodB gebildet und verleiht den Sporen wohl auch Schutz gegen die Erkennung durch Makrophagen, da eine Mutante ohne Hydrophobine von diesen besser phagozytiert wird (Paris *et al.*, 2003). Durch eine Pigmentierung mit Melanin erhalten die Sporen ihre charakteristische grün-braune Färbung. Die Germination von Konidien ist bis heute noch nicht wirklich verstanden. Allerdings scheint klar, dass es ein Prozess ist, der von vielen Rezeptoren und Signalwegen kontrolliert wird. Zunächst wird von der Spore wahrgenommen, dass bestimmte Nährstoffe wie Zucker, Aminosäuren und Salze vorhanden sind. Dabei ist es von Pilz zu Pilz unterschiedlich, welche Anforderungen gestellt werden. So keimt etwa *Neurospora crassa* in Anwesenheit von Salzen und einer C-Quelle aus (Schmit und Brody, 1976), während hingegen *A. nidulans* nur das Vorhandensein von Glukose benötigt (Osherov und May, 2000). Ist die Auskeimung ausgelöst, kommt es zuerst zum Anschwellen der Konidien. Dabei wird die Zellwand umorganisiert und die Oberflächenbeschaffenheit verändert (Griffin, 1994). Dies führt

zu einem höheren Aggregationsverhalten der auskeimenden Sporen. Nun bildet sich ein Keimschlauch und die Hyphe beginnt durch Verlängerung des terminalen Bereichs zu wachsen. Pilzhyphe sind normalerweise zönotisch, das heißt, dass jede Zelle mehr als einen Kern enthält. Dadurch, dass sich die einzelnen Hyphe verzweigen, entsteht ein Hyphengeflecht, das als Myzel bezeichnet wird. Die Hyphe sind durch Septen kompartmentiert. Diese Septen enthalten aber Poren, so dass ein Cytoplasmaaustausch innerhalb der Hyphe stattfinden kann. Die älteren Hyphe bilden Vakuolen und enthalten nur noch wenig Cytoplasma (Madigan *et al.*, 2001). Die Zellwand der Hyphe besteht hauptsächlich aus den Polysacchariden (1-3)- β -D-Glukan, (1-6)- β -D-Glukan, Galaktomanan und Chitin (Bernard und Latge, 2001; Latge, 2007). Hat sich ein dichtes Myzel gebildet, das nun in Kontakt zur Luft steht, beginnt die Sporulation. Dabei bildet sich aus einer Fußzelle ein Konidophor, an dessen Ende das Konidophorenvesikel entsteht. Auf dieser Struktur sitzen die Konidien bildenden Phialiden auf. Dabei handelt es sich um längliche Ausstülpungen, die die grün-grauen Konidien basipetal in langen Ketten abschnüren (Raper und Fenell, 1965). Die neuen Sporen können leicht durch den Wind verbreitet werden. Sobald sie auf geeignete Nährstoffe treffen, beginnt ein neuer Lebenszyklus.

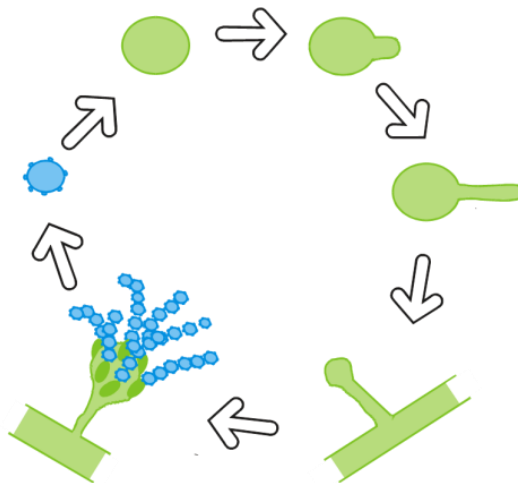


Abb. 1: Lebenszyklus von *A. fumigatus*

Trifft eine ruhende Spore (in blau dargestellt) auf geeignete Nährstoffe, beginnt sie zunächst anzuschwellen und schließlich auszukeimen. Viele Hyphe bilden ein dichtes Geflecht, das Myzel genannt wird. Aus speziellen Fußzellen bilden sich Konidophorenvesikel. Auf diesen sitzen sogenannte Phialiden, die die neuen Sporen abschnüren.

3. Klinische Bedeutung von *A. fumigatus*

Die ubiquitäre Verbreitung der Sporen führt dazu, dass jeder Mensch täglich mehrere hundert Konidien einatmet (Latge, 1999). Normalerweise hat dies keine Auswirkung, da die Sporen

durch das angeborene Immunsystem eliminiert werden. Probleme ergeben sich erst, wenn das Immunsystem zu stark oder zu schwach ist (Hohl und Feldmesser, 2007). Eine allergische Disposition kann, bei Kontakt mit einem der 29 identifizierten Aspergillus-Allergenen (Cramer *et al.*, 2006) zu einer überschießenden Immunreaktion führen. Bei immungeschwächten Patienten stellt *A. fumigatus* ein großes Problem dar und ist in dieser Patientengruppe der häufigste Auslöser einer invasiven Pilzkrankung mit hohen Mortalitätsraten. Die klinische Relevanz von *A. fumigatus* hat sich in den letzten Jahrzehnten ständig gesteigert. Dies ist mit einem Anstieg der Risikopatientengruppe zu erklären. Denn es gibt heute einerseits mehr Patienten, deren Immunsystem durch eine Erkrankung (z. B. AIDS) geschwächt ist. Zum anderen wird heute aber auch bei vielen Erkrankungen und medizinischen Eingriffen das Immunsystem künstlich supprimiert, etwa bei Organtransplantationen, Immunsuppressionsverfahren, Autoimmunerkrankungen oder neuen, intensiven Chemotherapieverfahren, die bei unterschiedlichen Krebserkrankungen wie Tumore, Lymphome, Myelome und Leukämien eingesetzt werden (Denning, 1998).

4. Von *A. fumigatus* verursachte Krankheiten

Die von *A. fumigatus* verursachten Erkrankungen lassen sich in zwei Gruppen untergliedern: Zum einen in die rein allergischen Erkrankungen wie das allergische bronchiale Asthma. Zum anderen gibt es Erkrankungen, die mit einer Kolonisierung des Wirts einhergehen. Diese Kolonisierungen können entweder nicht invasiv sein, wie bei der allergisch-bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) und dem Aspergillom, oder sie können invasiv sein wie bei der invasiven pulmonalen Aspergillose und bei extrapulmonalen Kolonisierungen. Für die mögliche Manifestation einer pulmonalen Erkrankung nach dem Einatmen von Konidien ist der vorherige Gesundheitsstatus des Menschen ausschlaggebend (siehe Abb. 2). So wird ein gesunder Mensch keine Folgeerkrankung davontragen, während ein Patient, der zuvor an einer höhlenbildenden Lungenerkrankung (wie der Tuberkulose) gelitten hat, Gefahr läuft, ein pulmonales Aspergillom zu bekommen. Von einer invasiven Aspergillose sind außer in Ausnahmefällen nur Patienten mit einer starken Immunsuppression betroffen. Dabei kann sich die Erkrankung in der Lunge, in der Nase oder in seltenen Fällen auf der Haut etablieren. Die gefährlichste und schwerwiegendste Erkrankung dieser Art ist die pulmonale Aspergillose. An ABPA erkranken fast ausschließlich Patienten mit Asthma oder Cystischer Fibrose. Bei einem geringen Prozentsatz dieser Patientengruppe kommt es zu einer Besiedelung der Bronchien durch *A. fumigatus*. Die Erkrankung selbst stellt eine Hypersensitivitätsreaktion auf Aspergillus-Antigene dar. Durch unspezifische Abwehrreaktionen wird das Lungengewebe zerstört, was ohne Behandlung zu einem Funktions-

verlust dieses Organs führen kann (Kumar *et al.*, 2003). Das Aspergillom bezeichnet eine nicht invasive Pilzbesiedelung von bereits bestehenden, krankheitsbedingten Hohlräumen der Lunge. Solche sogenannten Kavernen können z. B. Überreste einer ausgeheilten Tuberkuloseinfektion sein. Nicht invasiv bedeutet in diesem Fall, dass normalerweise das gesunde, die Höhle umgebende Lungengewebe nicht durch den Pilz infiltriert wird.

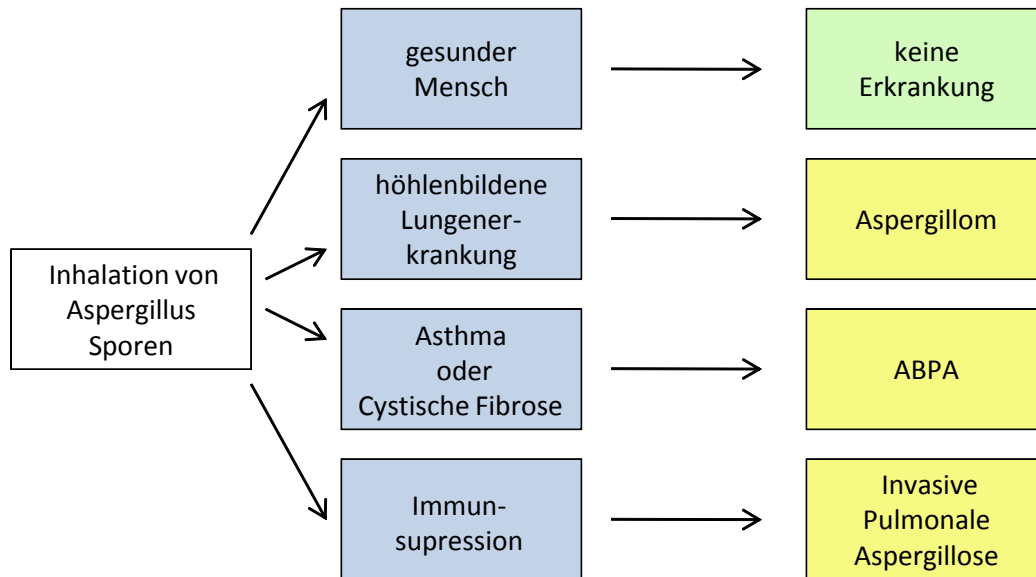


Abb. 2: Mögliche menschliche Erkrankungen nach dem Einatmen von *A. fumigatus*-Sporen.

Der vorherige Gesundheitszustand des Menschen entscheidet darüber, ob und welche Erkrankung entwickelt wird (modifiziert nach Kumar *et al.*, 2003).

5. Diagnose und Therapie:

Bis heute ist die Sterblichkeitsrate von Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose hoch. Dies hängt mit immensen Problemen bei der Diagnose und der Therapie zusammen. Dabei ist es für einen Therapieerfolg ungemein wichtig, dass die Diagnose möglichst rasch gestellt wird. Der Nachweis einer invasiven Aspergillose bereitet erhebliche Schwierigkeiten und basiert meist auf mehreren Untersuchungen. Die Kultivierung von *A. fumigatus* aus Sputum von Patienten ist als Diagnose nicht ausreichend, da man Kontaminationen nicht ausschließen kann. Das gleiche gilt für einen mikroskopischen Nachweis des Pilzes aus Sputum. Am sichersten ist bis heute die histologische Untersuchung von Lungengewebe. Da die betroffenen Patienten aber in der Regel massive Störungen im Gerinnungssystem haben, sind diese Biopsien nicht ungefährlich und bedürfen vorheriger Hinweise, etwa ein auffälliges CT. Obwohl verbesserte CT-Technologien die Erkennung von charakteristischen Merkmalen einer invasiven Pilzerkrankung stark verbessert

haben, bleibt diese Methode ungeeignet um eine eindeutige Diagnose zu stellen. Da auch andere filamentöse Pilze, *Pseudomonas aeruginosa* und *Nocardia* Spezies zu ähnlichen Auffälligkeiten führen können. (Greene *et al.*, 2007) Die Möglichkeit das Aspergillus-Antigen Galaktomannan aus Blut oder Serum von Patienten nachzuweisen, hat die Diagnostik in den letzten Jahren vereinfacht. Dieses Antigen kann im Patienten sehr bald nach einer Infektion mit *A. fumigatus* nachgewiesen werden und hilft somit, eine schnellere Diagnose zu etablieren. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen *Sandwich*-ELISA. Aber auch diese Methode liefert teilweise falsch positive Ergebnisse. Dies ist zum einen auf eine vorherige Behandlung mit bestimmten Antibiotika (Pipercillin-Tazobactam und Amoxicillin-Clavulansäure) und zum anderen auf eine Kolonisierung mit einem anderen Pilz, der das gleiche Antigen besitzt, zurückzuführen. (Viscolli *et al.*, 2004; Mennink-Kersten *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2008). Ein zweiter leicht im Blut oder Serum nachzuweisender Marker für eine Aspergillus-Infektion ist das (1-3)- β -D-Glukan. Auch zu dessen Nachweis steht ein kommerziell erhältlicher Test zur Verfügung, der auf dem Limulus-Assay basiert. Da (1-3)- β -D-Glukan ein Bestandteil der Zellwand von mehreren humanpathogenen Pilzen ist, erlaubt dieser Test nur die Diagnose einer vorhandenen Mykose (Pickering *et al.*, 2005). Auch die PCR-basierte Diagnose, bei der Aspergillus-spezifische Gene (oftmals Gene der ribosomalen DNA) amplifiziert werden, zeigt vielversprechende Ergebnisse. Allerdings wurde diese Methode noch nicht standardisiert und das System ist auch nicht kommerziell erhältlich (Donnelly, 2006). Zur Behandlung einer bestehenden Aspergillose stehen verschiedene Antimykotika zur Verfügung, von denen im folgendem nur wenige erwähnt werden. Bis vor wenigen Jahren war Amphotericin B das am häufigsten verwendete Medikament gegen Aspergillus-Infektionen. Es handelt sich um ein Polyen-Makrolakton, das Wechselwirkungen mit Ergosterin, einem Bestandteil der Pilzmembran, eingeht. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der Zellwand, was die fungiziden Eigenschaften erklärt. Die Nachteile an diesem Medikament liegen allerdings in den starken Nebenwirkungen, die auf einer Wechselwirkung mit den Sterolen der humanen Zellwand zurückgehen und der geringen Erfolgsrate der Behandlung. Inzwischen gilt das Azol Voriconazol als bessere Wahl bei der Behandlung, denn es ist zum einen wirksamer (Herbrecht, *et al.*, 2002) und zum anderen führt es zu weniger ausgeprägten Nebenwirkungen. Voriconazol blockiert die Cytochrom P450 vermittelte Ergosterinbiosynthese, was schließlich zu Membrandefekten des Pilzes führt. Als letztes sei das Echinocandin Caspofungin genannt. Es hemmt die (1-3)- β -D-Glukan-Synthese und führt damit zur Schwächung der Pilzzellwand. Obwohl mehrere Stoffklassen zur Behandlung eingesetzt werden können, bleibt die Situation unbefriedigend. Viele Patienten mit invasiver Aspergillose versterben trotz Therapie. Außerdem sind die Nebenwirkungen der Medikamente teilweise erheblich.

6. Immunreaktion in Antwort auf *A. fumigatus*

In immunkompetenten Menschen kommt es normalerweise nach einer Exposition mit *A. fumigatus* zu keiner Erkrankung, da die in den Organismus eingedrungenen Sporen sehr effektiv durch das angeborene und das erworbene Immunsystem eliminiert werden. Die meisten der eingeatmeten Konidien werden durch das bronchiale Flimmerepithel wieder aus dem Bronchialtrakt heraus befördert. Einige der von *A. fumigatus* sezernierten Toxine wie z. B. das Gliotoxin können die Bewegung des Flimmerepithels hemmen (Amitani *et al.*, 1995). Die Sporen, die diese erste physikalische Barriere überwinden, gelangen auf Grund ihrer geringen Größe bis in die Alveolen der Lunge. Dort binden lösliche Rezeptoren wie Pentraxin-3 und das „lung surfactant protein D“ an die Oberfläche der Konidien und stimulieren dadurch ihre Aufnahme durch Makrophagen und Dendritische Zellen (Garlanda *et al.*, 2002). Die ruhenden Sporen werden durch das Immunsystem nicht so gut erkannt wie angeschwollene Sporen, da es beim Anschwellen zu einer Veränderung der Oberfläche kommt. Diese führt dazu, dass bestimmte Zielstrukturen der eigentlich an Glykokonjugaten reichen Zellwand auf der Oberfläche freigelegt werden (Hohl und Feldmesser, 2007). Die alveolaren Makrophagen stellen die erste Verteidigungslinie gegen die Sporen dar. Die Bindung und Phagozytose der Konidien wird durch eine Reihe von Rezeptoren vermittelt (Kan und Bennett 1988; Kan und Bennett 1991; Bozza *et al.*, 2002; Persat *et al.*, 2003). Die Immunantwort des Wirts wird durch Transmembranrezeptoren, die interne Signalkaskaden weiterleiten, aktiviert. Diese sogenannten „*Pattern recognition receptors*“ erkennen bestimmte Zielstrukturen (PAMPS), auf der Sporenoberfläche und vermitteln die Phagozytose des Eindringlings. Konidien von *A. fumigatus* interagieren dabei hauptsächlich mit den beiden Toll-like-Rezeptoren TLR-2 und 4 (Meier *et al.*, 2003). Diese leiten beide ihr Signal durch eine Signaltransduktionskette weiter. Dadurch kommt es zur Produktion und Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen, die zur Anlockung von Neutrophilen führen (Hohl und Feldmesser, 2007). Aber auch über den Rezeptor Dectin-1 kann eine Immunantwort ausgelöst werden. Dieser Rezeptor scheint eng mit TLR-2 zusammenzuarbeiten und erkennt β -Glukane auf der Zellwand von vielen humanpathogenen Pilzen. Er verursacht letztendlich auch die Ausschüttung von Chemokinen und ROIs. Da β -Glukane auf ruhenden Sporen kaum zu finden sind (Hohl *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2005; Gersuk *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007), ignoriert Dectin-1 ruhende Sporen und reagiert hauptsächlich auf angeschwollene Sporen und Keimlinge. Damit sorgt dieser Rezeptor für die Eliminierung einer direkten invasiven Gefahr (Hohl und Feldmesser, 2007). Die von Makrophagen phagozytierten Sporen schwellen dann innerhalb des Phagosoms an. Auch hier scheint die Freilegung der β -Glukane auf der Sporenoberfläche für die von der NADPH-Oxidase abhängige Tötung der Sporen nötig zu sein (Philippe *et al.*, 2003, Marr *et al.* 2003). Phagosomen, die Konidien enthalten, fusionieren mit Lysosomen und reifen da-

durch zu Phagolysosomen. Die Ansäuerung dieser Vakuolen und die Freisetzung zahlreicher antimikrobieller Substanzen führt schließlich zum Abtöten der Sporen (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Experimentelle Daten legen nahe, dass während der Infektion etwa 24 h nach der Phagozytose etwa 90% der Konidien von den Makrophagen abgetötet wurden. Die restlichen 10% überleben und keimen aus. Die sich so bildenden Hyphen können nur durch angelockte polykernige Neutrophile abgetötet werden, da sie aufgrund ihrer Größe von Makrophagen nicht mehr phagozytiert werden können (Latge, 1999; Duong *et al.*, 1998; Romani, 2004). Dafür binden sie an die Oberfläche der Hyphen, durch die Sekretion von „reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)“ werden die Hyphen schnell zerstört (Latge, 1999). Ruhende Sporen werden von den Neutrophilen nur langsam aufgenommen und sind gegenüber den ROS sehr widerstandsfähig. Die Antwort der Neutrophilen verstärkt sich, sobald die Konidien begonnen haben anzuschwellen. In diesem Zustand können sie von den Neutrophilen auch eliminiert werden (Latge, 1999). Auch dendritische Zellen können Konidien und Hyphen phagozytieren und transportieren diese dann zu den mediastinalen Lymphknoten. Dort aktivieren sie eine Pilz-spezifische adaptive Immunantwort (Bozza *et al.*, 2002). In gesunden Individuen findet eine adaptive T-Zellantwort in Antwort auf Aspergillus-Antigene hauptsächlich in der CD4+ T-Zell Fraktion statt. Mäusen, denen funktionelle T- und B-Zellen fehlen, waren in Versuchen nicht empfänglicher für invasive Aspergillosen als Wildtyp-Mäuse (Williams *et al.*, 1981), was zunächst für eine vorherrschende Rolle der angeborenen Immunantwort bei der Abwehr von *A. fumigatus* spricht. Inzwischen verdichten sich allerdings die Hinweise, dass eine T-Zellantwort zur Immunabwehr beiträgt (Hebart *et al.*, 2002; Cenci *et al.*, 1999; Cenci *et al.*, 1997; Perruccio *et al.*, 2005), wenn auch die dahinterstehenden Mechanismen noch nicht wirklich verstanden werden.

7. Virulenz in *A. fumigatus* ist vielschichtig

Als opportunistischer Krankheitserreger ist *A. fumigatus* normalerweise harmlos. Erst eine Beeinträchtigung der Immunabwehr des Wirts erlaubt es dem Pilz, diesen zu kolonisieren. Nachdem *A. fumigatus* nur 0,3-1% der Sporen in der Luft eines Krankenhauses ausmacht, aber für etwa 80-90% (Brakhage und Langfelder, 2002) der invasiven Aspergillosen verantwortlich ist, wurde oft erwartet, dass dieser Pilz über spezielle Virulenzfaktoren verfügen muss. Doch auch eine systematische Suche nach Virulenzfaktoren durch Hensel und Holden (1996) blieb erfolglos. Inzwischen geht man davon aus, dass dieser Organismus über keine klassischen Virulenzfaktoren verfügt. Seine Dominanz bei der Besiedelung des immunsupprimierten Wirts ist vermutlich vielmehr durch das Vorhandensein vieler verschiedener vorteilhafter Eigenschaf-

ten begründet. Eine dieser vorteilhaften Eigenschaften ist sicher seine Thermotoleranz, die ihn deutlich von anderen *Aspergillus*-Arten unterscheidet. Durch schnelles Wachstum bei 37° C kann er die geschwächte Immunabwehr des menschlichen oder tierischen Wirts noch besser überwinden und sich gleichzeitig gegen weniger schnell wachsende Organismen durchsetzen. Um im Wirt überleben zu können, muss *A. fumigatus* in der Lage sein, die dort vorhandenen Nährstoffe zu sensieren und durch geeignete Stoffwechsellanpassungen nutzbar zu machen. Als Saprophyt, der normalerweise organisches Material im Boden zersetzt, verfügt *A. fumigatus* über ein breites Arsenal an hydrolytischen Enzymen, die ihm auch in der Virulenz nützlich sind. Natürlich muss der Pilz auch seinen Bedarf an Makro- und Mikroelementen, wie Fe, Zn, Mg und Phosphat im Wirt decken können. Auch dafür ist der Pilz bestens ausgestattet. So verfügt er z. B. über Siderophore und fünf verschiedene Zinktransporter (Tekaia und Latge, 2005). Selbst wenn Pilzmutanten in solchen Stoffwechsellanpassungen eine verringerte Virulenz im Mausmodell zeigen, kann man dennoch nicht von Virulenzfaktoren sprechen, da die Mutanten auch außerhalb des Wirts aufgrund der Deletion Wachstumsprobleme hätten. Um sich im menschlichen oder tierischen Organismus ausbreiten zu können muss *A. fumigatus* die zwar geschwächte aber dennoch vorhandene Immunabwehr überkommen. Dabei helfen Strukturen, die die Sporen vor der Erkennung durch Zellen des Immunsystems schützen, wie die „rodlet structure“, die die ruhenden Sporen umhüllt und Zielstrukturen ummantelt und damit für das Immunsystem unsichtbar macht (Paris *et al.*, 2003). Aber der Pilz muss sich auch effektiv vor den Angriffen des Immunsystems, also vor ausgeschütteten reaktiven Sauerstoffspezies, schützen. Die Sporen werden wohl durch ihre Pigmentierung mit 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin vor den Zellen der Immunabwehr geschützt. Im Tiermodell waren Pilzmutanten ohne Pigmentierung weniger virulent als der Wildtyp (Jahn *et al.*, 1997). Enzymsysteme, die die ROS entgiften können, sind eine weitere Voraussetzung, um einen Wirt erfolgreich zu kolonisieren (Hamilton und Holdom, 1999). *A. fumigatus* entgiftet ROS beispielsweise über Glutathion-Synthese und Oxidoreduktasen (Tekaia und Latge, 2005). Außerdem besitzt dieser Pilz vier Superoxiddismutasen (SODs) und drei verschiedene Katalasen. Nur eine Doppelmutante der beiden Hyphen-spezifischen Katalasen zeigte sich im Ratten-Infektionsmodell etwas weniger virulent als der Wildtyp (Paris *et al.*, 2003). Desweiteren produziert *A. fumigatus* auch mehrere verschiedenen Mycotoxine, die bei der Besiedelung des Wirts von Vorteil sein könnten, wie Gliotoxin, Fumagilin, Helvolinsäure, Fumitremorgin A und Asp-Hämolyisin (Kamei und Watanabe 2005). Gliotoxin ist dabei am besten untersucht. Es wird in der humanen Aspergillose exprimiert und verfügt über immunsuppressive Eigenschaften. So blockiert es etwa die Phagozytose bei Leukozyten (Pahl *et al.*, 1996) und induziert Apoptose bei Neutrophilen und Monozyten (Stanzani *et al.*, 2005; Waring *et al.*, 1988). Drei unabhängig von einander hergestellte Mutanten zeigten allerdings unterschiedliche Ergebnisse im Tiermodell. Zwei Gruppen fanden keinen Unterschied im Viru-

lenzverhalten von Mutante und Wildtyp (Cramer *et al.*, 2006; Kupfahl *et al.*, 2006). Die dritte Gruppe dokumentierte eine verringerte Virulenz der Mutante im Maus-Modell (Sugui *et al.*, 2007). Gliotoxin scheint also unter bestimmten Bedingungen zur Virulenz des Pilzes beizutragen, hat aber scheinbar keine ausschlaggebende Bedeutung. Viele dieser hier genannten vorteilhaften Eigenschaften können dennoch die Vorherrschaft von *A. fumigatus* in der Infektion nicht erklären, da auch andere weniger virulente Aspergillus-Arten über diese Fähigkeiten verfügen. So wird zum Beispiel Gliotoxin auch von zehn anderen Aspergilli produziert.

7.1 Das CipC-Protein – ein möglicher virulenzassoziierter Faktor?

Das Genom von *A. fumigatus* kodiert für 9926 putative Genprodukte. Immerhin ein Drittel davon, nämlich 3288, haben eine unbekannte Funktion (Niermann *et al.*, 2005). Eines dieser Proteine mit unbekannter Funktion ist ein zu CipC homologes Protein. Der Name steht für **Concanamycin A induziertes Protein C** und ist auf Arbeiten in *A. nidulans* zurückzuführen (Melin *et al.*, 2002). Bei einer Untersuchung der Interaktion zwischen *Streptomyces halstedii* und verschiedenen Pilzen setzte die Gruppe das von Streptomyceten gebildete Antibiotikum Concanamycin A ein und untersuchte mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese, welche Proteine in *A. nidulans* differentiell exprimiert werden. Concanamycin A ist ein Plecomacrolid Antibiotikum, das durch Bindung an die Untereinheit C des membrangebundenen, Ionen translozierenden V-Komplexes die Aktivität von vakuolären ATPasen hemmt (Huss *et al.*, 2002). Eine Inhibierung der V-ATPase, die die vakuoläre Membran energetisiert, führt in filamentösen Pilzen zu einem spezifischem Wachstumsphänotyp, nämlich zur Bildung von kurzen, dicklichen und stark verzweigten Hyphen (Bowman *et al.*, 1997). Das CipC-Protein wurde in *A. nidulans* in Antwort auf Concanamycin A in 6x so großer Menge produziert. Homologe Proteine findet man nur in Pilzen, was eine mögliche Rolle als therapeutisches Ziel bei der Bekämpfung einer invasiven Aspergillose impliziert. Die Funktion war zu Beginn dieser Arbeit gänzlich unbekannt. Im Rahmen einer in unserer Arbeitsgruppe früher angefertigten Dissertation (Schwienbacher, 2005) wurde dieses Protein auch bei 2D-Gelelektrophorese-Studien als einer der dominantesten Proteinspots in Hyphenproteinextrakten von *A. fumigatus* gefunden (siehe Abb. 3). Außerdem zeigte sich in diesen Untersuchungen auch, dass es sich um ein differentiell exprimiertes Protein handelt, das nur in Hyphen, nicht aber in auskeimenden Hyphen oder Sporen gefunden wurde.

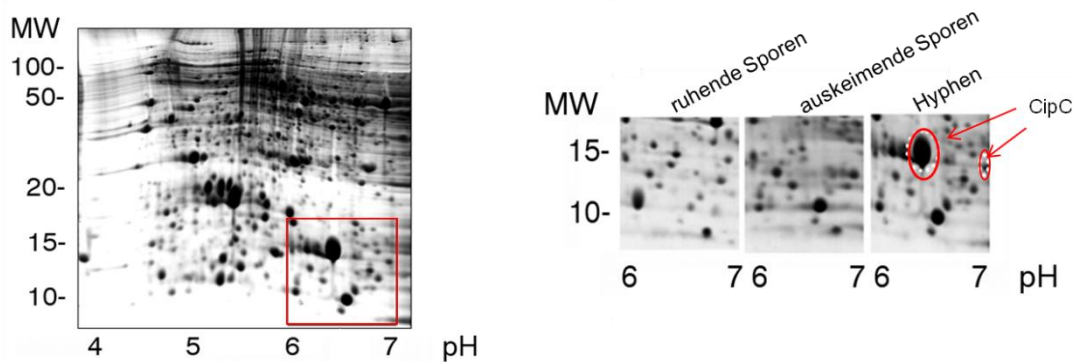


Abb. 3: CipC wurde als hyphenspezifisches Protein in der 2D-Gelelektrophorese gefunden

Das zu CipC ähnliche Protein wurde nur in Proteinextrakten aus Hyphen gefunden. Hier scheint es mengenmäßig ein sehr dominantes Protein zu sein. Links ist beispielhaft ein vollständiges 2D-Gel der Hyphenfraktion zu sehen (Schwienbacher, 2005).

Weiterhin war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass das CipC-Protein wohl eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *Cryptococcus neoformans* spielt (Steen *et al.*, 2003). Cryptococci sind virulente Hefen, die die Blut-Hirn-Schranke durchbrechen können und sowohl in immunkompetenten als auch in immungeschwächten Personen Meningitis verursachen können. Die Arbeitsgruppe untersuchte mithilfe der „Serial Analysis of Gene Expression“ (SAGE)-Technik die Anpassung der Genexpression des Pilzes während der Infektion. Dabei fanden sie drei Transkripte, die im Infektionsmodell deutlich stärker exprimiert waren als in den Kontrollen. Die beiden häufigsten Transkripte kodierten für zwei Proteine der Hitzeschockproteinfamilie Hsp 12 und das dritthäufigste Transkript in dieser Studie kodierte für ein zu CipC homologes Protein.

7.2 Die MnSODs von *A. fumigatus* – mögliche virulenzassoziierte Faktoren?

Das Superoxidanion und Wasserstoffperoxid sind teilweise reduzierte Sauerstoffspezies, die ständig als Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels entstehen. Durch ihre hohe Reaktivität sind sie für lebende Zellen sehr schädlich, da beispielsweise aktive Zentren von Enzymen zerstört werden können (Imlay, 2008). Als Schutzmechanismus dienen Enzyme, die diese Sauerstoffradikale entgiften können. Superoxiddismutasen können das Superoxidion in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff verwandeln. Katalasen machen wiederum Wasserstoffperoxid unschädlich. Diese Enzymsysteme schützen allerdings nicht nur vor selbst produzierten Sauerstoffradikalen, sondern helfen den Zellen auch, sich vor Fremdangriffen mit ROS zu schützen. Sie sind deswegen mögliche wichtige Faktoren für die Virulenz des Pilzes. Insbesondere die Rolle der

Superoxiddismutasen während der Virulenz von *A. fumigatus* war bisher unzureichend geklärt. Die Superoxiddismutasen wurden von Irvin Fridovich und Joe McCord 1968 entdeckt (McCord und Fridovich, 1988) und werden, je nach gebundenen Metallcofaktor, in drei verschiedene Klassen unterteilt: Zum einen gibt es SODs vom Cu/Zn Typ. Sie gelten als das typische Enzym im eukaryotischen Zytosol und unterscheiden sich strukturell von den beiden anderen Klassen. Des Weiteren gibt es sowohl Mn- als auch Fe-abhängige SODs. Diese beiden Typen weisen deutliche Sequenzhomologien auf und kommen hauptsächlich in Prokaryoten vor. Die Mn-abhängige SOD ist das typische in den Mitochondrien vorkommende Enzym. Bei der letzten Klasse handelt es sich um die Ni-abhängigen SODs, die in Prokaryoten vorkommen. Erst durch die Veröffentlichung der Genomsequenz von *A. fumigatus* (Niermann *et al.*, 2005) stellte sich heraus, dass im Genom vier potentielle Superoxiddismutasen kodiert sind. Davon ist eine Cu/Zn-, zwei Mn- und eine Fe-abhängig. Von diesen vier SODs ist bis heute nur eine genauer charakterisiert worden. Dabei handelt es sich um das Aspergillus-Allergen Asp6 (Crameri und Blaser, 1995). Dieses Antigen wird auch für diagnostische Zwecke zur Unterscheidung von ABPA und allergischen Reaktionen herangezogen. Da Asp6 nur in den Hyphen zu finden ist, bilden nur ABPA-Patienten spezifische IgEs (Hemmann *et al.*, 1999; Schwienbacher *et al.*, 2005). Bisher ist man davon ausgegangen, dass es sich hierbei um die mitochondriale MnSOD handelt.

8. Zielsetzung der Arbeit

Mithilfe dieser Arbeit sollten mögliche Virulenzdeterminanten von *A. fumigatus* genauer charakterisiert werden. Noch immer ist nicht ganz klar, welche Faktoren dazu führen, dass *A. fumigatus* bei invasiven Pilzkrankungen in immungeschwächten Patienten der dominierende Keim ist. Im Fokus der Arbeit stand dabei das Pilz-spezifische Protein CipC, das neben einer möglichen Rolle in der Virulenz auch als mögliches therapeutisches Ziel in Frage kam. Es sollte versucht werden, mithilfe unterschiedlicher methodischer Werkzeuge die Funktion dieses Proteins aufzuklären. Weiterhin sollte auch eine mögliche Bedeutung für die Virulenz untersucht werden.

Superoxiddismutasen entgiften reaktive Sauerstoffspezies. Sie können deswegen in humanpathogenen Organismen eine bedeutende Rolle bei der Verteidigung des Pilzes gegen die Immunabwehr des Wirts spielen. Dabei ist die Bedeutung der zwei im Genom von *A. fumigatus* kodierten MnSODs während der Virulenz bisher unzureichend geklärt. Diese sollte in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

B. Material und Methoden

1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, Pilzstämmen, murine Myelomzelllinien und Mausstämmen sind in den Tabellen 1 bis 4 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K m _K), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ , <i>gyrA96</i> , <i>relA</i> , Δ (<i>lacZYA</i> -, <i>argF</i>)U169	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B m _B), <i>gal</i> λ DE3	Fa. Novagen (Madison, USA)
<i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4]	SG13009[pREP4]	Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland)

Tab. 2: Verwendete Pilzstämmen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	Wildtyp; Patientenisolat	ATCC
<i>Aspergillus fumigatus</i> D141	Wildtyp, Patientenisolat	Reichard <i>et al.</i> , 1990
<i>Aspergillus fumigatus</i> Δ Ku70 (Afs 35)	<i>A. fumigatus</i> D141 Δ <i>akuA</i>	Krappmann <i>et al.</i> , 2006

<i>Aspergillus fumigatus</i> CEA17	<i>A. fumigatus</i> CEA10 (Wildtyp) <i>pyrG</i> ⁻	d'Enfert, 1996
<i>Aspergillus fumigatus</i> Δ Ku80	<i>A. fumigatus</i> CEA17 Δ <i>akuB</i>	da Silva Ferreira <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i> Δ Ku80 <i>pyrG</i> ⁺	<i>A. fumigatus</i> CEA17 Δ <i>akuB</i> , <i>pyrG</i> ⁺	da Silva Ferreira <i>et al.</i> , 2006;
<i>Aspergillus fumigatus</i> Δ <i>rodA</i>	<i>A. fumigatus</i> 144-89 (Wildtyp, Patientenisolat), Δ <i>rodA</i>	Thau <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus fumigatus</i> Pro _{<i>nrpA</i>} -NrpA-GFP	<i>A. fumigatus</i> Δ <i>akuA</i> , Pro _{<i>nrpA</i>} -NrpA-GFP	diese Arbeit
<i>Aspergillus fumigatus</i> Pro _{<i>nrpA</i>} -NrpA-GFP (II)	<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645, Pro _{<i>nrpA</i>} -NrpA-GFP	diese Arbeit
<i>Aspergillus fumigatus</i> Pro _{<i>nrpA</i>} -GFP	<i>A. fumigatus</i> Δ <i>akuA</i> , Pro _{<i>nrpA</i>} -GFP	diese Arbeit
<i>Aspergillus fumigatus</i> Pro _{<i>nrpA1576</i>} -NrpA-GFP	<i>A. fumigatus</i> Δ <i>akuA</i> , Pro _{<i>nrpA1576</i>} -NrpA-GFP	diese Arbeit
<i>Aspergillus fumigatus</i> Sigsequ-MnSODmito-GFP	<i>A. fumigatus</i> Δ <i>akuA</i> , Sigsequ-MnSODmito-GFP	diese Arbeit
<i>Aspergillus fumigatus</i> Δ <i>nrpA</i>	<i>A. fumigatus</i> Δ <i>akuB</i> , Δ <i>nrpA</i>	diese Arbeit

Tab. 3: Verwendete murine Myelomzelllinie

Stamm	Stammnummer	Bezugsquelle
P3-X63-Ag8.653 („Ag8“) Murine Myelomzelllinie	ATCC TIB-132	Prof. Jürgen Wehland, Braunschweig

Tab. 4: Verwendete Mausstämme

Stamm	Alter	Referenz
BALB/c	10-15 Wochen	Fa. Charles River (Sulzfeld, Deutschland)

Eine Auflistung der verwendeten Plasmide, Oligonukleotide und Plasmidkonstrukte ist in den Tabellen 5 bis 7 zu finden.

Tab. 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pQE30-UA	N-terminaler (His) ₆ -Tag Amp ^r	Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland)
pAN 923 Δ <i>argB1</i>	<i>lacZ</i> (<i>E. coli</i>)	van Gorcom <i>et al.</i> , 1985 van Gorcom <i>et al.</i> , 1986 Ebel <i>et al.</i> , 2006
pSK 379GFP	<i>gfp</i>	Sven Krappmann, Würzburg- modifiziert durch Johannes Wagener, München

Tab. 6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Interne Nummer
Cip 5'	ATGGCTTGGGGCTGGGAG	144
Cip 3'	TTACCAACGGTCGACAGG	145
Cipup5'	TACTCGGCTATTGGCAAATC	159
NotCipup3'	CAGCAAGCGTGCGGCCGCTTTGAGTTGATCTGGTCAAAT	160
NotCipdown5'	TCAACTCAAAGCGGCCGCACGCTTGCTGTATGGGACGGC	161

Cipdown3`	TGAGCAGAGCGCCAAAGCCCA	162
5`Notdownneu	TCAACTCAAAGCGGCCGCTGTACATAGGCTTGAACAGTG	163
3`downneu	TGACATATGAGATGTCCTAGAATATTGGAA	164
5`Bgl2PT	TTTAGATCTTACTCGGCTATTCGGCAAATC	177
3`BamH1PT	TGGATCCCATTTTGAGTTGATCTGGTGA	178
5`Sonde2641	ATGGCTCATCTGAAGTACG	185
3`Sonde3143	ATTACGTGAATAGTGGTCG	186
MT P7	AAATACAAGAACTTCGTTATGGGTTTCGTG	201
MT P8	GATCACGAACTTGGCGAACTTCATCCT	202
MT P5	TCCAGAAGCACATTCTCATACGACTGT	203
MT P6	AAACATTGGTCAATCACTGGTAACTCC	204
mMnSOD-5`	ATGGCCTCTCTCATCCGT	241
mMnSOD-3`	CTATGCGGAGAAGCGCTT	242
5`CipCupPST1	TTTCTGCAGTACTCGGCTATTCGGCAAATCGAT	276
3`CipC-gfpFu	GCCGCCGCCAACGGTCGACAGGGCGGTC	277
5`CipgfpFuPro1500	TTTCTGCAGAAGATACTTAGGTGACAGCCG	286
3`CipProgfpFuKontr	GCCATTTTGAGTTGATCTGGTAAAAT	287
AfMnSOD-5	AAACATGGCCGCTCTTCAT	290a
AfMnSOD-gfpfu-int-rev	GCCGCCGCATCAGGCAGAGTGGCCTTG	291a

Tab. 7: Verwendete Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	Insert	Vektor
pQE30-UA-CipC (NrpA)	Zu <i>cipC</i> homologes Gen aus <i>A. fumigatus</i> ATCC 46645 (<i>nrpA</i>): AM086260.1	pQE30-UA
pQE30-UA-MnSOD	Putative mitochondriale MnSOD aus <i>A. fumigatus</i> ATCC 46645: EAL89634	pQE30-UA
pSK379GFP- Pro _{<i>nrpA</i>} -NrpA-GFP	Promotorregion <i>nrpA</i> (1013 Bp)- <i>nrpA-gfp</i>	pSK 379GFP
pSK379GFP- Pro _{<i>nrpA</i>} -GFP	Promotorregion <i>nrpA</i> (1013 Bp)- <i>gfp</i>	pSK 379GFP
pSK379GFP- Pro _{<i>nrpA1576</i>} -NrpA-GFP	Promotorregion <i>nrpA</i> (1576 Bp)- <i>nrpA-gfp</i>	pSK 379GFP
pAN-Pro _{<i>nrpA</i>} -LacZ	Promotorregion <i>nrpA</i> (1016 Bp)- <i>lacZ</i>	pAN 923 Δ <i>argB1</i>

2. Zellanzucht

2.1 Medien

2.1.1 Medien für *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in LB (Luria-Bertani)-Medium mit folgender Zusammensetzung:

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml; autoklavieren

Je nach Bedarf wurden dem Medium zur Selektion nach dem Autoklavieren Carbenicillin (Stammlösung: 100 mg/ml), ein Funktionsanalogon von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, oder Chloramphenicol (Stammlösung: 30 mg/ml) in einer Endkonzentration von

30 µg/ml zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 18 g Bactoagar (Difco) pro Liter Medium [(1,8% (w/v))] versetzt.

2.1.2 Medien für *A. fumigatus*

A. fumigatus wurde mit folgenden Nährmedien angezogen:

Komplexmedien:

Potato- Dextrose- Agar (Difco):

Kartoffelmehl	200 g
Bacto Dextrose	20 g
Agar	15 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml; autoklavieren

Sabouraud-Dextrose-Agar (Difco):

Neopepton	20 g
Dextrose	40 g
Agar	15 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml, autoklavieren

YG (Hefe-Dextrose)-Medium:

Hefeextrakt	5 g
Glukose	20 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml; autoklavieren

YG_f (YG filtriert):

100 ml 10x YG-Medium wurden in einen gewaschenen Dialyseschlauch (Spectrum; Spectra Pore Membrane) mit einer Ausschlußporengröße von 6-8 kDa gefüllt und für 16-20 h gegen 900 ml H₂O filtriert. Die im Dialyseschlauch verbliebene Flüssigkeit wurde verworfen, der Rest autoklaviert.

Minimalmedien:Yeast Nitrogen Base (YNB):

YNB (Invitrogen)	1,7 g
Ammonium-Sulfat	5 g
Glukose	20 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000ml; autoklavieren

Aspergillus-Minimalmedium (AMM) (Hill und Kafer, 2001):

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5 ml (Stammlösung: 0,4 M)
Salzlösung	20 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Glukose	10 g
N-Quelle	20 mM (Endkonzentration)
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml, sterilfiltrieren

Der pH-Wert liegt bei etwa 6,6 und muß nicht mehr eingestellt werden.

Als Standard-N-Quelle wurde Ammonium-Tartrat in einer Endkonzentration von 20 mM verwendet. Wurden in Versuchen unterschiedliche N-Quellen oder -Konzentrationen verwendet, wurde das Medium unter Verwendung einer Salzlösung ohne N-Quelle als 2x Stammlösung hergestellt. Die N-Quellen konnten dann als separate Stammlösungen je nach Bedarf eingesetzt werden. Stammlösungen von Aminosäuren wurden stets eingefroren.

Salzlösung (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

Spurenelementlösung (nach Hunter) (Hill und Kafer, 2001):

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

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben bei 121° C und 3 Bar für 20 min autoklaviert.

Zum Nachweis einer aktiven β-Galactosidase wurden 40 µl einer X-Gal-Lösung (40 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactopyranosid/ml Dimethylformamid (w/v)) vor der Beimpfung auf einer Agarplatte mit 25 ml Kulturagar verteilt.

2.1.3 Medien für die Zellkultur

Die Anzucht der Zelllinien erfolgte in folgenden Medien von Invitrogen: DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium), Opti-MEM und RPMI (Royal Park Memorial Institut).

Allen Medien wurde Glutamin (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Medien zusätzlich mit einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 100 U/ml versetzt. Außerdem erfolgte eine Supplementation des Mediums mit 5% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS; Invitrogen).

2.2 Anzucht und Ernte von *E. coli*

E. coli wurde aerob unter schütteln (180 U/min) bei 37° C angezogen. Als Kulturgefäße dienten bis zu einem Volumen von 5 ml Reagenzgläser (15 ml) oder Plastikreagenzgläser der Firma Falcon (15 ml) und sonst Erlenmeyerkolben entsprechender Größe. Durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 6000 g erfolgte die Ernte der Bakterien. Über kürzere Zeiträume wurde

E. coli auf LB-Agarplatten bei 4° C gelagert. Für eine langfristige Lagerung wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin [50% (v/v)] versetzt und bei -80° C aufbewahrt.

2.3 Anzucht und Ernte von *A. fumigatus*

A. fumigatus wurde aerob unter schütteln (180 U/min) bei 37° C angezogen. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben entsprechender Größe. Für die Herstellung von Sporenstammlösungen wurden 100 µl einer 1:500 verdünnten Sporenstammlösung in Zellkulturflaschen (Nunc Brand Products) mit 175 cm³, in denen sich 100 ml Nähragar befanden, eingebracht. Nach Zugabe von sterilen Glaskugeln wurde die Flüssigkeit durch Schwenken auf der Agaroberfläche verteilt. Nach etwa 2-4 Tagen hatten sich die Sporen dunkelgrün gefärbt und konnten geerntet werden. Dazu wurden sterile Glaskugeln und 10 ml H₂O in die Flasche pipettiert. Durch Schütteln und Schwenken konnten die Sporen von den Konidophoren abgetrennt werden und die jetzt dunkle Flüssigkeit wurde durch sterile, mit Miracloth ausgekleidete Filter geschüttet. Dieser erste Teil des Erntevorgangs wurde ein bis zwei Mal wiederholt. Zum Waschen und Konzentrieren der Sporen wurde das Filtrat durch einen Spritzenaufsatzfilter (0,8 µm) gepresst. Dabei bleiben die Sporen im Filter hängen und werden so von der Flüssigkeit getrennt. Durch die Spitze des Spritzenaufsatzfilters konnte nun frisches Wasser in beliebiger Menge in die Spritze gezogen werden. Die Lagerung der Sporenstammsuspensionen erfolgte mittelfristig bei 4° C. Für eine langfristige Lagerung wurden 300 µl Sporenstammsuspension und 200 µl Glycerin (50% (v/v)) vermischt und bei -80° C aufbewahrt. Durch die Auszählung einer 1:500-1:1000 verdünnten Sporenstammsuspension in einer Neubauer-Zählkammer konnte der Titer der Suspensionen bestimmt werden. Normalerweise enthielten solche Stammlösungen etwa 1x10⁸ Sporen/ml.

2.4 Anzucht und Kryokonservierung der Zelllinien

Die Anzucht der Myelom- und Hybridomzelllinien erfolgte in Zellkulturschalen verschiedener Größen (Nunc), in einem Zellkulturinkubator (Hera Cell 150, Thermo Scientific) bei 37° C und 6% (v/v) CO₂. Zum Einfrieren wurden Zellen aus der exponentiellen oder spätexponentiellen Wachstumsphase in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und bei RT für 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 0,3-1 ml kaltem Einfriermedium (FCS mit 8% (v/v) DMSO) aufgenommen und in Einfriergefäße überführt. Um einen schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten, wurden die Einfriergefäße zunächst in eine spezielle, mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene) gestellt, welche anschließend bis zu 14 Tage bei -80° C gelagert wurde. Bei dieser Vorgehensweise kühlt sich der Inhalt der Box gleichmäßig und kon-

tinuierlich um 1° C pro min ab. Anschließend erfolgte die Überführung der Einfriergefäße in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank (-196° C).

Nach dem Auftauen der Zellen musste das DMSO im Einfriermedium möglichst schnell ausverdünn werden. Deswegen wurden die Zellsuspensionen schnell aufgetaut und sofort in ein vorbereitetes 15 ml Plastikröhrchen mit 5 ml warmen Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200 g für 5 min bei RT wurde der Überstand verworfen und das Sediment in frischem Medium gelöst und in geeignete Kulturgefäße überführt.

2.5 Wachstumsversuche mit *A. fumigatus*

2.5.1 Bestimmung des radialen Wachstums

Für die Bestimmung des radialen Wachstums von *A. fumigatus* wurde 1 µl einer Sporenstamm-suspension mittig auf eine Agarplatte getüpfelt. Die Messung des Durchmessers der entstandenen Kolonie erfolgte in geeigneten Zeitabständen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5.2 Feuchtgewichtsbestimmung

Zur Bestimmung des Feuchtgewichts von Myzel von *A. fumigatus* wurden die Flüssigkulturen zum Ernten durch mit Faltenfilter ausgekleidete Filter geschüttet und mit H₂O_{dest.} gewaschen. Danach wurde das Myzel zwischen dickem Whatmann-Papier durch leichten Druck getrocknet. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis kaum mehr Feuchtigkeit auf dem Papier zu sehen war. Anschließend konnte das Gewicht des Myzels auf einer Feinwaage analysiert werden.

2.5.3 Tüpfeltests

2.5.3.1 Tüpfeltests auf Gradientenagarplatten

Bei diesem Testsystem wurden Agarplatten gegossen, die von einem ausgesuchten Nährstoff einen Konzentrationsgradienten aufwiesen. Dafür wurde zunächst Nähragar mit der maximalen Konzentration des für den Gradienten verwendeten Stoffes in eine schrägliegende viereckige Petrischale gegossen. Nach dem Erkalten bildete der Agar einen stabilen Keil. Dieser wurde dann mit Nähragar überschichtet, der den für den Gradienten verwendeten Stoff nicht enthielt. Jeweils 1 µl einer Sporenstamm-suspension wurde dann entlang des Gradienten auf die Platte aufgebracht. Dabei wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5.3.2 Tüppeltests auf normalen Agarplatten

Von frischen Sporenstammessuspensionen wurden Verdünnungsreihen mit folgenden Sporenkonzentrationen/ml hergestellt: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 und 10^3 . Jeweils 2 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden fortlaufend auf Agarplatten getüppelt. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5.4 Hemmhofversuche mit H_2O_2

Je 30 μ l Sporen der zu vergleichenden Pilzstämme wurden in gleichen Konzentrationen ($1,8 \times 10^6 / 30 \mu$ l) auf PD-Agarplatten ausplattiert. In die Mitte der Agarplatte wurde je ein steriles, mit 40 μ l H_2O_2 -Lösung (30% v/v) getränktes Filterplättchen gelegt. Die gebildeten Hemmhöfe wurden anschließend ausgemessen. Dabei wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5.5 *Phenotype Microarray*TM

Die für die *Phenotype Microarrays*TM (Biolog) notwendigen Produkte wurden über die Firma AES Chemunex bezogen. Die Durchführung des Versuchs orientierte sich an der Protokollvariante für filamentöse Pilze, die ebenfalls von der Firma AES Chemunex bereitgestellt wurde. Anders als angegeben, wurden die Platten in einer feuchten Kammer bei 30° C bebrütet und zu geeigneten Zeitpunkten optisch ausgewertet.

3. Molekularbiologische und genetische Methoden

3.1 Amplifizierung von DNS-Fragmenten

Für die Amplifizierung von DNS-Fragmenten wurden verschiedene Taq- und Pfu-Polymerasen mit den entsprechenden Puffersystemen verwendet. Das Probenvolumen betrug normalerweise 50 μ l. Diente die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) analytischen Zwecken wurde das Probenvolumen bis auf 16 μ l pro Ansatz verringert. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem *Minicycler* mit beheizbarer Deckenplatte (Biometra; T Gradient, Personal Cycler). Polymerisierungstemperatur und -dauer richtete sich nach den Angaben des Herstellers der Polymerase. Für die Anlagerung der Oligonukleotide wurde die Temperatur etwa 5° C niedriger gewählt, als die Schmelztemperatur der entsprechenden Oligonukleotide. Im Folgenden ist beispielhaft ein PCR-Programm bei Verwendung einer Taq-Polymerase angegeben: Zu Beginn er-

folgte ein Denaturierungsschritt bei 94° C für 2-10 min. Daraufhin wurden 29 Mal folgende Schritte wiederholt: 30 s bei 94° C (Denaturierung), 30 s bei 50-59° C (Anlagerung der Oligonukleotide), 1 min/1 kB bei 72° C (Polymerisierung). Am Ende dieser Wiederholungen wurden die Proben nochmals für 4 min auf 72° C (finale Polymerisierung) erhitzt und anschließend im Gerät bei 4° C gekühlt.

Die PCR-Produkte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 8° C oder bei -20° C gelagert. Falls nötig wurden die Proben mit einem *Kit* der Firma USB (*PrepEase Gel Extraction*) gereinigt.

3.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Plasmide wurden entweder durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) oder mithilfe folgender *Kits* isoliert: *High speed Plasmid Mini* oder *Maxi-Kit* (Qiagen), *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega).

3.3 Isolierung von genomischer DNS aus *A. fumigatus*

Die Isolierung der DNS erfolgte mit Hilfe des *MasterPure Yeast DNA Purification Kits* (EPICENTRE Biotechnologies) nach einer Protokollvariante von M. Brock (persönliche Mitteilung).

Das in flüssiger Kultur (20 ml) gewachsene Myzel wurde geerntet, indem es durch einen Trichter mit Filterpapier geschüttet wurde. Nach 2-3 maligem Waschen mit H₂O_{dest.} wurde das Myzel zwischen zwei Lagen dickem Whatmanpapier getrocknet und eingefroren. Das gefrorene Myzel wurde in bereits vorgekühlten Mörsern in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff pulverisiert. 150–200 mg des Pulvers wurden in 2 ml Plastikgefäße überführt und mit 450 µl „*Yeast Cell Lysis Solution*“ sowie 2 µl RNaseA (Qiagen) durchmischt. Nun wurden die Proben für 30 min bei 65° C inkubiert und zwischendurch mehrmals gevortext. Erst nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden 225 µl „*MPC Protein Precipitation Reagent*“ zugegeben. Nun folgte eine Zentrifugation bei 10 000 g für 10 min. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die DNS konnte nun durch Zugabe von 750 µl Isopropanol ausgefällt werden. Nach mehrmaligen invertieren der Gefäße war die ausgefallene DNS als weißer Faden zu sehen. Die DNS wurde bei 10 000 g für 10 min sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 70% (v/v) EtOH gewaschen. Noch einmal wurden die Proben bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor dem Lösen der DNS in etwa 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris HCl

pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) mussten EtOH-Rückstände vollständig entfernt sein. Dafür wurde das Plastikgefäß für einige Minuten mit offenem Deckel bei 50° C inkubiert.

Diente die DNS zur Selektion positiver Klone, erfolgte der Aufschluss des Myzels im Schüttelhomogenisator *FastPrep 24* (MP Biomedicals). Dabei wurden kleine Myzelklumpen in 450 µl „*Yeast Lysis Buffer*“ für 20 sec bei 5,5 m/s geschüttelt. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte wie oben beschrieben. Da bei dieser Protokollvariante die DNS-Ausbeute wesentlich geringer ist, wird das Sediment am Ende in nur 30 µl TE-Puffer gelöst.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Nach einer 1:10-1:20 Verdünnung der DNS-Lösung in H₂O_{dest.} erfolgte die spektrophotometrische Messung bei 260 und 280 nm gegen den Leerwert. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm entspricht etwa einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml. Eine proteinfreie DNS-Lösung weist normalerweise ein OD_{260/280}-Verhältnis von 1,8-2,0 auf.

3.5 Konzentrieren von DNS-Lösungen

DNS-Lösungen wurden durch eine Alkoholfällung mit EtOH (Mühlhardt, 2003) konzentriert. Dazu wurden DNS-Lösungen mit einer Endkonzentration von 0,3 M Na-Acetat (Stammlösung: 3 M; pH 4,8-5,2) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 70% (v/v) EtOH (p. A.), wodurch die DNS zum Ausfallen gebracht wurde. Durch eine Zentrifugation bei 10 000 g konnte die DNS sedimentiert werden. Nochmal wurde die DNS mit 70% (v/v) EtOH gewaschen. Nachdem die EtOH-Reste verdampft waren, konnte das Sediment in einer geeigneten Menge TE-Puffer oder H₂O_{dest.} resuspendiert werden.

3.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei betrug die verwendete Standard-Agarosekonzentration (Roth) 1% (w/v) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/6 Volumen Ladepuffer (*6x Loading Dye*, Fermentas) versetzt. Dies diente der farblichen Markierung der Proben und der Erhöhung der Dichte der Lösung. Die beladenen Gele wurden in speziell dafür gefertigten Kammern für ca. 1 h bei 80-110 Volt (je nach Abstand von Anode und Kathode) mit TAE als Laufpuffer gefahren. Die Färbung der Nukleinsäuren erfolgte für ca. 30 min

in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml in TAE). Nachdem die Gele kurz in H₂O gewaschen worden waren, konnte die DNS auf einem UV-Transilluminator (BioRad) mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden. Durch einen mitgeführten DNS-Längenstandard konnte die Größe der untersuchten DNS-Fragmente abgeschätzt werden.

DNS-Fragmente, die aus dem Gel extrahiert werden sollten, wurden nicht mit Ethidiumbromid gefärbt und keinem UV-Licht ausgesetzt. Um die Lage der Fragmente im Gel dennoch bestimmen zu können, wurde die für die Präparation bestimmte Probe beidseitig durch einen Teil der gleichen Probe flankiert. Diese flankierenden Bereiche wurden nach dem Auftrennen mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten beim Ausschneiden des Fragments als Vorlage.

3.7 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNS aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Kits der Firma USB (*PrepEase Gel Extraction*). Dabei erfolgte die Extraktion nach den Angaben des Herstellers.

3.8 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

3.8.1 Sequenzspezifische Spaltungen von DNS

Für diesen Vorgang wurden Restriktionsendonucleasen (MBI Fermentas) verwendet. Die Puffer-, Konzentrations- und Temperaturbedingungen wurden nach Herstellerangaben eingestellt.

3.8.2 Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von DNS-Fragmenten

Für die 5'-Phosphorylierung von DNS-Fragmenten wurde eine T4-Polynukleotid Kinase verwendet. Die Entfernung von 3' und 5'-Phosphatgruppen an DNS-Fragmenten erfolgte mithilfe einer alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Beide Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und nach Anweisung des Herstellers verwendet.

3.8.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNS-Ligase (MBI Fermentas). In den meisten Fällen wurde das Enzym mit einer Konzentration von 1U/µl eingesetzt. Nur bei schwierigeren Ligationen, wenn beispielsweise DNS-Fragmente mit glatten Enden zusammenligiert werden sollten, wurde das gleiche Produkt mit 5U/µl oder 30U/µl verwendet. Die Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 8° oder 16° C.

3.9 Transformation von *E. coli*

3.9.1 Transformation mittels Elektroporation

3.9.1.1 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

250 ml LB-Medium wurden 1: 200 mit einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37° C und 180 U/min bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 -0,7 inkubiert. Nachdem die Zellen für 20 min auf Eis abgekühlt waren, wurden sie durch Zentrifugation bei 4000 g für 15 min bei 4° C sedimentiert. Das Sediment wurde resuspendiert und insgesamt dreimal mit eiskaltem sterilem H₂O_{dest.} gewaschen. Dabei wurde jeweils das Ausgangsvolumen der Kultur verwendet. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit kaltem 15%igen (v/v) Glycerin, bevor die Bakterien schließlich in 2,5 ml kaltem 10%igen (v/v) Glycerin aufgenommen, in 100 µl Portionen aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80° C.

3.9.1.2 Elektroporation

Maximal 10 µl einer gereinigten DNS-Lösung wurden zu 100 µl der auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen pipettiert. Das Bakterien-DNS-Gemisch wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Gen-Pulser (Bio-Rad) mit folgenden Einstellungen: 25µF, 200 W, 2,5 kV/cm. Sofort nach der Elektroporation wurde den Bakterien 1 ml SOC-Medium (10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl, 20 mM Glukose, 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt; pH 7,0) zugegeben. Nach einer 1 h Inkubation bei 37° C unter schütteln wurde der Transformationsansatz ausplattiert. Waren für die Transformation Plasmide verwendet worden, wurden nur geringe Mengen ausplattiert (ca. 20 µl). Wurden Ligationsansätze transformiert, wurde das Volumen des Ansatzes durch Zentrifugation bei 4000 g für 5 min auf etwa 200 µl eingeeengt. Davon wurden 50 und 100 µl ausplattiert.

3.9.2 Chemische Transformation

3.9.2.1 Herstellung von chemischkompetenten Zellen

Die Herstellung von chemischkompetenten Bakterien erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode, die eine Variante der Calciumchlorid-Methode (Cohen *et al.*, 1972; Inoue *et al.*, 1990) darstellt. Zunächst wurden 500 ml LB-Medium mit 1,2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37° C unter Schütteln (200 U/min) bis zu einer OD_{595 nm} von 0,5-0,7 inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4° C. Nach einer Zentrifugation bei 4000 g für 15 min wurde das Sediment in 150 ml TFB I (10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 30 mM K-Acetat pH 5,8, 50 mM

MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend nochmals zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde nun in 20 ml TFB II (10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert. Die Bakterien wurden in 200 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.9.2.2 Chemische Transformation

Die chemische Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Zunächst wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils 20 µl des zu transformierenden Ligationsansatzes zugegeben. Für die Transformation von Plasmid-DNS wurde nur 1 µl der DNS-Lösung eingesetzt. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min folgte ein Hitzeschock bei 42° C für 90 s. Nachdem die Zellen auf Eis abgekühlt waren (ca. 1 min) wurde 1 ml LB- oder SOC-Medium (siehe Punkt 3.9.1.2) zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37° C für etwa 1 h unter Schütteln wurde der Ansatz ausplattiert. Wurden Ligationsansätze transformiert, wurde das Volumen des Ansatzes durch Zentrifugation bei 4000 g für 5 min auf etwa 200 µl eingengt. Davon wurden dann 50 und 100 µl ausplattiert.

3.10 Transformation von *A. fumigatus*

3.10.1 Transformation durch Elektroporation

Die Methode basiert auf einem Transformationsprotokoll, das für *A. nidulans* entwickelt (Sanchez und Aguirre, 1996) und an *A. fumigatus* angepasst wurde (Weidner *et al.*, 1998).

125 ml AMM wurden mit Sporen beimpft, so dass eine Endkonzentration von 2×10^6 - 5×10^6 Sporen/ml vorlag. Nach einer Inkubation bei 37° C unter Schütteln (180 U/min) für 4 h wurden die nun angeschwollenen Sporen durch eine Zentrifugation bei 4000 g für 5 min bei 4° C gesammelt. Nachdem sie in 200 ml eiskaltem Wasser resuspendiert worden waren, folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 4000 g und 4° C. Das Sediment wurde nun in 12,5 ml YED (1% Hefeextrakt, 1% Glukose, 20 mM HEPES; pH 8,0 mit 1M NaOH) aufgenommen und für 1 h bei 30° C bei 100 U/min auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Nochmals wurde unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Die sedimentierten Sporen wurden anschließend in 1 ml eiskaltem EB (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 270 mM Saccharose, 1 mM Li-Acetat) gelöst. Von dieser Lösung wurden nun je 50 µl mit 1-2 µg DNS versetzt. Das maximal einzusetzende Volumen der DNS-Lösung durfte dabei 10 µl nicht überschreiten. Die Proben wurden vor der Elektroporation (1 kV, 400 W, 25 µF) für 15 min auf Eis gehalten. Sofort nach der Elektroporation wurden den Proben je 1 ml eiskaltes YED zugegeben, die Ansätze in gekühlte 15 ml Plastikgefäße überführt,

und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Plastikröhrchen horizontal bei 30° C für 90 min bei 100 U/min geschüttelt. Danach wurden 100, 200 und 700 µl der Ansätze auf AMM-Platten ausplattiert. Nach etwa 36-48 h bei 37° C waren die ersten Transformanden zu sehen.

3.10.2 Transformation von Protoplasten

Die Transformation erfolgte nach einem von Sven Krappmann (persönliche Mitteilung) modifiziertem Protokoll (Punt *et al.*, 1987).

Zunächst wurden 200 ml AMM mit etwa 5×10^6 Sporen/ml beimpft und für etwa 16 h bei 37° C bei 180 U/min inkubiert. Die Ernte des frischen Myzels erfolgte, indem es durch mit Miracloth ausgekleidete Trichter geschüttelt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit Citrat-Puffer (150 mM KCl, 580 mM NaCl, 50 mM Na-Citrat, pH 5,5 mit Citrat) wurde das Myzel im Trichter mit einem Spatel durchmischt, bis es als lockerer Klumpen in einen frischen Erlenmayer-Kolben (Volumen: ca. 300 ml) überführt werden konnte. Dort erfolgte die Resuspendierung in einer frisch zubereiteten Enzymlösung (300 mg Glukanex oder 1280 mg Vinoflow in 20 ml Citratpuffer; sterilfiltriert). Zur Protoplastierung wurde der Kolben nun für 1-2 h bei 50-80 U/min bei 30° C inkubiert. Die Protoplastierung sollte nicht zu weit fortgeschritten sein und wurde mikroskopisch kontrolliert. Um die Protoplasten von Myzelrückständen zu befreien wurde das Gemisch nochmal durch einen mit Miracloth ausgekleideten Filter in ein 50 ml Plastikröhrchen geschüttelt und mit kaltem STC 1700 (1,2 M Sorbitol, 50 mM CaCl_2 , 35 mM NaCl, 10 mM Tris pH 5,5) bis zu einem Volumen von 50 ml nachgewaschen. Das Eluat wurde vor dem Zentrifugieren bei 1500 g für 12 min bei 4° C für etwa 15 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten vorsichtig in STC 1700 resuspendiert und ein weiteres Mal gewaschen. Wieder wurde der Überstand abgeschüttelt und die Protoplasten konnten nun in der restlichen Flüssigkeitsmenge gelöst werden. Dabei sollte sich eine Protoplasten-Konzentration von ungefähr 1×10^9 /ml ergeben. Nun wurden je 100-150 µl dieser Lösung in frische 15 ml Plastikröhrchen überführt, mit bis zu 30 µl DNS-Lösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl PEG-4000-Mix (10 mM Tris pH 7,5; 50 mM CaCl_2 , 60 % (w/v) Polyethylenglycol 4000), welches durch leichtes schwenken mit den Protoplasten vermischt wurde. Es wurden nochmal 250 µl und dann 850 µl PEG-4000-Mix zugesetzt. Während der Transformation wurden die Proben für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das PEG ausverdünnt, indem die Röhrchen nochmal mit STC 1700 aufgefüllt und vermengt wurden. Wieder wurde bei 1500 g für 15 min bei 4° C zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Protoplasten in der restlichen Flüssigkeitsmenge resuspendiert. Zur Stabilisierung wurden die Protoplasten mit 5 ml flüssigem nicht zu heißem AMM-Sorbitol-Weichagar (AMM-Agar 0,7%

(w/v) + 1,2 M Sorbitol) vermengt und auf 25 ml AMM-Sorbitol-Agarplatten (AMM-Agar 2% (w/v) + 1,2 M Sorbitol) aufgegossen. Nach einer Inkubation bei 37° C für 36-48 h waren die ersten Transformanden auf den Platten zu sehen.

Zur Selektion auf Pyrithiamin resistente Pilzklone, wurde auf den AMM-Sorbitol-Agarplatten vor der Verwendung eine Pyrithiamin-Lösung in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml ausplattiert.

3.11 Southern-Blot

Die Methode (Southern, 1975) wurde für *A. fumigatus* angepasst (diese Arbeit). Die Markierung der Sonde wurde mit dem *DIG DNA Labeling Kit* (Roche) durchgeführt. Der Nachweis der Sonde erfolgte mit Hilfe des *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche). Zur Vorbereitung wurde die DNS mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, durch eine EtOH-Fällung gereinigt und auf eine Konzentration von etwa 4 µg/µl angereichert.

Herstellung der DIG- markierten Sonde

Zunächst wurde folgender dNTP-Mix hergestellt: dATP 2mM, dGTP 2mM, dCTT 2 mM, dTTP 1,3 mM sowie eine 0,7 mM DIG-UTP Verdünnung. Unter Verwendung dieser beiden Komponenten wurde eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 120 µl pipettiert. Es folgte die Amplifizierung der Sonde mit einem normalen Standard-PCR-Programm. Dabei betrug die Anlagerungstemperatur 51° C. Um die Spezifität der Starteroligonukleotide zu überprüfen wurde eine zweite, gleiche PCR-Reaktion unter Verwendung eines normalen dNTP-Mixes ohne DIG-UTP-Verdünnung auf ein Agarose-Gel aufgetragen und analysiert.

Gel und Membrantransfer

Ein großes und etwa 1,5 cm dickes 0,7%iges Agarosegel wurde mit 40 µg DNS beladen. Als Größenstandard dienten 6 µl eines DIG markierten Molekulargewichtsstandard (Nr VII, Roche). Das Gel wurde langsam bei 70 Volt aufgetrennt und anschließend für 30 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) inkubiert. Danach wurde es etwa für 30 s mit H₂O gewaschen und anschließend für 2x15 min in Neutralisierungspuffer (3M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5) geschwenkt.

Für den Transfer wurde ein Plastikgefäß mit 10x SSC-Puffer (Stammlsg. 20x: 3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) gefüllt. Auf das Plastikgefäß wurde eine Glasplatte nicht deckend aufgelegt. Auf diese konnte dann ein mit 10x SSC-Puffer getränktes Whatmanpapier gelegt werden. Darauf wurde wieder ein Whatmannpapier gelegt, dessen Enden in das mit Puffer gefüllte Plastikgefäß

reichten. Dies diente als Pufferbrücke. Hierauf wurde nun das Gel luftblasenfrei und falschherum gelegt und mit 10x SSC beträufelt. Um sicherzustellen, dass der Flüssigkeitssog nur durch das Gel laufen kann, wurden die nicht durch das Gel bedeckten Teile des Filterpapiers mit Parafilm abgedichtet. Anschließend wurde eine mit 10x SSC benetzte Membran (Hybond-N+, Nylon Transfer Membran 0,45 µm; Amersham) luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Nachdem zwei weitere trockene Whatmanpapiere auf die Membran geschichtet worden waren, wurde ein Stapel Papierhandtücher darauf gelegt. Zuletzt wurde noch ein Gewicht (ca. 1 kg) auf den Stapel gelegt. Der durch den Flüssigkeitssog bedingte DNS-Transfer erfolgte nun für 16- 24 h, mindestens aber solange, bis ein Großteil des Papiertücherstapels nass geworden war. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz (5 min) in 2x SSC gewaschen, in Folie eingeschlagen und von jeder Seite für etwa 45 s auf einem UV-Transilluminator (254 nm) gelegt. Dies diente der Fixierung der DNS auf der Membran. Anschließend wurde die Membran wieder für 5 min in 2x SSC gewaschen. Sie konnte nun getrocknet und bei RT gelagert oder gleich weiterverwendet werden.

Hybridisierung, Inkubation mit dem Antikörper und Entwicklung

Die Membran wurde mit 10 ml Prä-Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,5% Blockierlösung (Roche), 0,1% N-Laurylsarkosin, 0,02% SDS, 40% Formamid) in einem Hybridisierungsglasrohr bei 42° C für 2 h in einem Hybridisierungsofen gedreht. Dem Prähybridisierungspuffer wurde frisch denaturierte Heringesperma-DNS-Lösung in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Zur Denaturierung war die DNS 5-10 min bei 95° C inkubiert, 5 min auf Eis abgekühlt und sofort eingesetzt worden. Nach der Prähybridisierung erfolgte die Zugabe von 10 ml Hybridisierungspuffer, der 50 µl der ebenfalls frisch denaturierten Sonde (200 ng) enthielt. Nach einer Inkubation für 16 h bei 40° C im Hybridisierungsofen wurde der Puffer abgegossen (kann eingefroren und wiederverwendet werden) und die Membran 2x für je 15 min mit 2x SSC + 0,1% SDS gewaschen. Der nächste Waschschrift erfolgte für 5 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl pH 7,5 0,3% Tween 20). Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, folgte eine 1,5 h Inkubation in Blockierlösung (Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl pH 7,5) + 1% Blockier-Reagenz (Stammlsg.: 10% Blockierlsg. in Maleinsäurepuffer auf 65° C erhitzen → bleibt Opac)). Danach wurde die Membran für 30 min mit 20 ml Antikörperlösung (Blockierlösung + Antikörper 1:10000) inkubiert. Die Membran wurde nochmal 2x15 min mit 100 ml Waschpuffer gewaschen, bevor sie für 2-5 min im Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) equilibriert wurde. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien eingeschlagen und mit 2 ml CSPD-Lösung (CSPD 1:100 in Detektionspuffer) für 5-15 min bei 37° C in der Entwicklungsmappe inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte auf einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film 100NIF, Fujifilm), der

für 3,5 h auf die Membran gelegt wurde. Die Entwicklung erfolgte mit einem Gerät der Firma FujiFilm (FPM 100).

3.12 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen von DNS-Fragmenten wurde von der Firma GATC (Kempten) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes DNAMAN (Lynnon Software).

4. Biochemische Methoden

4.1 Herstellung von Proteinextrakten

4.1.1 Herstellung von *E. coli*-Proteinextrakten

Die Kulturen wurden mittels Zentrifugation (20 min, 4000 g, 4°C) geerntet und anschließend in dem entsprechenden Extraktions-/Waschpuffer in geeigneter Menge resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte in einer Frenchpress (American Instrument Company, Maryland, USA) bei einem Druck von 275 mPa. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 7000 g, 4°C) konnten das Sediment und der Überstand getrennt werden.

4.1.2 Herstellung von *A. fumigatus*-Proteinextrakten

Das in flüssiger Kultur (20 ml) gewachsene Myzel wurde geerntet, indem es durch einen Trichter mit Filterpapier geschüttet wurde. Nach 2-3 maligem waschen mit H₂O wurde das Myzel zwischen zwei Lagen Whatmanpapier getrocknet und eingefroren. Das gefrorene Myzel wurde in vorgekühlten Mörsern in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Etwa 2-3 Spatelspitzen des Pulvers wurden anschließend in vorgekühlte, mit 500 µl Lysepuffer (0,1 M Tris, 50 mM NaCl, 1% Protease-Inhibitor- Cocktail (Sigma), pH 7,5) und Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) gefüllte Plastikgefäße (Lysing Matrix A, MP Biomedicals) gegeben. Im Schüttelhomogenisator Fast Prep 24 (MP Biomedicals) wurden die Plastikgefäße für 25 s bei 5,5 m/s geschüttelt. Anschließend wurden nochmals 100–150 µl Lysepuffer zugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min-1,5 h wurde für 1 min bei RT und 7000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in frische, vorgekühlte 1,5 ml Plastikgefäße (1,5 ml) der Firma Eppendorf gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 9500 g für 15 min bei 4° C. Der nun klare Überstand wurde in ein frisches, gekühltes Plastikgefäß überführt.

4.2 Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 100%iger Trichloressigsäure (TCA). Nach einer Inkubation bei 4° C für 4-16 h konnten die ausgefallenen Proteine durch eine Zentrifugation bei 15 000 g gesammelt werden. Durch einen Waschschrift mit eiskaltem Acton wurde das Sediment von TCA-Resten befreit.

4.3 Denaturierende Reinigung von Proteinen mit His-Tag

Die Reinigung solcher Proteine erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Co²⁺-Matrix (Talon-Matrix, Clontech). Beide in dieser Arbeit überexprimierten Proteine waren in normalem Puffer unlöslich. Daher wurde das Proteinsediment zunächst in 3 ml denaturierendem Extraktions-/Waschpuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl pH 7, 6 M Guanidin-Hydrochlorid) in Lösung gebracht. Derweil wurden 0,8 ml Talon-Matrix 2x mit je 5 ml des gleichen Puffers äquillibriert. Die Zentrifugation der Talon-Matrix erfolgte bei 700 g für 5 min bei RT. Zur Bindung der His-Tag Proteine an die Matrix wurde die Proteinlösung gemeinsam mit der Matrix für 2,5 h bei 4° C auf einem Rollator inkubiert. Ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch drei je 5 minütige Waschschriffe mit denaturierenden Extraktions-/Waschpuffer+5 mM Imidazol entfernt. Zur Elution der gebundenen His-Tag-Proteine wurden 1,5 ml Elutionspuffer (denat. Extraktions-/Waschpuffer+150 mM Imidazol) für 1 h bei 4° C rollend mit der Talonmatrix inkubiert. Dieser Schritt wurde 2x wiederholt. Um die denaturierenden Bedingungen im Extraktionspuffer zu eliminieren, erfolgte vor der Weiterverarbeitung eine Dialyse der eluierten gereinigten Proteine. Dafür wurden 0,5 ml der Proteinlösung in Microdialyse-Kassetten mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Slide-A-Lyzer 10 K, Pierce Biotechnologie) gegeben und für 16 h bei 8° C gegen 900 ml PBS (0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,15 g Na₂HPO₄, 8 g NaCl; ad 1000 ml H₂O_{dest.}; pH 7,4; sterilfiltrieren) dialysiert.

4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad). Zur Eichung wurde Rinderserumalbumin verwendet. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.5 Crosslinking

Für die *Crosslinking*-Versuche wurden 20 ml YG_r-Medium mit 2×10^5 Sporen/ml beimpft und für 19 h angezogen. Aus dem entstandenen Myzel wurde ein Proteinextrakt in folgendem Puffer hergestellt: 100 mM Na-Phosphat pH 7,2, 150 mM NaCl. Insgesamt wurden folgende vier *Crosslinker* verwendet: EGS [Ethylen-Glycolbis(Succinimidylsuccinat)] Stammlösung: 20 mM in DMSO, Sulfo-EGS [Ethylen-Glycolbis(Sulfosuccinimidylsuccinat)] Stammlösung 10 mM in DMSO, DSP (Dithiobis[succinimidylpropionat]) Stammlösung 20 mM in DMSO und BS³ [Bis(sulfosuccinimidyl)Suberat] Stammlösung 10 mM in PBS (siehe Punkt 4.3). Jeder Reaktionsansatz von insgesamt 40 µl setzte sich aus Proteinlösung, Puffer (PBS) und *Crosslinker* (Endkonzentration: 2 mM) zusammen. Die verwendete Proteinkonzentration betrug laut Bradford-Test 130 µg. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Quench-Lösung (1 M Tris, pH 8) gestoppt. Um die Stabilität der *Crosslinker* zu gewährleisten wurden die Proben in einem SDS-Auftragspuffer aufgekocht, der nur 0,5% statt 5% β-Mercaptoethanol enthielt.

4.6 Gelfiltration (Größenausschluss-Chromatographie)

YG_r-Medium wurde mit etwa 5×10^4 Sporen/ml beimpft und für 25 h angezogen. Das entstandene Myzel wurde unter Verwendung eines Tris-Puffers (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 180 mM NaCl, 1 % Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)) zu einem Proteinextrakt verarbeitet. Vor der Gelfiltration wurde der Proteinextrakt durch mehrmaliges Zentrifugieren von größeren Partikeln und Proteinaggregaten befreit: 10 min bei 10000 g, 4° C und 2 mal 10 min bei 21000 g, 4° C. Ein Aliquot von 50 µl, das laut Bradford-Proteinbestimmungstest 150 µg Protein enthielt wurde auf ein Gelfiltrationssäule „Superdex 200“ (GE Healthcare Life Science, Freiburg) geladen. Der Durchfluss wurde in 50 µl Fraktionen gesammelt, durch ein 15 % SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Für den Eichlauf der Säule wurden folgende Proteine mit bekannter Größe verwendet: Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β-Hämolyisin (200 kDa), BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,2 kDa).

4.7 Differentielle Zentrifugation von Hyphenproteinextrakten

Zunächst wurden 20 ml YG-Medium mit 2×10^5 Sporen/ml beimpft und für 22 h inkubiert. Der aus dem gewachsenen Myzel hergestellte Proteinextrakt wurde stets auf Eis inkubiert und zunächst für 15 min bei 15 000 g und 4° C zentrifugiert. Das entstandene Sediment und der Überstand wurden getrennt und es folgte eine zweite Zentrifugation für 45 min bei 43 500 g und 4° C

(*Optima TL Ultracentrifuge*; Rotor: TLA-100.2; Beckmann). Wieder wurden Überstand und Sediment getrennt.

4.8 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gel)

Die von der Ladung unabhängige Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mithilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die verwendeten Polyacrylamid Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Konzentration des Trenngels betrug je nach Bedarf 12 oder 15%. Für die Auftrennung der Proteine in Gelkammern (BioRad) wurde folgender Laufpuffer verwendet: 30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS ad 1 l H₂O_{dest.}. Vor der Verwendung wurden die Proteinproben mit Probenpuffer (100 mM Tris, pH 8,8, 10% Glycerin, 10% SDS, 100 mM MgCl₂, 5% β-Mercaptoethanol, 0,001% Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 95° C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 12 000 g und RT zentrifugiert. Um in jeder Spur gleiche Proteinmengen auftragen zu können, wurden der Proteingehalt der jeweiligen Proben mit Hilfe des Bradford-Tests zueinander ins Verhältnis gesetzt. Durch Mitführen eines Molekulargewichtsstandards (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, BioRad) konnte nach der Färbung der Proteine deren Größe abgeschätzt werden. Zum Einlaufen der Proteine ins Sammelgel wurde eine Spannung von 130 Volt angelegt. Danach wurde die Spannung auf bis zu 160 Volt erhöht.

Zur Detektion der Proteine wurden die Gele 4 h–16 h in einer Coomassie-Färbelösung (2 g Coomassie Brilliant Blue R (Serva), 100 ml Eisessig, 450 ml Methanol, 450 ml H₂O_{dest.}) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Coomassie durch Inkubation mit Entfärber (100 ml Eisessig, 400 ml Methanol, 500 ml H₂O_{dest.}) wieder entfernt.

4.9 Messung des Sauerstoffverbrauchs von *A. fumigatus*-Kulturen

Die Durchführung des Experiments erfolgte in 50-ml-Erlenmayer-Kolben, die mit einem Sauerstoffsensor versehen waren. Den Kolben wurden entweder 30 ml YG_F-Medium oder 30 ml Wasser sowie ruhende Konidien (10⁸) zugesetzt, bevor sie luftdicht verschlossen wurden und unter schütteln bei 37°C inkubiert wurden. Die Sauerstoffkonzentration der Kulturen wurde unter Verwendung der Fibox 3 (*fiberoptic oxygen meter*; Presens, Regensburg) gemessen.

5. Immunologische Methoden

5.1 Western-Blot

Zur immunologischen Untersuchung von Proteinen mit spezifischen Antisera wurden die Proteine zunächst durch ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Porenweite 0,45µm, Schleicher & Schuell) erfolgte in einer „*Semidry-Elektroblotting*-Kammer“ (BioRad; Owl HEP-3, Thermo Scientific). Der Western-Blot wurde wie folgt von der Anodenseite beginnend luftblasenfrei aufgebaut: Zuunterst lagen drei Lagen Whatmann-Filterpapier. Darauf wurde die Nitrocellulosemembran gelegt, auf die dann das Gel gebettet wurde. Ganz oben lagen wieder drei Whatmann-Filterpapiere. Alle Bestandteile des Blots waren zuvor in Blottpuffer (5,8 g Tris; 2,9 g Glycin; 0,37 g SDS; 300 ml Methanol; ad 1000 ml H₂O_{dest.}) getränkt worden. Der Proteintransfer wurde bei 2,5 mA pro cm² Membran und maximaler Spannung für 1,5 h durchgeführt. Durch eine Ponceau-Rot-Färbung konnte die Übertragung der Proteine auf die Membran bei Bedarf kontrolliert werden und desweiteren konnte anschließend die Lage bestimmter Proteinbanden auf der Membran mit Bleistift markiert werden. Dafür erfolgte eine kurze Inkubation (ca. 1 min) der Membran in Ponceau-Rot-Lösung (2,5 g Ponceau-S Red; 400 ml Methanol; 150 ml Eisessig; 450 ml H₂O_{dest.}) und anschließend mehrere Entfärbungsschritte mit H₂O. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese in einem sauberen Gefäß, das ausschließlich zum Blotten verwendet wird in TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20) mit 1,5% Milchpulver für 1 h geschwenkt. Sollte der Inkubationsschritt über Nacht erfolgen, wurde er bei 8° C durchgeführt. Anschließend wurde das Puffer-Milch-Gemisch abgeschüttet und es folgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Kommerziell erhältliche Antikörper wurden nach Herstellerangaben in TBS-T verdünnt (ca. 1:2000- 1:10000). Kulturüberstände von spezifischen Antikörper produzierenden Hybridomzelllinien wurden 1:2 in TBS-T verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1-18 h. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für je fünf Minuten wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, der 1:2000 in TBS-T verdünnt wurde, für 1-18 h inkubiert. Nochmals wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBS-T gewaschen. Da die verwendeten sekundären Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren, erfolgte die Entwicklung der Membran durch Inkubation in Glycinpuffer (0,1 M Glycin pH 10, 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂), in dem 1 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) frisch gelöst worden war.

5.2 Nachweis von Proteinen mittels ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

5.2.1 Bestimmung der Immunglobulinsubklasse monoklonaler Antikörper mittels ELISA

Die Bestimmung der Immunglobulinsubklasse erfolgte im ELISA unter Verwendung der „*Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents*“ (Sigma). Eine ELISA-Maxisorb-Platte mit 96 Vertiefungen wurde mit den verschiedenen Antikörper-Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM,) in einer Verdünnung im Verhältnis 1:1000 in Carbonatpuffer (0,1 M NaHCO₃; pH 9,6) mit je 100 µl befüllt. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt sowie Negativkontrollen ohne Antikörper-Isotypen mitgeführt. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 4° C. Nicht an die Platte gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl TBS-T (siehe 5.1) entfernt. Die Absättigung der Bindungsstellen erfolgte für 30 min mit je 200 µl 3% BSA in TBS-T. Anschließend wurden 100 µl der Hybridomzellkulturüberstände, die die zu testenden Antikörper enthalten, zugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert. Wieder wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Der sekundäre Antikörper (αMaus IgG+M) wurde 1:1000 in Carbonatpuffer verdünnt und es wurden je 100 µl zupipettiert. Nach 1 h bei RT wurde dreimal mit je 200 µl TBS-T gewaschen. Bei dem verwendeten sekundären Antikörper handelte es sich um Konjugat mit alkalischer Phosphatase. Deswegen erfolgte die Entwicklung des ELISA durch Zugabe einer Phosphatase-Substrat-Lösung. Dafür wurde eine Tablette des Phosphatase-Substrats (Sigma) in 5 ml ELISA-Entwicklungspuffer (9,7 ml Diethanolamin, 100 µl 1 M MgCl₂, ad 1000 ml H₂O_{dest.} pH 9,8) gelöst, je Vertiefung wurden 100 µl des Gemischs zupipettiert. Die positive Reaktion, eine Gelbfärbung der Lösung, wurde anschließend in einem ELISA-Reader (*Sunrise Reader*, Tecan) bei 405 nm quantifiziert.

5.2.2 Nachweis von Il-10 und TNFα mittels ELISA

Primäre, murine Knochenmarksmakrophagen des Mausstammes C57Bl6 (Quelle: Andrea Kotz, München) wurden in eine Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen in einer Konzentration von 2,5x10⁵ Zellen pro Vertiefung gesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5x10⁶ *A. fumigatus* Sporen/Vertiefung. Rechnerisch kamen somit 10 Pilzsporen auf einen Makrophagen. Nach einer Inkubation von 18 h in DMEM bei 37° C wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA unter Verwendung des Kits „*DuoSet IL10*“ (R&D Systems) auf die Anwesenheit von IL-10 (Interleukin 10) und TNFα (Tumornekrosefaktor) untersucht.

5.3 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Analysen wurden mit einem „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“ (FACS)-Gerät (Canto II, BD) durchgeführt. Mithilfe dieser Methode können optische Eigenschaften einzelner Zellen bzw. Partikel einer Suspension untersucht werden. In diesem Fall wurde durch die Markierung von Antigenen auf der Oberfläche von Sporen und Beads mit fluoreszierenden Antikörpern die Fluoreszenzintensität einzelner Sporen oder Beads bestimmt und analysiert. Dafür wurde stets ein α -Maus IgG/M-Cy3 gekoppelter, sekundärer Antikörper verwendet.

Vorbereitung der Proben

Je 1×10^7 Sporen wurden für 10 min mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Sporenoberfläche durch Zugabe von 300 μ l 5%igem Ziegen Serum. Der primäre Antikörper wurde für 1 h bei 30° C unter leichtem schütteln mit den Sporen inkubiert. Nun folgten zwei Waschschrte mit PBS, bevor die Sporen mit dem sekundären Antikörper (Cy3) für 30 min unter leichtem Schütteln bei 30° C inkubiert wurden. Wieder wurde zweimal mit PBS gewaschen. Die anschließend in 1 ml PBS resuspendierten Sporen wurden für die Messungen eingesetzt. Alle notwendigen Zentrifugationsschritte erfolgten für 5-10 min bei 11 500 g.

An die verwendeten Kontroll-Beads (Polybeads 6.0 micron Microspheres; Polysciences Inc.) wurde zunächst ein rekombinant hergestelltes zu CipC homologes Protein (NrpA) aus *A. fumigatus* gekoppelt. Dazu wurden 20 μ l der Beads entweder mit 1,2 ml reinem PBS (Kontrolle) oder mit 1,2 ml NrpA-PBS-Gemisch (200 μ l Proteidlösung + 1 ml PBS) vermengt und bei 37° C für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Die nun vorbereiteten Beads wurden sowohl in fixierter als auch in unfixierter Form wie die Sporen (siehe oben) weiterbehandelt. Alle Zentrifugationen der Beads erfolgten für 10 min bei 8760 g bei 4° C.

6. Zellbiologische Methoden

6.1 Generierung von Hybridomzelllinien zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Immunisierung der Mäuse:

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

- Tag 1: Injektion von 250 µl Antigenlösung (PBS) emulgiert mit 250 µl Freund`schem Adjuvans (Sigma)
- Tag 14: Injektion wie am Tag 1
- Tag 28: Injektion von 250 µl Antigenlösung ohne Zugabe des Adjuvans
- Tag 32: Entnahme der Milz und Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Anschneiden des Organs und anschließendes durchspülen mit einer Spritze

Isolierung der Lymphocyten

Durch Begasung mit CO₂ wurden die Mäuse getötet und anschließend das Fell an den Hinterläufen abpräpariert. Die direkt unter dem Kniegelenk sitzenden (politealen) Lymphknoten wurden vorsichtig aus dem umgebenden Gewebe geschnitten und in einer Petrischale mit sterilem Hanks-Puffer (Seromed) gesammelt. Nachdem noch vorhandene Gewebereste entfernt waren, wurden die Lymphknoten noch zweimal in frischen Petrischalen mit Hanks-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie angeschnitten und zwischen den angerauhten Seiten zweier steriler Objektträger zerrieben. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Plastikröhrchen gegeben. Nachdem sich große Gewebereste abgesetzt hatten, wurden der Überstand in ein frisches 50-ml-Röhrchen überführt.

Zellfusion:

Am Tag der Fusion wurden etwa 10-12 dicht bewachsene Petrischalen mit der murinen Myelomzelllinie P3-X63-Ag8 in RPMI-Medium (Invitrogen) benötigt. Die Zellen müssen sich zum Zeitpunkt der Fusion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die aus den Schalen gelösten Zellen wurden in 50 ml Plastik-Röhrchen der Firma Falcon überführt und bei 1000 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden sie einmal mit HEPES-Medium (DMEM-Medium (Invitrogen) mit 25 mM HEPES) gewaschen, in frischem HEPES-Medium aufgenommen und auf das Lymphozytensediment pipettiert. Die Zelltypen wurden beim Resuspendieren vermischt und nochmals bei 200 g (RT) für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment durch leichtes Schwenken aufgelockert. Die Zellen wurden während der Fusion mit Hilfe eines Wasserbades auf 37° C gehalten. Innerhalb einer Minute wurde nun tröpfchenweise 1 ml Polyethylenglycol 4000-Lösung (5g PEG 4000 werden bei 60° C in 5 ml HEPES-Medium gelöst, pH 7,4; Sterilfiltration 0,2 µm) auf das Zellsediment gegeben. Dabei wurde das Röhrchen leicht geschüttelt. Nach einer weiteren Minute erfolgte die Ausverdünnung der PEG-4000-Lösung durch langsame Zugabe von HEPES-Medium nach folgendem Schema: zunächst 1 ml innerhalb von 30 s, dann 3 ml innerhalb von 30 s und schließlich 16 ml innerhalb von 1 min. Nach einer 5 min Inkubation bei 37° C wurden die Zellen bei 200 g für 5 min zentrifugiert,

das Sediment in Selektionsmedium (Kulturmedium Opti-MEM (Invitrogen) + 10 mg/500 ml Hypoxanthin (Invitrogen) und 0,75 mg Azaserin/500 ml (Sigma)) aufgenommen und auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen verteilt. Nicht fusionierte Lymphozyten sind in Zellkultur ohne weitere Stimulation nicht lebensfähig und sterben bald ab. Auch die Myelomzellen, die eigentlich als Krebszellen unsterblich sind, können in diesem Selektionsmedium nicht lange alleine überleben, da Azaserin den Hauptsyntheseweg der Purinbasen blockiert und die verwendete Zelllinie wegen eines Enzymdefekts (es fehlt die Hypoxanthin-Guanin-Phosphorybosyl-Transferase) nicht in der Lage ist, aus Hypoxanthin über einen Nebensyntheseweg Purinbasen zu synthetisieren. Somit können nur Fusionszellen aus einem Lymphozyten und einer Myelomzelle überleben. Der Lymphozyt besitzt das benötigte Enzym und die Myelomzelle verfügt über eine uneingeschränkte Vitalität. Nach der Fusion wurden die Zellen noch für etwa drei Wochen im Selektionsmedium kultiviert.

Durchmusterung der Fusionsüberstände

Nach etwa zehn Tagen wurden die Zellkulturüberstände von bewachsenen Vertiefungen im Western-Blot getestet. Dafür wurde das verwendete Antigen in einem SDS-Gel mit nur einer Tasche aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Die Membranen wurden in Miniblotkammern der Firma Biometra eingespannt. Diese Miniblotkammer teilt die Membran vertikal in 14 getrennte Bereiche, die jeweils durch eine Kammer umgeben sind. Dadurch ist es möglich, zeitgleich 14 verschiedene Kulturüberstände zu testen. Durch das kleine Volumen der Kammer reichen schon geringe Mengen des Überstands (ca. 100-130 µl) für den Test aus. Klone, deren sezernierter Antikörper im Überstand positiv auf das Antigen reagiert hatten, wurden auf größere Kulturgefäße expandiert und eingefroren. Je Fusion wurden 2-3 Klone subkloniert.

Subklonierung der Hybridomzellklone

Um eine homogene Zelllinie zu erhalten, die aus nur einer Einzelzelle hervorgegangen ist, wurden die Zellklone subkloniert. Dafür wurden sie zunächst in einer Neubauerzählkammer gezählt und mit Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von 1 Zelle, 10 Zellen und 100 Zellen/ml verdünnt. Dem dazu verwendeten OptiMEM-Medium (Invitrogen) wurden 2% *Hybridoma Cloning Factor* (HCF; PAA) zugesetzt. Diese Substanz stimuliert das Wachstum von einzelnen Zellen und erleichtert somit das Anwachsen von Einzellzellklonen. Mit jeder Verdünnungsstufe wurde eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit je 100 µl befüllt. Nach etwa 10 Tagen konnten die Überstände von Vertiefungen mit nur einem gewachsenen Klon im Western-Blot getestet werden. Klone, deren Überstände positiv reagierten, wurden expandiert und eingefroren. Weiterhin wurde ein Klon als Standard-Antikörperproduzent ausgewählt. Von diesem Klon wurden größe-

re Mengen Zellkulturüberstand hergestellt, welcher in 50-ml-Plastikröhrchen bei -20° C gelagert wurde.

6.2 Mikroskopische Untersuchungen

6.2.1 Mikroskopie von fixierten Präparaten

6.2.1.1 Fixierung von mikroskopischen Präparaten

Zur Fixierung wurde den Sporen oder Hyphen von *A. fumigatus* für 10 min 3,7% Formaldehyd in PBS (siehe 4.3) zugesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnten die Präparate nach Bedarf weiterverarbeitet werden.

6.2.1.2 Immunfluoreszenz von *A. fumigatus* Hyphen

Frisch angezogene *A. fumigatus* Hyphen wurden durch mechanische Behandlung fragmentiert, fixiert und anschließend mit reinem PBS gewaschen. Da in diesem Versuch ein intrazelluläres Protein (NrpA) nachgewiesen werden sollte, wurde die Zellwand der Hyphen durch einen Verdau (60 mg Ovalbumin + 30 mg *Lysing Enzymes* (Sigma) + Hyphenfragmente in 300 µl PBS) für 1 h bei 37° C für die Antikörper durchlässig gemacht. Nachdem die Hyphen zwei Mal mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Permeabilisierung der Membran durch eine Behandlung mit 0,5 ml 0,2%igem Triton X 100 in PBS für 1 min bei RT. Wieder wurden die Hyphen mit PBS gewaschen, bevor sie mit Hilfe der Cytospin 3 (Shandon) auf einen Objektträger zentrifugiert wurden (1800 U/min; 10 min; RT). Zur Fixierung der Hyphen auf dem Objektträger wurden diese etwa 30-60 min bei 37° C getrocknet. Anschließend erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen auf den Hyphen durch eine 30 min Behandlung mit 2%igem Ziegenerum in PBS in einer feuchten Kammer bei 37° C. Die Flüssigkeit wurde abgeschüttelt. Die Präparate wurden nun entweder mit dem primären αNrpA Antikörper K93 E7 oder mit PBS für 30 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Waschen wurde der Objektträger in frisches PBS getaucht und sanft geschwenkt. Nun erfolgte die Inkubation der Präparate mit dem 1:100 in PBS verdünnten sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Ziege αMaus Cy3, Dianova). Nochmals wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Als Schutz vor dem Austrocknen wurde Einbettmedium (*Fluoro Gard™ Antifade Reagent*, BioRad) auf die Hyphen pipettiert, ein Deckgläschen darübergelegt welches anschließend mit Nagellack luftdicht versiegelt wurde. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (DM LB, Leica). Mithilfe einer CCD-Kamera (MicroMax), gesteuert durch die Metamorph-Software (Version 4.5, Universal Imaging), konnten Bilder der Präparate aufgenommen werden

6.2.2 Mikroskopie von lebenden Präparaten

6.2.2.1 Nachweis von aktiven Mitochondrien in *A. fumigatus* Sporen

1,5 ml vorgewärmtes YG_F-Medium wurde mit 4×10^5 ruhenden Sporen und 1 μ M MitoTracker RED CM-H₂XRos (Molecular Probes) versetzt und in spezielle Plastikmikroskopierschälchen gefüllt (MatTek Corp., Ashland, MA). Anschließend wurde die Probe bei 37° C in einem *Life-Cell*-Mikroskop (Perkin Elmer) inkubiert und über mehrere Stunden analysiert.

6.2.2.2 Lebendmikroskopie von *A. fumigatus*

Für die Beobachtung von *A. fumigatus* unter einem konfokalen *Life-Cell*-Mikroskop (SP-5, gesteuert durch die *Leica Application Suite Imaging-Software*; Leica Microsystems) wurden spezielle 8-Kammer-Plastikmikroskopierschälchen verwendet (μ -Slide 8 well; Ibidi). Jede Kammer wurde mit 200 μ l Medium, das zuvor mit 4×10^4 Sporen/ml beimpft worden war, befüllt. Sollten Hyphen beobachtet werden, wurden die Mikroskopierschälchen für 16-20 h bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Beobachtung von Sporen erfolgte sobald sich diese am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten. Während des Beobachtungszeitraumes konnten die Präparate in einer Inkubationskammer des Mikroskopes bei 37° C gehalten werden. GFP wurde durch eine Anregung mit einem Argon-Laser sichtbar gemacht. Mithilfe eines Photomultiplier konnten die Präparate bildlich festgehalten werden. Durch die Übereinanderlagerung mehrerer Z-Ebenen eines Objekts wurde eine 3D-Darstellung erzielt. Um Zeitrafferfilme von Präparaten aufzunehmen, wurden von bestimmten Bereichen in regelmäßigen Abständen Bilder gemacht. Zur Markierung der DNS wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) verwendet. Dazu wurde ein Einbettmedium verwendet, das DAPI enthält (VECTASHIELD, Vector Laboratories, USA). Durch eine Anregung mit ultraviolettem Licht (365 nm) wurde die Fluoreszenz nachgewiesen.

Um den Einfluß von H₂O₂ auf die Lokalisation des NrpA-GFP-Fusionsproteins zu testen, wurden den einzelnen Kammern des Mikroskopier-Schälchens entweder 0, 0,6, 6 oder 12 μ l einer 1:100 verdünnten H₂O₂-Lösung (30% v/v) zugegeben. Dies resultierte in H₂O₂-Endkonzentrationen von 0, 0,3 mM, 3 mM und 6 mM H₂O₂. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Hyphen wurden die Präparate mit einer Propidiumjodid-Lösung (25 μ g/ml) behandelt. Da Propidiumjodid membranimpermeabel ist, dringt es nur in tote Hyphen ein.

7. Bioinformatische Methoden

Zur bioinformatischen Analyse von Proteinsequenzen wurden folgende Computer-Programme verwendet: PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>), MitoProtII-v1.101 (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>), PSORT II und WoLF PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) (Horton *et al.*, 2006).

8. Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Sigma-Aldrich, Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England), Molecular Probes (Invitrogen, Darmstadt), Biomol (Hamburg), Calbiochem (Merck, Darmstadt), Serva (Heidelberg), Difco (Becton Dickinson, New Jersey, USA) und Boeringer Ingelheim Bioproducts (Heidelberg) bezogen. Soweit möglich wurden sie im Reinheitsgrad „*pro analysis*“ (p. a.) bzw. „reinst“ verwendet. Enzyme stammten, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Madison, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Qiagen (Hilden). Die verwendeten Antikörper stammten aus Eigenproduktion oder von der Firma Dianova (Hamburg).

C. Ergebnisse

1. Das zu CipC homologe Protein aus *A. fumigatus*

Ein *A. fumigatus*-Protein mit Homologie zum CipC-Protein aus *A. nidulans* war vor Beginn der Arbeit in mit Coomassie gefärbten 2D-Gelen von Pilzextrakten verschiedener *A. fumigatus*-Morphotypen als prominentes hyphen spezifisches Protein identifiziert worden (Schwienbacher, 2005). In dieser Arbeit sollte die biologische Funktion dieses differentiell exprimierten Proteins genauer untersucht werden.

1.1 Sequenzanalysen

Auch unter Zuhilfenahme von unterschiedlichen Programmen konnten keine funktionellen Domänen innerhalb des CipC-ähnlichen Proteins aus *A. fumigatus* gefunden werden. Allerdings verfügen alle Proteine dieser Familie über einen konservierten Histidin-Rest (*Pfam entry* 12585; DUF 3759). PROSITE identifizierte zwei potentielle Myrestilierungsstellen. Allerdings werden diese Motive sehr häufig gefunden und haben daher nur eine begrenzte Aussagekraft. Laut einer Lokalisationsvoraussage durch „PSORT II“ ist das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit im Cytoplasma zu finden (nach *Reinhardt's method for cytoplasmic/nuclear discrimination*; Zuverlässigkeit: 89). Laut „WoLF PSORT“ könnte das Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern zu finden sein (*kNN*-Methode: Kern: 10,0; Cytoplasma-Kern: 9,5; Cytoplasma 7,0). Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins lieferten die Sequenz-Analysen mit verschiedenen verwendeten Programmen nicht.

Unter Verwendung des Algorithmus BlastP wurde die Datenbank nach Proteinen durchsucht, die starke Homologien zu AFUA_5G09330 aufweisen. Dabei ließen sich homologe Proteine ausschließlich in Pilzen finden. Eine Durchmusterung von Pilzgenomen bei der „Fungal Genom Initiative“ ergab, dass CipC-ähnliche Proteine in den meisten filamentösen Pilzen verbreitet sind, während sie in Hefen weniger häufig vorkommen. Um die Verteilung und Häufigkeit der *cipC*-ähnlichen Gene in verschiedenen Pilzen darzustellen, wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Als Grundlage diente dabei eine Phylogenie, die auf 42 pilzlichen Genomen basiert (Fitzpatrick *et al.*, 2006). *CipC*-ähnliche Gene werden innerhalb der Zygomycota, der Basidiomycota und der Ascomycota gefunden. Innerhalb der sogenannten „CTG Klade“ der Saccharomycotina kommen *cipC*-ähnliche Gene in einigen *Candida*-Spezies und in *Debaryomyces hansenii* vor. Ansonsten gibt es innerhalb dieser Gruppe keine zu *cipC*-ähnlichen Gene. Innerhalb der Pezizomycota wurden *cipC*-ähnliche Gene in 13 von 17 vorhandenen Genomen gefunden. Bei den Pezizomycota ohne ein *cipC*-Gen handelt es sich um den Schimmelpilz *Chaetomium globosum*, der besonders als

Weichfäule-Erreger an Holz bekannt ist, sowie um die dimorphen pathogenen Pilze *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* und *Paracoccidioides brasiliensis*. Interessanterweise verfügt ein naher nicht pathogener Verwandter von *C. immitis*, nämlich *Uncinocarpus reesii*, über ein *cipC*-ähnliches Gen. In den meisten Pilzen ist nur eine Kopie des *cipC*-Gens vorhanden, allerdings gibt es hierbei einige Ausnahmen. *Aspergillus clavatus* und einige *Candida*-Spezies tragen zwei Kopien des Gens innerhalb ihres Genoms, vier homologe Gene existieren in *Aspergillus oryzae*, während in *Rhizopus oryzae* sogar sieben homologe Gene vorhanden sind. Zwei dieser sieben homologen *R. oryzae*-Gene kodieren allerdings für Proteine mit über 300 Aminosäuren, wohingegen alle anderen CipC-ähnlichen Proteine aus 109-150 Aminosäuren aufgebaut sind. Die dieser Analyse zugrunde gelegte Phylogenie (Fitzpatrick *et al.*, 2006) enthielt die Genome von *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavus* nicht, weshalb diese beiden Genome einer separaten Analyse unterzogen wurden. Dabei ergab sich, dass es in *A. niger* zwei und in *A. flavus* sechs zu *cipC* homologe Gene gibt.

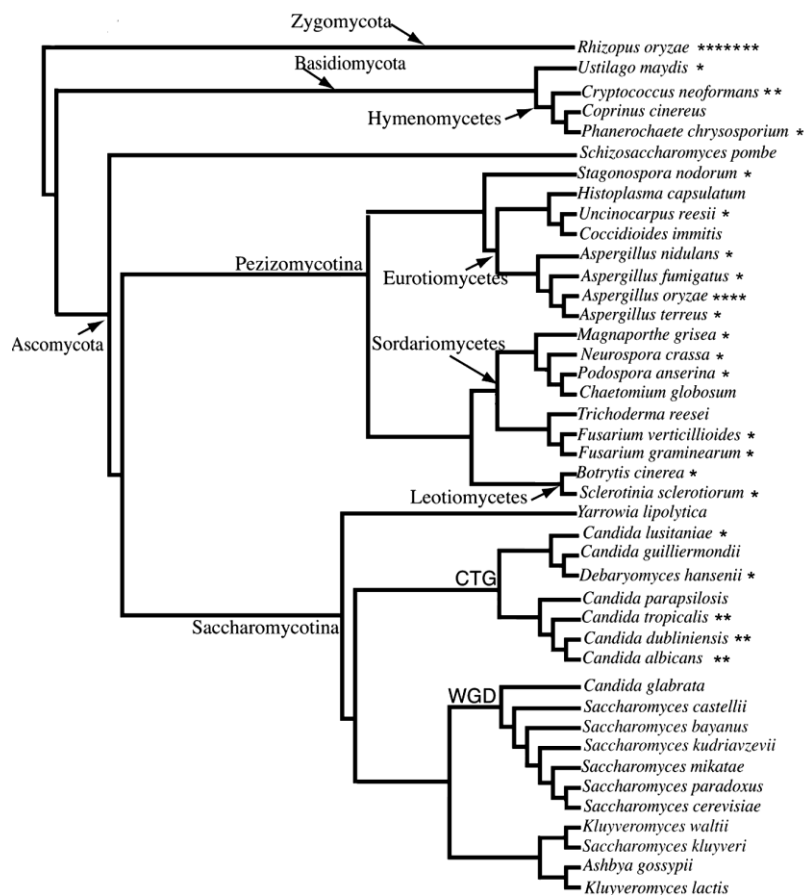


Abb. 4: Phylogenetische Analyse von CipC-ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Pilzen

Der phylogenetische Baum basiert auf 42 vollständigen Pilzgenomen (Fitzpatrick *et al.*, 2006). Die Sterne stehen für die Anzahl der CipC-ähnlichen Proteine innerhalb eines Genoms (Abb. aus Bauer *et al.*, 2010).

Weiterhin wurde ein phylogenetischer Baum mit den 17 CipC-ähnlichen Proteinen erstellt, die innerhalb der Genome von *A. fumigatus*, *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus terreus* gefunden worden waren. Dabei zeigte sich, dass zwei Kladen klar von einander getrennt sind: Die eine Klade enthält neben AFU_5G09330 auch homologe Proteine aller anderen Aspergilli, mit Ausnahme von *A. nidulans*. In der zweiten Klade befinden sich auch Proteine aller Spezies außer von *A. fumigatus* und *A. terreus*. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen des CipC-ähnlichen Proteins aus *A. fumigatus* und CipC aus *A. nidulans* entspricht nur 49%.

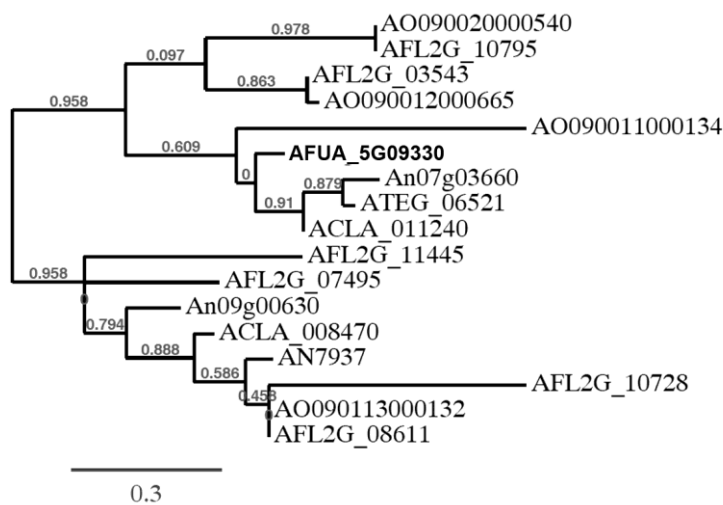


Abb. 5: Phylogenetische Analyse von CipC und CipC-ähnlichen Proteinen in verschiedenen Aspergilli

Die Abbildung zeigt einen phylogenetischen Baum von 17 CipC-ähnlichen Proteinen aus *A. fumigatus* (AFUA_5G09330), *A. clavatus* (ACLA_011240; ACLA_008470), *A. flavus* (AFL2G_10795, AFL2G_03543, AFL2G_11445, AFL2G_07495, AFL2G_10728, AFL2G_08611), *A. nidulans* (AN7937), *A. niger* (An07g03660, An09g00630), *A. oryzae* (AO090020000540, AO090012000665, AO090011000134, AO090113000132) und aus *A. terreus* (ATEG_06521). (Abb. aus Bauer *et al.*, 2010)

1.2 Untersuchungen zur Bildung des CipC-ähnlichen Proteins in *A. fumigatus*

Um die Funktion des CipC-ähnlichen Proteins in *A. fumigatus* besser zu verstehen, sollte die Bildung des Proteins mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht werden. Dafür war es zunächst nötig, Antikörper gegen dieses Protein herzustellen. Im folgendem wird zur Vereinfachung für das zu CipC homologe Protein aus *A. fumigatus* die Abkürzung ChP (CipC homologes-Protein) verwendet.

1.2.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Chp aus *A. fumigatus*

1.2.1.1 Amplifizierung des *chp*-Gens, sowie Überexpression und Reinigung des abgeleiteten Proteins

Zunächst wurden aus der Genomsequenz des *A. fumigatus*-Stammes 293 Starteroligonukleotide abgeleitet (Nr. 144 und 145), mit welchen das 392 Bp große Gen aus cDNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert wurde. Dadurch konnte der Nachweis erbracht werden, dass das putative Gen tatsächlich als Leserahmen dient. Die entsprechende Sequenz wurde in der Datenbank veröffentlicht (embl accession: AM086260.1; [gi:90855304]). Anschließend wurde das gereinigte DNS-Fragment ungerichtet in den Expressionsvektor pQE30-UA kloniert. Die richtige Orientierung des klonierten Gens im Vektor konnte mittels PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Nach Transformation des entsprechenden Plasmids in den Expressionstamm *E. coli* M15 pRep wurde Chp durch Zugabe von 1 mM IPTG zum Kulturmedium heterolog überexprimiert. Die durch dieses Expressionssystem generierten Proteine erhalten einen N-terminalen Hexa-His-Tag, der durch die Vektorsequenz bedingt ist und wodurch sie um 2,1 kDa größer sind als die nativen Proteine. Mit einer Größe von ca. 17 kDa entsprach das in *E. coli* M15 pRep gebildete Chp mit Hexa-His-Tag der rechnerisch vorausgesagten Größe. Mit Hilfe des His-Tags konnte das Protein mittels Affinitätschromatographie an einer Co^{2+} -Talon-Matrix aufgereinigt werden. In diesem Fall wurde die Aufreinigung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, da das heterolog produzierte Chp in den *E. coli*-Lysaten überwiegend in unlöslicher Form vorlag. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, konnte das rekombinante Protein zum großen Teil bei der ersten Elution mit 150 mM Imidazol im Elutionspuffer von der Matrix gelöst werden. Vor der Immunisierung von zwei Mäusen mit dem gereinigten Protein wurde das Eluat dialysiert, um die denaturierenden Reagenzien im Elutionspuffer zu eliminieren.

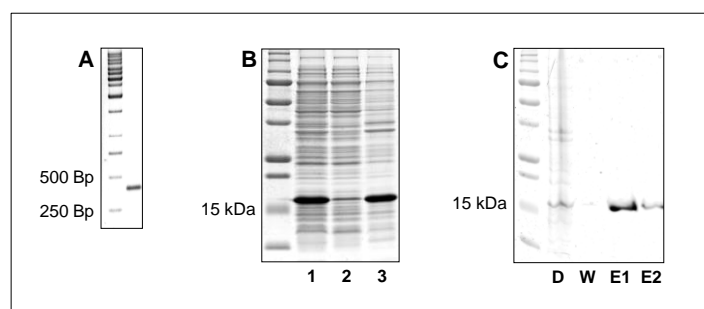


Abb. 6: Amplifizierung des *chp*-Gens, sowie Überexpression und Aufreinigung des abgeleiteten Proteins

Das 392 Bp große *chp*-Gen wurde aus cDNA von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert (A). Das abgeleitete, etwa 17 kDa große Protein konnte in *E. coli* M15 pRep durch Zugabe von 1 mM IPTG heterolog überexprimiert werden (B1). Nach einer Zentrifugation war es kaum im Überstand (B2) aber zum großen Teil im Sediment (B3) zu finden. Deswegen wurde das unlösliche Protein unter denaturierenden Bedingungen an einer Co^{2+} -Säule aufgereinigt (C). Die größte Menge des Proteins konnte bei der ersten Elution (E1) von der Säule gelöst werden. B und C zeigen 12%ige mit Coomassie gefärbte SDS-Gele der entsprechenden Proteinextrakte.

1.2.1.2 Die hergestellten monoklonalen Antikörper gegen Chp aus *A. fumigatus* sind spezifisch

Das gereinigte Chp wurde nun zur Immunisierung von zwei Balb/C Mäusen eingesetzt, deren Lymphozyten mit Myelomzellen der Zelllinie P3-X63-Ag8.653 fusioniert wurden. Aus dieser Fusion gingen 174 Hybridomzellklone hervor. Von deren Kulturüberständen reagierten im Western Blot 26 positiv gegen das aufgereinigte Chp. Fast alle positiven Überstände reagierten auch gegen das native Chp aus *A. fumigatus*. Einige dieser doppelt positiven Zellklone wurden cryokonserviert. Zudem wurden zwei der doppelt positiven Hybridomzellklone durch Subklonierung vereinzelt, um eine Zellpopulation zu erhalten, die mit Sicherheit nur auf einer Einzelzelle basiert und deren sezernierte Antikörper deswegen nur eine Spezifität besitzen. Die Fähigkeit der Subklone, spezifische Antikörper zu bilden, wurde nochmals untersucht und wieder wurden einige der positiven Zellklone cryokonserviert. Ein Subklon, nämlich der Klon K93 E6, wurde für diese Arbeit als Standard-Antikörperproduzent verwendet. Der von diesem Klon gebildete Antikörper gehört zur Immunglobulinsubklasse IgG1, was mithilfe eines ELISAs geklärt wurde.

Um die Spezifität des Antikörpers in Western-Blot-Analysen nachzuweisen wurde ein Proteinextrakt aus Myzel von *A. fumigatus* ATCC 46645, das für 24 h in YG-Medium gewachsen war, hergestellt. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, erkennt der hergestellte monoklonale Antikörper gegen Chp nur ein Protein mit passender Größe und bildet auf der Membran eine distinkte Bande. In den folgenden Abbildungen werden daher nur noch Teilbereiche der Membranen gezeigt.

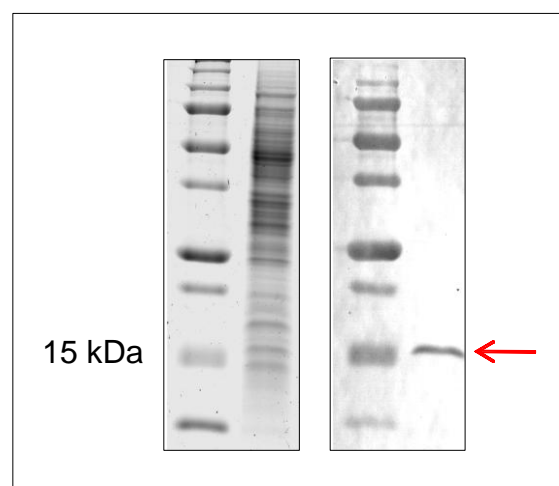


Abb. 7: Die hergestellten monoklonalen Antikörper gegen Chp aus *A. fumigatus* sind spezifisch

In YG-Medium gewachsenes Myzel wurde zu Proteinextrakten verarbeitet und entweder in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) oder einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Der spezifische Antikörper K93 E6 erkannte auf der Membran nur ein etwa 15 kDa großes Protein, das mit einem roten Pfeil gekennzeichnet wurde.

1.2.2 Etablierung einer geeigneten Methode zur Herstellung von Proteinextrakten von *A. fumigatus* bei geringem Probenvolumen

Die im Labor etablierte Standardmethode zur Herstellung von Proteinextrakten von *A. fumigatus* im MSK-Schüttelhomogenisator war einerseits nur für Probenvolumina über 50 ml geeignet und andererseits auch nicht mit mehreren Proben gleichzeitig durchführbar. Gerade für die anstehenden Western-Blot-Analysen war es aber notwendig, mit kleinen Volumina und vielen Proben gleichzeitig zu arbeiten, so dass eine neue Methode etabliert werden musste. Das Mörsern von Myzel in flüssigem Stickstoff in Anwesenheit von Quarzsand lieferte zum Teil recht gute Ergebnisse. Allerdings konnte die Qualität der Extrakte innerhalb eines Experiments, obwohl alle Proben gleich behandelt wurden, stark variieren. Manche Extrakte enthielten kaum Protein oder die Proteinbanden waren auf einem SDS-Gel nur als diffuser Schmier zu sehen, andere Extrakte dagegen waren von ausreichender Qualität. Somit war diese Methode insgesamt auch ungeeignet. Mit einem Schüttelhomogenisator (MP Fast Prep 24), der für kleine Probenvolumina geeignet ist, konnten nach Protokollanpassungen geeignete Extrakte hergestellt werden. Sowohl Konidien als auch Pilzmyzel, das in Minimalmedium mit bestimmten N-Quellen oder sonstigen Mangelbedingungen gewachsen ist, lassen sich deutlich schlechter aufschließen als in Vollmedium gezogenes Myzel. Gerade der Aufschluss dieser Proben war auch mit dem Schüttelhomogenisator problematisch. Erst die Durchführung einer Kombinationsmethode (genaue Durchführung siehe Material und Methoden), bei der gefrorenes Myzel zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert wird und das pulverisierte, in Puffer gelöste Myzel anschließend noch im Schüttelhomogenisator behandelt wird, lieferte geeignete und innerhalb eines Versuches sehr gut vergleichbare Ergebnisse.

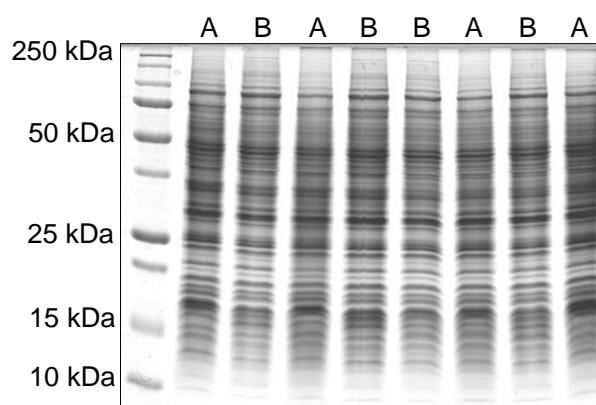


Abb. 8: Die neu etablierte Methode zur Herstellung von Proteinextrakten von *A. fumigatus* liefert Extrakte von guter Qualität, die innerhalb eines Experiments vergleichbar sind

Myzel von *A. fumigatus*, das in AMM mit 20 mM Nitrat (A) oder 20 mM Glutamat (B) als N-Quellen gewachsen war, wurde nach einer neu etablierten Methode zu Proteinextrakten verarbeitet. Diese wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

1.2.3 Das Chp-Protein aus *A. fumigatus* kann nur in Hyphen, nicht aber in Sporen oder auskeimenden Sporen nachgewiesen werden

Chp aus *A. fumigatus* war in 2D-Gelelektrophorese Studien als differentiell exprimiertes Protein, das nur in Proteinextrakten der Hyphen, nicht aber in Extrakten aus Sporen oder auskeimenden Sporen zu finden ist, beschrieben worden (Schwienbacher, 2005). Nun sollte überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse mit Hilfe des spezifischen Antikörpers in Western-Blot-Studien bestätigen lassen. Um Proteinextrakte der verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich ruhende Sporen, auskeimende Sporen oder Hyphen von *A. fumigatus* ATCC 46645 herzustellen, wurden je 50 ml YG-Medium mit 5×10^5 Sporen pro ml angeimpft und für 0 h, 8 h oder 26 h Stunden inkubiert. Die hergestellten Proteinextrakte wurden dann einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen Antikörper K 93 E7 unterzogen. Dabei war nur in der Proteinfraction der Hyphen ein Protein mit etwa 15 kDa auf der Membran detektierbar.

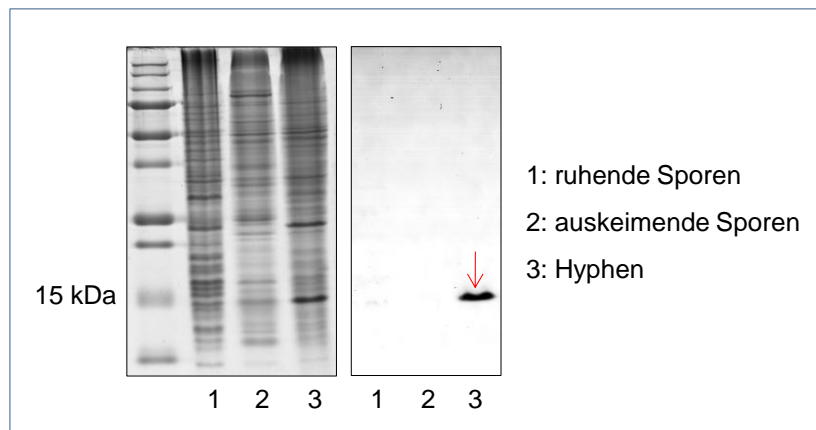


Abb. 9: Immunologischer Nachweis von Chp in verschiedenen Morphotypen von *A. fumigatus*

Proteinextrakte von ruhenden Sporen (1), von auskeimenden Sporen (2) und von Hyphen (3) wurden einerseits in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und zum anderen einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K96 E7 unterzogen (rechts). Der Pfeil markiert ein in der Hyphenfraktion detektiertes Protein. (Abb. modifiziert nach Bauer *et al.*, 2010).

In einer Studie, die die Zusammensetzung der Sporenhülle des *A. fumigatus*-Stammes D141 untersucht hatte, war Chp auch in Extrakten der Sporenhülle gefunden worden (Asif *et al.*, 2006). Dieser Befund stand somit im Widerspruch zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten. Um nun mit Sicherheit klären zu können, ob Chp auch auf der Oberfläche der Konidien von *A. fumigatus* lokalisiert ist oder nicht, wurden zusätzlich FACS-Analysen mit Sporen durchgeführt. Durch die Verwendung von Sporen von zwei verschiedenen *A. fumigatus*-Stämmen (ATCC 46645 und D141) sollten zudem stammspezifische Expressionsunterschiede von Chp ausgeschlossen werden. Zunächst wurden die Sporen fixiert und dann alternativ mit den Antikörpern K93 E6 oder

K237 inkubiert, die beide Chp erkennen. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern sollte sicherstellen, dass ein negatives Ergebnis nicht auf ein möglicherweise unzugängliches Epitop zurückzuführen ist. Die im Versuch verwendeten sekundären Antikörper waren mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelt und ermöglichten somit eine durchflusszytometrische Untersuchung der Proben. Als positive Kontrolle diente ein Kaninchenserum, das Antikörper gegen *A. fumigatus*-Konidien enthält. Da die verwendeten primären Antikörper in verschiedenen Tieren generiert worden waren (Kaninchen/Maus), mussten auch zwei verschiedene sekundäre Antikörper verwendet werden. Eine unspezifische Bindung der beiden sekundären Antikörper wurde durch nur mit dem sekundären Antikörper behandelte Kontrollansätze ausgeschlossen. Die Oberfläche der Sporen von beiden *Aspergillus*-Stämmen wurde von keinem der beiden Antikörper erkannt. Antikörper aus dem als positive Kontrolle verwendeten Kaninchenserum reagierten dagegen mit den Sporen von beiden Stämmen. Somit scheint Chp nicht auf der Sporenoberfläche von *A. fumigatus* ATCC 46645 oder D 141 lokalisiert zu sein.

Um zu beweisen, dass beide α Chp-Antikörper für die Durchflusszytometrie geeignet sind, wurde das rekombinante gereinigte Chp an Kunststoff-Beads gekoppelt. Als negative Kontrollen dienten dabei Beads, an die kein Protein gekoppelt worden war, sowie Ansätze, die nur mit den sekundären Antikörpern behandelt wurden. Beide α Chp-Antikörper erkannten das an die Beads gekoppelte Chp (Abb. 10). Diese Erkennung war weder auf eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers, noch auf eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers an die Beads zurückzuführen. Somit sind beide α Chp-Antikörper für die Durchflusszytometrie geeignet. Da die im Versuch verwendeten Sporen zum Abtöten mit 3,7% Formaldehyd vorbehandelt wurden und diese Vorbehandlung die Bindungsfähigkeit von monoklonalen Antikörper beeinträchtigen kann, musste zudem geklärt werden, ob die Antikörper auch mit Formaldehyd behandeltes Antigen erkennen können. Dafür wurde der gleiche Versuch unabhängig auch mit Beads durchgeführt, die zuvor mit Formaldehyd behandelt worden waren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fixierung keine negative Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit der verwendeten Antikörper hat (Daten nicht gezeigt).

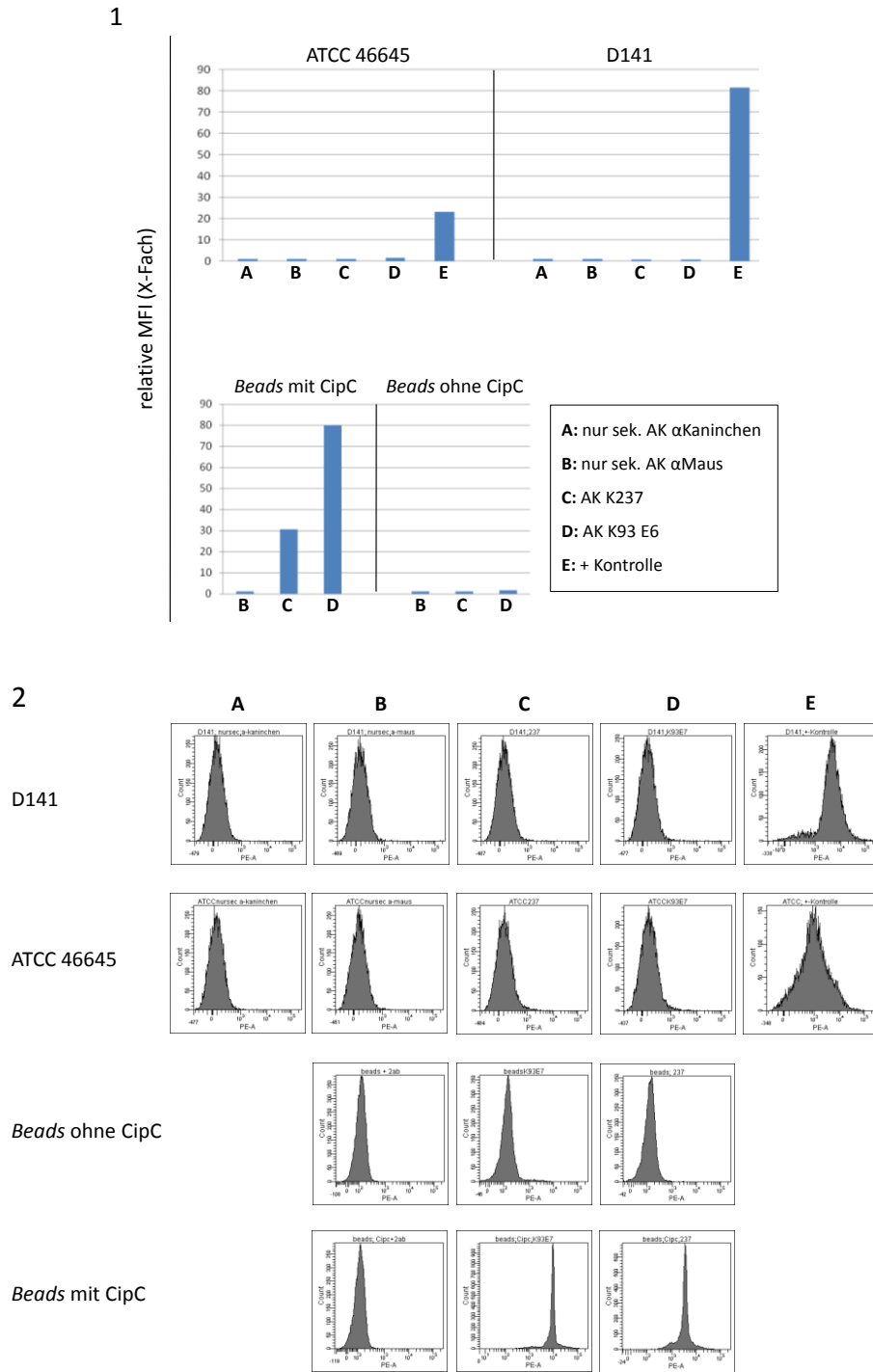


Abb. 10: Durchflusszytometrische Untersuchungen von *A. fumigatus* ATCC 46645 und D141 auf das Vorhandensein von Chp auf der Sporenoberfläche

Zwei unterschiedliche Antikörper gegen das Chp, nämlich K237 (C) und K93 E6 (D), erkannten auf der Oberfläche der Konidien von *A. fumigatus* ATCC 46645 und *A. fumigatus* D141 kein Antigen. Antikörper aus einem als positive Kontrolle verwendeten Kaninchenserum erkannten die Konidien beider Stämme problemlos (E). An Kunststoff-Beads gekoppeltes, rekombinant hergestelltes Chp wurde von beiden Antikörpern (C, D) erkannt. Diese Detektion war auf nicht beschichteten Beads nicht zu beobachten. Beide verwendeten sekundären Antikörper (A, B) reagierten nicht unspezifisch. In den oben gezeigten Säulendiagrammen (1) ist die relative mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) als X-faches der Fluoreszenzintensität, der nur mit den sekundären Antikörpern behandelten Ansätze (A, B) dargestellt. Die unten gezeigten Histogramme (2) zeigen hier beispielhaft für alle weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen die Originaldaten.

Die ruhenden Sporen von *A. fumigatus* sind von einer hydrophoben Proteinschicht, der sogenannten „Rodlet-layer“, ummantelt. Diese Ummantelung schützt die Sporen u.a. vor Makrophagen, da bestimmte Erkennungsstrukturen verdeckt werden. Mit dem zuvor durchgeführten Versuch kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Chp möglicherweise von der „Rodlet-layer“ verdeckt wird und deswegen von den Antikörpern nicht erkannt wurde. Daher wurde die durchflusszytometrische Untersuchung zusätzlich mit einer *A. fumigatus* $\Delta rodA$ -Mutante durchgeführt. Diese ist aufgrund einer Deletion des *rodA*-Gens nicht mehr in der Lage, die „Rodlet-layer“ zu bilden. Der Versuch wurde in gleicher Weise wie der vorherige Versuch durchgeführt. Auch in diesem Versuch konnten beide für Chp spezifischen Antikörper weder auf den Sporen des ATCC-Stammes noch auf den Sporen der $\Delta rodA$ -Mutante ihr Antigen erkennen. Zusammen mit den Immunblot-Untersuchungen der verschiedenen Morphotypen (Abb. 9) zeigen diese Daten eindeutig, dass Chp weder unterhalb, noch oberhalb der „Rodlet-layer“ zu finden ist und hyphenspezifisch ist.

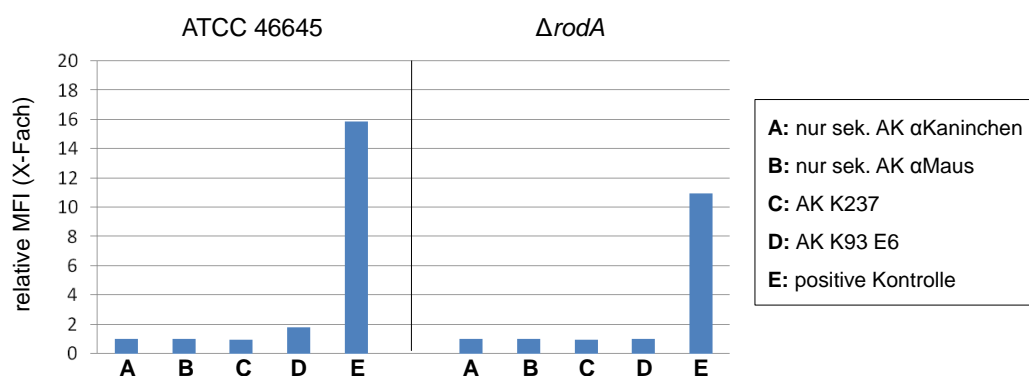


Abb. 11: Durchflusszytometrische Untersuchungen von *A. fumigatus* $\Delta rodA$ auf das Vorhandensein von Chp auf der Sporenoberfläche

Zwei gegen Chp gerichteten Antikörper, K237 (C) und K93 E6 (D), erkennen weder auf der Oberfläche der Konidien von *A. fumigatus* ATCC 46645 noch auf der Oberfläche der *A. fumigatus* $\Delta rodA$ Mutante, die nicht mehr in der Lage ist eine „Rodletlayer“ auszubilden, ein Protein. Antikörper aus einem als positive Kontrolle verwendeten Kaninchen Serum erkannten die Konidien beider Stämme problemlos (E). Beide verwendeten sekundären Antikörper (A, B) reagierten nicht unspezifisch. In oben gezeigtem Säulendiagrammen ist die relative mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) als X-Faches der Fluoreszenz-Intensität, der nur mit den sekundären Antikörpern behandelten Ansätze (A, B) dargestellt.

1.2.4 Das Chp-Protein aus *A. fumigatus* scheint cytosolisch zu sein

Wie bereits erwähnt ist Chp aus *A. fumigatus* laut einer Lokalisationsvorhersage mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein cytosolisches Protein. Um diese Vorhersage zu untersuchen, wurde ein Hyphenproteinextrakt einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Dabei folgte zuerst eine Zentrifugation für 15 min bei 15 000 g und 4° C. Dieser Zentrifugationsschritt sollte zur Sedimentation von Zellkernen, des Cytoskeletts, der Mitochondrien, der Lysosomen und

Peroxisomen führen (Koolman und Röhm, 2002). Nachdem das entstandene Sediment und der Überstand getrennt worden waren und ein Aliquot des Überstands für die anschließende Western-Blot-Analyse abgenommen worden war, wurde die Probe für 45 min bei 43 500 g und 4° C zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt sollte eine vollständige Sedimentation der oben genannten Zellbestandteile gewährleistet werden. Der Überstand dieser zweiten Zentrifugation sollte dadurch nur noch folgende Zellbestandteile enthalten: Plasmamembranteile, Fragmente des Endoplasmatischen Retikulums, kleine Vesikel, Mikrosomen, Ribosomen, Zytoplasma und Makromoleküle. Zur anschließenden Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K93 E6 standen nun also vier Proben zur Verfügung: Die sedimentierten Proteine der Zentrifugationen bei 15 000 g und 43 500 g sowie die löslichen Fraktionen dieser beiden Zentrifugationsschritte. Das Chp-Protein sedimentierte weder bei der Zentrifugation von 15 000 g noch bei der von 43 500 g. Es war aber jeweils im Überstand nachweisbar.

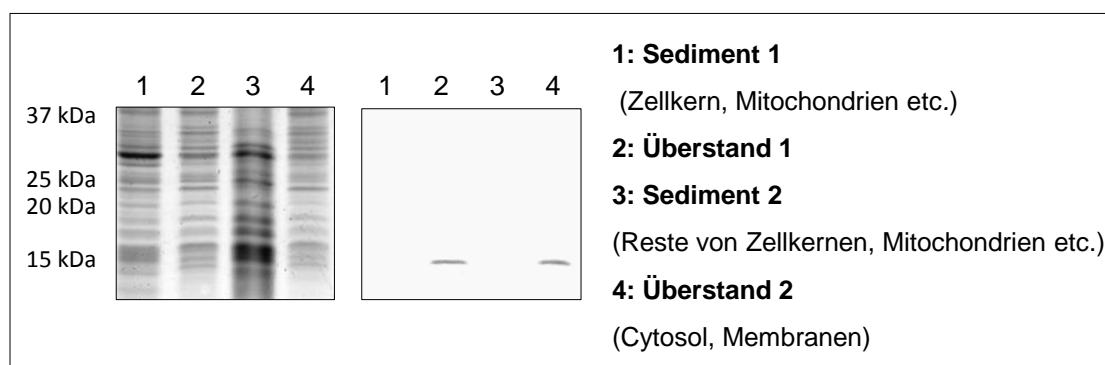


Abb. 12: Differentielle Zentrifugation eines Proteinextrakts von *A. fumigatus* und anschließender immunologischer Nachweis von Chp

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* wurde einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 15 000 g bei 4° C wurden Sediment (1) und Überstand (2) getrennt. Durch eine zweite Zentrifugation des Überstands für 45 min bei 43 500 g und 4° C konnten wieder Sediment (3) und Überstand (4) getrennt werden. Die vier Proben wurden auf einem 15%igem SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt (links) sowie für Western-Blot-Analysen (rechts) mit dem spezifischen Antikörper K93 E6 eingesetzt.

1.2.5 Das Chp-Protein aus *A. fumigatus* scheint als Monomer in den Hyphen vorzuliegen

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob Chp aus *A. fumigatus* ATCC 46645 mit sich selbst oder mit anderen Proteinen interagiert. Dafür wurde ein Hyphenproteinextrakt von *A. fumigatus* einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Der Säulendurchlauf wurde in 30 Fraktionen gesammelt und mittels einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen α Chp-Antikörpers K93 E6 analysiert. Das Chp-Protein wurde dabei in den Fraktionen 18, 19 und

20 nachgewiesen. Laut dem Eichlauf korrespondieren diese Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 12-29 kDa. Die Analyse zeigt, dass Chp unter diesen experimentellen Bedingungen nicht Teil einer größeren Struktur ist, ließ aber keine Aussage darüber zu, ob das Protein als Monomer oder als Dimer vorliegt oder mit einem anderen kleinen Protein interagiert.

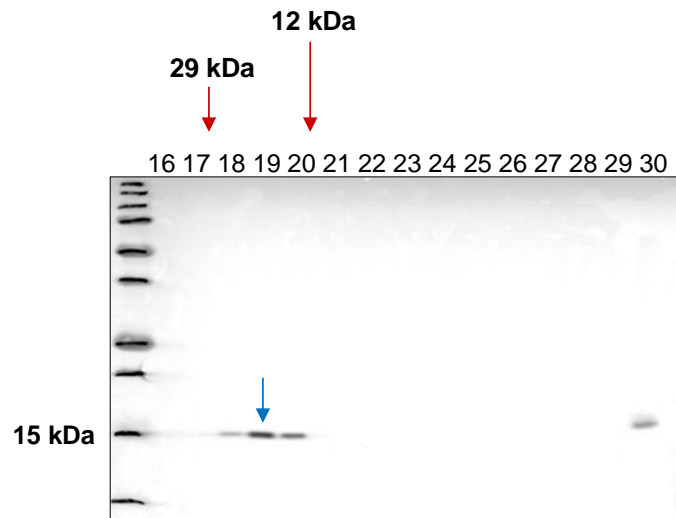


Abb. 13: Gelfiltrationsanalyse eines Proteinextrakts von *A. fumigatus* unter Verwendung eines spezifischen α Chp-Antikörpers

Dieser Western Blot zeigt die gesammelten Fraktionen 16-29 einer Gelfiltration eines Hyphenproteinextrakts von *A. fumigatus* ATCC 46645. Der spezifische α Chp-Antikörper K93 E6 erkannte sowohl in der Kontrolle (30) als auch in den Fraktionen 18-20 ein Protein mit einer Größe von ca. 15 kDa (blauer Pfeil). Zwei Eichproteine (12 kDa: Cytochrom C; 29 kDa Carboanhydrase) eluierten in den mit roten Pfeilen markierten Fraktionen.

Zur weiteren Klärung wurden zusätzlich *Crosslinking*-Experimente durchgeführt. Dafür wurde ein Hyphenproteinextrakt von *A. fumigatus* mit insgesamt vier verschiedenen *Crosslinkern* (Endkonzentration je 2 mM), nämlich EGS, Sulfo-EGS, DSP und BS³, versetzt. In den folgenden Western-Blot-Analysen erkannte der α Chp-Antikörper K93 E6 sowie der unabhängig verwendete α Chp-Antikörper K137 (Daten nicht gezeigt) in keinem Ansatz eine Proteinbande mit einem höheren Molekulargewicht als 15 kDa. Die Membranen wurden anschließend noch mit einem gegen die ribosomalen Proteine P0 (etwa 34 kDa), P1 (etwa 12 kDa) und P2 (etwa 12 kDa) gerichteten Antikörper behandelt. Diese Proteine besitzen eine gemeinsame Sequenz, gegen die der monoklonale Antikörper B8 C4 gerichtet ist, und bilden bekanntermaßen einen etwa 60 kDa großen Komplex (Santos und Ballesta, 2002), der unter den gewählten Bedingungen auch in allen Ansätzen, die mit einem *Crosslinker* versetzt waren, nachgewiesen werden konnte. Das Chp aus *A. fumigatus* scheint also als Monomer vorzuliegen. In der folgenden Abbildung werden beispielhaft nur die mit EGS behandelten Proteinextrakte gezeigt.

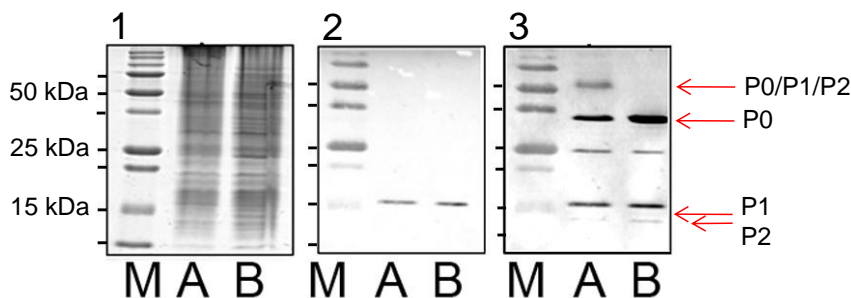


Abb. 14: Crosslinking-Experimente mit einem *A. fumigatus*-Proteinextrakt und anschließender immunologischer Nachweis von Chp

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* ATCC 46645 wurde entweder mit dem *Crosslinker* EGS versetzt (A) oder als Lösungsmittelkontrolle mit den gleichen Mengen DMSO behandelt (B). Die Proben wurden zum einen auf einem 15%igen SDS-Gel (1) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt und zum anderen einer Western-Blot-Analyse (2, 3) unterzogen. Zunächst wurde die Membran mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K93 E6 behandelt (2) und anschließend mit einem zweiten Antikörper (B8 C4), der gegen die ribosomalen Proteine P0, P1 und P2 gerichtet ist, inkubiert (3). Ein Molekulargewichtsstandard (M) ist dargestellt. Die Positionen von P2, P1 (beide 11,1 kDa) und P0 (33,4 kDa), sowie die des aus P0, P1, P2 gebildeten Komplexes (55,6 kDa) sind mit roten Pfeilen markiert. (Abb. modifiziert nach Bauer *et al.*, 2009).

1.2.6 Die Bildung von Chp wird in *A. fumigatus* in Anwesenheit von Concanamycin A nicht induziert

Für *A. nidulans* war bereits vor Beginn dieser Arbeit beschrieben worden, dass CipC in Anwesenheit von Concanamycin A verstärkt gebildet wird (Melin *et al.*, 2002). Dieser Befund führte auch zur Benennung des Proteins als Concanamycin A induziertes Protein C (CipC). Darum sollte als nächstes untersucht werden, ob diese Beobachtung auf das zu CipC homologe Protein aus *A. fumigatus* übertragbar ist. Die Durchführung des Versuchs orientierte sich dabei an der oben genannten Publikation. Es wurden 50 ml Erlenmeyerkolben mit 8 ml YNB-Medium gefüllt und mit 2×10^5 Sporen/ml beimpft. Nach einer Inkubation für 24 h erfolgte die Zugabe von 160 μ l Concanamycin A (gelöst in Methanol in einer Konzentration von 1 mg/ml). Dies resultierte in einer Endkonzentration von 20 μ g Concanamycin A pro ml Medium. Den Kontrollkulturen wurde entweder nur Methanol oder gar nichts zugesetzt. Noch einmal wurden die Kulturen für 24 h inkubiert und das entstandene Myzel anschließend zu Proteinextrakten verarbeitet. In Western-Blot-Analysen unter Verwendung des spezifischen α Chp-Antikörpers K93 E6 konnte kein Expressionsunterschied von Chp in Anwesenheit von Concanamycin A im Vergleich zu den Kontrollkulturen nachgewiesen werden (Abb. 15). Verschiedene Versuchsvarianten, z. B die Verwendung anderer Medien (AMM und YG_f) oder eine andere Animpfdichte (5×10^4 Sporen/ml) sowie eine kürzere Vorinkubation des Pilzes (20 h), veränderten das Ergebnis nicht (Daten nicht gezeigt). Auch die Funktionalität von Concanamycin A war gegeben, da der für *A. nidulans* beschriebene Wachstumsphänotyp, nämlich die Bildung von kurzen, dicklichen und stark verzweigten

Hyphen (Bowman, 1997), in *A. fumigatus* mikroskopisch beobachtet werden konnte. Der Versuch, die verstärkte Bildung des CipC-Proteins von *A. nidulans* in Anwesenheit von Concanamycin A auf Western-Blot-Ebene darzustellen, scheiterte, da keiner der von uns hergestellten monoklonalen Antikörper eine Kreuzreaktion gegen das CipC-Protein zeigte. Aufgrund dieser Daten ist der Name CipC für das homologe Protein aus *A. fumigatus* nicht geeignet.

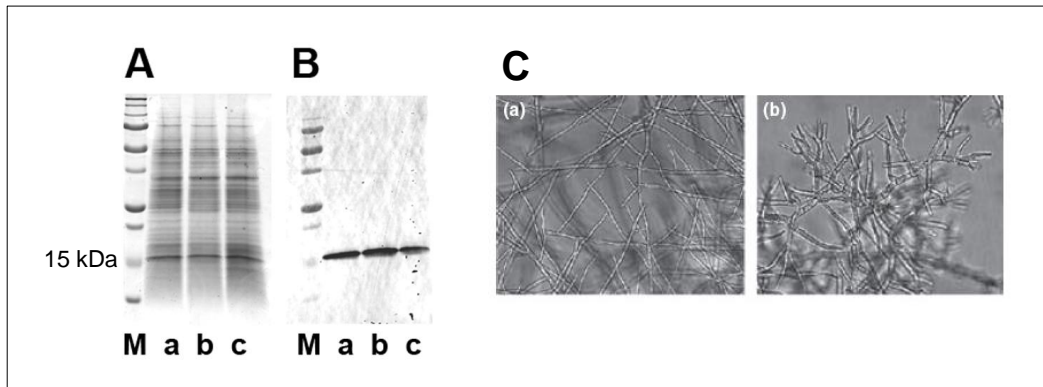


Abb. 15: Immunologischer Nachweis von Chp in Anwesenheit von Concanamycin A

A. fumigatus wurde für 24 h in YNB Medium angezogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µg/ml Concanamycin A (a). Eine Lösungsmittelkontrolle (Methanol) ist unter b dargestellt, c zeigt eine unbehandelte Kontrolle. Nach weiteren 24 h wurde das Myzel geerntet und die daraus hergestellten Proteinextrakte wurden zum einen auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (A) und zum anderen für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K93 E6 eingesetzt (B). Lichtmikroskopische Aufnahmen von Hyphen in An- (a) oder Abwesenheit (b) von Concanamycin A sind unter C dargestellt. (Abb. nach Bauer *et al.*, 2010).

1.2.7 Die Bildung von Chp ist von der Stickstoffquelle abhängig

Literaturrecherchen ergaben, dass das zu *cipC* homologe Gen aus *Fusarium fujikuroi* in Abhängigkeit der N-Quelle exprimiert wird (Teichert *et al.*, 2004). Deswegen sollte als nächstes geklärt werden, ob diese Beobachtung auch für das homologe Protein aus *A. fumigatus* gilt. Je 20 ml AMM mit unterschiedlichen N-Quellen (20 mM Glutamat, Glutamin, Ammonium oder Natrium) wurden mit 5×10^5 Sporen/ml beimpft und für 32 h inkubiert. Die aus dem entstandenen Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K93 E6 eingesetzt. Chp konnte nur in Anwesenheit der N-Quellen Ammonium und Glutamin nachgewiesen werden. Handelte es sich bei den verwendeten N-Quellen um Nitrat oder Glutamat, war Chp nicht nachweisbar. Dabei war die Bildung des Chp-Proteins in Anwesenheit von Ammonium meist noch stärker als in Anwesenheit von Glutamin. Somit ist die Bildung von Chp von der N-Quelle abhängig. Aufgrund dieser Ergebnisse wird das Protein im Folgenden als „Nitrogen regulated protein A“ (NrpA) bezeichnet.

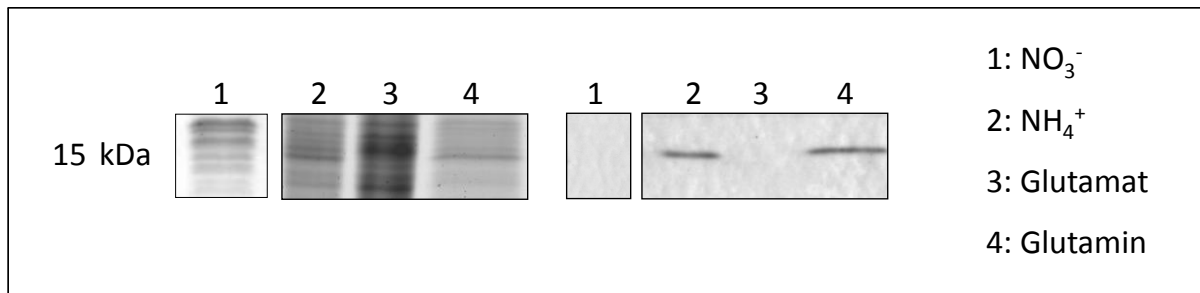


Abb. 16: Nachweis der Chp-Bildung in *A. fumigatus* in Anwesenheit verschiedener N-Quellen

A. fumigatus wurde in AM-Medium, das unterschiedliche N-Quellen (1: Nitrat; 2: Ammonium; 3: Glutamat; 4: Glutamin) in einer Konzentration von je 20 mM enthielt, angezogen. Die daraus entstandenen Proteinextrakte wurden zum einen in einem 15%igem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links). Zum anderen wurden sie einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α Chp-Antikörper K93 E6 unterzogen (rechts).

In einigen Western Blots war aufgefallen, dass NrpA in Anwesenheit der N-Quelle Glutamin meist schwächer exprimiert wird als in Anwesenheit von Ammonium. In einem ganz anderen Zusammenhang wurde eine Glutaminase (ca. 75 kDa) von *A. fumigatus* als ein bei Wachstum in Collagen-Medium sekretiertes Protein identifiziert (L. Heesemann, persönliche Mitteilung). Glutaminasen sind hydrolytische Enzyme, die bei der Spaltung von Glutamin zu Glutamat und Ammonium führen. Dadurch wäre es möglich, dass im Medium befindliches Glutamin von *A. fumigatus* durch eine sekretierte Glutaminase gespalten wird und anschließend Glutamat und Ammonium durch den Pilz aufgenommen werden. Diese wohl energetisch aufwendigere Verstoffwechslung von Glutamin im Vergleich zu Ammonium könnte eine mögliche Erklärung für die Expressionsunterschiede von NrpA sein. Zunächst sollte nun also überprüft werden, ob *A. fumigatus* die Glutaminase in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden N-Quelle ins Medium sekretiert. Dafür wurden je 200 ml AMM, das entweder 20 mM Glutamin oder 20 mM Ammonium als N-Quelle enthielt mit 4×10^6 Sporen/ml beimpft und für 65 h inkubiert. Das Medium wurde anschließend vom Myzel getrennt und einer TCA-Fällung unterzogen. Die resuspendierten Proteinsedimente wurden auf einem 12%igem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Entgegen der Erwartung war in Gegenwart der N-Quelle Glutamin kein etwa 75 kDa großes Protein sekretiert worden. Stattdessen konnte ein Protein dieser Größe im Ansatz, der Ammonium als N-Quelle enthielt, lokalisiert werden. Das Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und per MALDI-TOF untersucht. Allerdings ergab sich hier kein signifikantes Ergebnis. Die ausgeschnittene diffuse Bande bestand aus vielen Proteinen. Weiterhin war auffällig, dass die Sekretion eines etwa 24 kDa großen Proteins fast ausschließlich in Anwesenheit der N-Quelle Glutamin stattfand. Auch dieses Protein wurde per MALDI-TOF analysiert. Es handelt sich hierbei um die 25 kDa große Endochitosanase (AFU_4G01290).

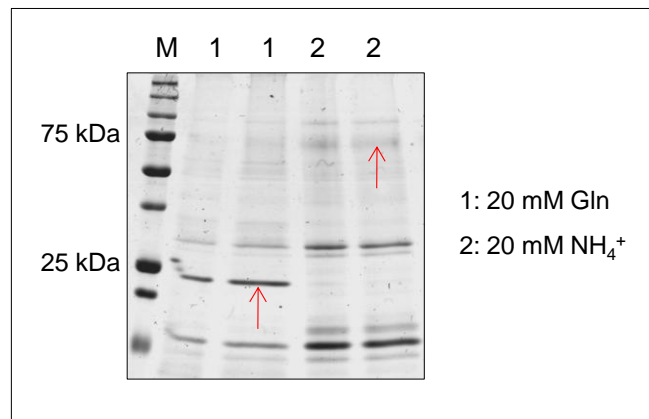


Abb. 17: Von *A. fumigatus* sekretierte Proteine in AMM mit 20 mM Glutamin bzw. 20 mM Ammonium als einziger N-Quelle

A. fumigatus ATCC 46645 wurde in AM-Medium, dem entweder 20 mM Glutamin (1) oder 20 mM Ammonium (2) als N-Quelle zugesetzt worden war, für 65 h inkubiert. Das Medium wurde vom Myzel getrennt und einer TCA-Fällung unterzogen. Das mit Coomassie gefärbte 12%ige SDS-Gel zeigt die von *A. fumigatus* ins Medium sekretierten Proteine. Die beiden differentiell exprimierten, mit dem roten Pfeil markierten Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten und per MALDI-TOF analysiert.

In einem anschließenden Versuch sollte getestet werden, welche anderen N-Quellen die Bildung des NrpA-Proteins induzieren. Dabei wurden folgende N-Quellen verwendet: Asparagin, Asparaginsäure, Valin, Tryptophan und Harnstoff. Alle N-Quellen hatten im AM-Medium wieder eine Endkonzentration von 20 mM. Je 20 ml Medium wurden mit 1×10^6 Sporen/ml beimpft und für 36 h inkubiert. Die aus dem entstandenen Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 verwendet. Die hohen Sporenkonzentrationen und die lange Inkubationszeit wurden absichtlich gewählt, da in anderen Versuchen gezeigt worden war, dass das NrpA-Protein sowohl bei längeren Inkubationszeiten als auch bei höheren Animpfkonzentrationen verstärkt gebildet wird. Dies sollte also helfen, auch eine geringe Expression von NrpA darstellen zu können. In der gezeigten Western-Blot-Analyse ist zu erkennen, dass die Verwendung von Harnstoff als N-Quelle zu keiner, Tryptophan zu einer sehr schwachen und Valin zu einer etwas deutlicheren Bildung des NrpA-Proteins führt. Weiterhin scheint Asparagin als N-Quelle nur eine schwache Expression von NrpA zu induzieren, während hingegen Asparaginsäure zu einer starken Induktion von NrpA führt. In einem Wiederholungsversuch konnte diese Beobachtung allerdings nicht bestätigt werden. Dort führen beide Aminosäuren zu einer deutlichen, etwa gleich starken Bildung des Proteins.

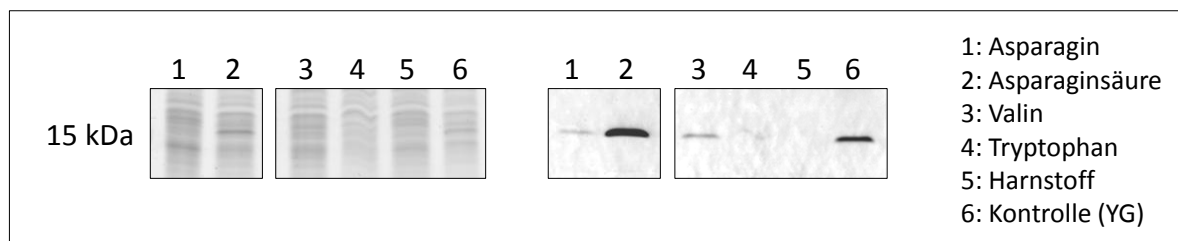


Abb. 18: NrpA-Bildung in *A. fumigatus* in Anwesenheit verschiedener N-Quellen

Es wurden Proteinextrakte aus Myzel von *A. fumigatus* hergestellt, das in AMM in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen (A: Asparagin; B: Asparaginsäure; C: Valin; D: Tryptophan; E: Harnstoff; F: Kontrolle (YG) je in einer Konzentration von 20 mM, gewachsen war. Die Extrakte wurden in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) sowie einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen α NrpA-Antikörpers K93 E6 unterzogen.

1.2.8 Die positive Regulation der NrpA-Bildung ist dominant

Aufgrund der Erkenntnisse des vorherigen Versuchs sollte geklärt werden, ob eher eine positive Regulation der NrpA-Bildung durch Glutamin oder eine negative Regulation durch Glutamat vorliegt und zusätzliche N-Quellen dieses Regulationsmuster beeinflussen können. Dafür wurden NrpA induzierende Bedingungen mit einer NrpA unterdrückenden Bedingung kombiniert. Zum einen wurde der Versuch mit AMM durchgeführt, das sowohl Glutamat als auch Glutamin als N-Quelle enthielt, zum anderen wurde ein Gemisch aus Glutamat und Ammonium als N-Quelle eingesetzt. In einer dritten Variante wurden dem Medium alle drei N-Quellen, also Ammonium, Glutamat und Glutamin beigemischt. Die Endkonzentration jeder verwendeten N-Quelle betrug 20 mM. Anschließend wurden die Kulturen mit 5×10^5 Sporen/ml beimpft und für 32 h inkubiert. Die aus dem entstandenen Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 unterzogen. Jede der drei getesteten Konditionen führte zu einer deutlichen Expression des NrpA-Proteins (Abb. 19)

Im oben beschriebenen Versuch stellt Glutamat die NrpA unterdrückende Wachstumsbedingung dar. Die Durchführung eines vergleichbaren Versuchs, in dem Nitrat, eine zweite NrpA unterdrückende Wachstumsbedingung, mit Ammonium oder Ammonium und Glutamin kombiniert wurde, lieferte vergleichbare Ergebnisse. Allerdings betrug die Endkonzentration der N-Quellen-Gemische in diesem Fall 20 mM. Je 20 ml AM-Medium wurden mit $2,4 \times 10^5$ Sporen/ml inkubiert und nach 24 h geerntet. Wieder wurden aus dem Myzel Proteinextrakte hergestellt und Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 durchgeführt. Dabei war zu erkennen, dass die N-Quelle Nitrat nicht zur Bildung von NrpA führte. Wurde Nitrat aber mit Ammonium oder mit Ammonium und Glutamin gemischt und als N-Quelle eingesetzt resultierte daraus eine deutliche Expression von NrpA (Daten nicht gezeigt).

In einer letzten Versuchsvariante wurde Vollmedium (YG) entweder mit 20 mM Glutamat oder Glutamin supplementiert. Je 20 ml Medium wurden mit 4×10^5 Sporen/ml versetzt und für 26 h inkubiert. Western-Blot-Analysen der aus dem entstandenen Myzel hergestellten Proteinextrakte mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 zeigten in beiden Ansätzen eine sehr starke NrpA-Expression (Abb. 19).

Insgesamt ist zu beobachten, dass die positive Stimulation der NrpA-Bildung stets über die negative Stimulation dominiert.

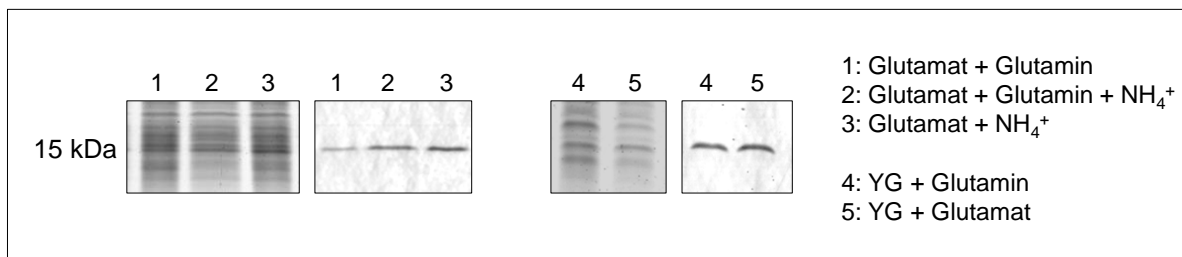


Abb. 19: Expression des NrpA-Proteins, wenn potentiell induzierende und reprimierende N-Quellen kombiniert eingesetzt werden

A. fumigatus wurde einerseits in AMM mit unterschiedlichen N-Quellen-Kombinationen (1: Glutamat + Glutamin; 2: Glutamat + Glutamin + Ammonium; 3: Glutamat + Ammonium) angezogen. Jede N-Quelle wurde in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt. Andererseits erfolgte die Anzucht in YG-Medium, das entweder zusätzlich 20 mM Glutamin (4) oder 20 mM Glutamat (5) enthielt. Nach der Verarbeitung des entstandenen Myzels zu Proteinextrakten wurden diese entweder in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt oder einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper unterzogen. In diesem Versuch wurde Glutamat als N-Quelle verwendet, die die NrpA-Expression potentiell unterdrücken kann. Alle anderen hier verwendeten N-Quellen wirken auf die NrpA-Bildung potentiell stimulierend.

1.2.9 Die Bildung des NrpA-Proteins hängt von der Inkubationszeit sowie von der Animpfdichte ab

Für alle weiteren Versuche mussten Bedingungen gefunden werden, unter denen das NrpA-Protein stabil exprimiert wird. Deswegen sollten zunächst Proteinextrakte einer Zeitreihe auf das Vorhandensein von NrpA untersucht werden. Dafür wurden je 20 ml AMM, das 20 mM Ammonium oder Glutamin als N-Quelle enthielt, mit $2,4 \times 10^5$ Sporen/ml beimpft und für 16 h, 20 h, 24 h, 28 h, 48 h oder 60 h inkubiert. Vor der Verarbeitung des Myzels zu Proteinextrakten wurde von allen Proben das Feuchtgewicht bestimmt. Für die anschließende Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 konnten die Proteinextrakte der Wachstumszeitpunkte 48 h und 60 h nicht verwendet werden, da die Proteinkonzentrationen zu gering waren. Die Auftragsmenge der restlichen Proteinextrakte wurde über eine Proteinbestimmung norma-

lisiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 h konnte kein NrpA auf der Membran nachgewiesen werden, nach 20 h war dagegen ein schwaches Signal zu erkennen, welches nach 24 h noch stärker und nach 28 h am deutlichsten ausgeprägt war. Der gleiche Versuch wurde auch mit AMM durchgeführt, dem eine andere N-Quelle, nämlich 20 mM Glutamin, zugesetzt worden war. Hier war das NrpA-Protein erst nach 24 h nachweisbar und nach 28 h deutlicher zu erkennen. Die Bildung des NrpA-Proteins hängt in Minimalmedium also von der Inkubationszeit der Kulturen ab. Dabei wird das Protein in Anwesenheit der N-Quelle Glutamin später gebildet als in Anwesenheit von Ammonium.

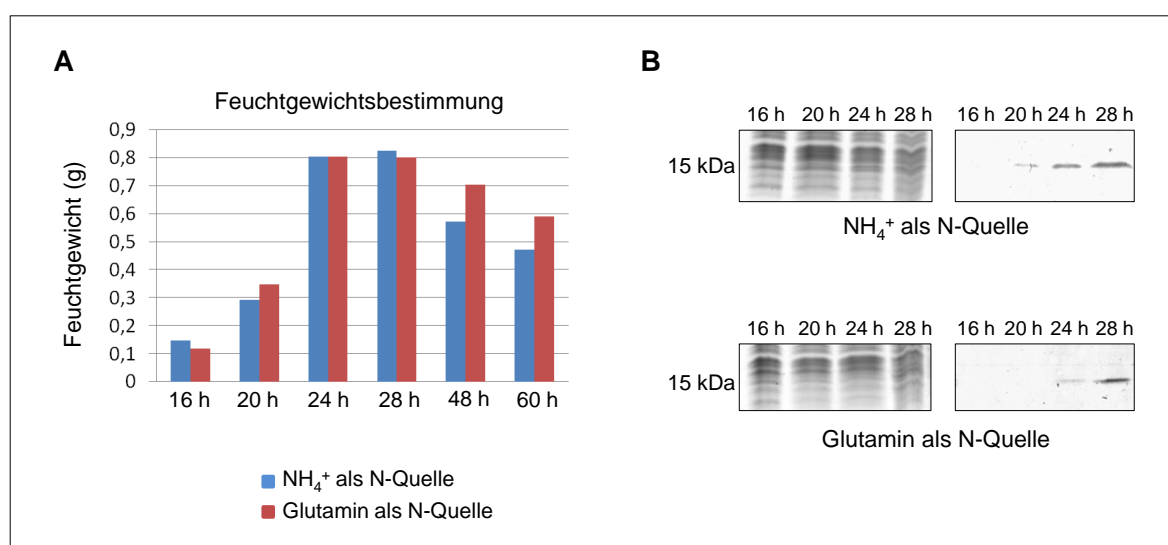


Abb. 20: Expression des NrpA-Proteins in Abhängigkeit der Wachstumszeit unter Verwendung verschiedener N-Quellen

A zeigt in einem Säulendiagramm die Entwicklung des Feuchtwichts über den Wachstumszeitraum der Kulturen. Die Balkenfarbe spiegelt die im Medium vorhandene N-Quelle wieder: Blau steht für 20 mM NH₄⁺ und rot für 20 mM Glutamin. Unter B sind sowohl mit Coomassie gefärbte 15%ige SDS-Gele (links) als auch Western-Blot-Analysen (rechts) der aus dem Zeitverlauf hergestellten Proteinextrakte dargestellt. Für die Western-Blot-Analysen wurde der spezifische αNrpA-Antikörper K93 E6 verwendet. Der Versuch ist einmal in Anwesenheit der N-Quelle Ammonium (oben) und einmal in Anwesenheit der N-Quelle Glutamin (unten) dargestellt.

In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die NrpA-Expression auch von der zum Animpfen verwendeten Sporenmenge abhängt. Das bedeutet, alle Kulturen wurden zum gleichen Zeitpunkt geerntet, aber jede Kultur wurde mit einer anderen Sporenkonzentration beimpft. Folgende Sporenkonzentrationen wurden dabei verwendet: 2,4x10⁴, 4,8x10⁴, 2,4x10⁵, 9,6x10⁵ und 2,4x10⁶. Sie entsprachen einem Zehntel, einem Fünftel, dem Ein-, dem Vier- und dem Zehnfachen der im vorherigen Versuch verwendeten Sporenmenge. Der Versuch wurde mit AMM durchgeführt, welches 20 mM Ammonium als N-Quelle enthält. Wieder betrug das Versuchsvolumen 20 ml. Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Versuchs wurden 16 h und 20 h als geeignete Erntezeitpunkte ausgewählt. Die hergestellten Proteinextrakte wurden für Wes-

tern-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt. Die Myzelmasse der verschiedenen Kulturen unterschied sich deutlich voneinander und die Auftragsmenge der Proben wurde über den Proteingehalt normalisiert. Nach einer Inkubation von 16 h war das NrpA-Protein bei Verwendung der dritthöchsten Animpfkonzentration sehr schwach auf der Membran zu erkennen. Die Intensität der Signalstärke steigerte sich bei den beiden höheren zum Animpfen verwendeten Sporenkonzentrationen jeweils deutlich. Wurden die Pilze erst nach 20 h geerntet, änderte sich das Bild. Schon bei der zweitniedrigsten Sporenkonzentration war das Protein als sehr schwaches Signal auf der Membran nachweisbar. Bei den drei höheren Sporenkonzentrationen verstärkte sich die Signalintensität deutlich. Hierbei war aber innerhalb der drei Proben keine Steigerung der Intensität zu beobachten. Die Bildung des NrpA-Proteins hängt also von der zum Animpfen verwendeten Sporenmenge und vom Zeitpunkt der Kulturern- te ab.

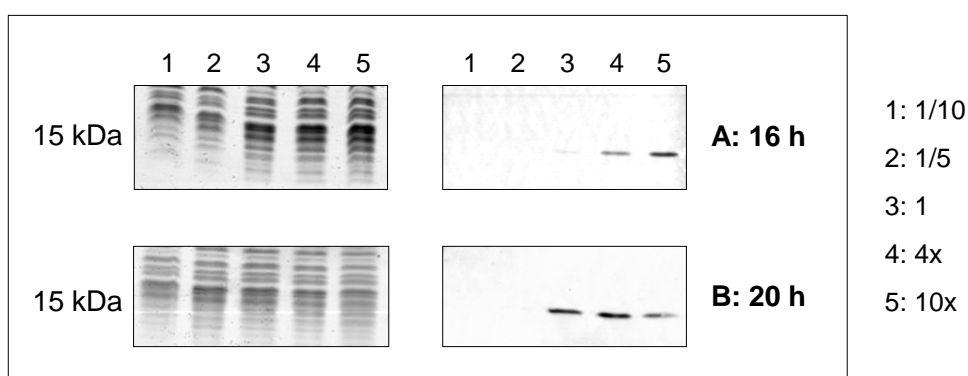


Abb. 21: Expression des NrpA-Proteins in Abhängigkeit der zum Animpfen verwendeten Sporenmenge

Je 20 ml AMM, das 20 mM Ammonium als N-Quelle enthielt, wurde mit unterschiedlichen Mengen an *A. fumigatus*-Sporen beimpft. Dabei wurde ein Zehntel (1), ein Fünftel (2), das einfache (3), das vierfache (4) und das zehnfache (5) der Sporenmenge der vorherigen Versuche verwendet. Die Kulturen wurden entweder nach 16 h (A), oder nach 20 h (B) geerntet und das entstandene Myzel wurde zu Proteinextrakten verarbeitet. Die Extrakte wurden einerseits in 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und andererseits einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 unterzogen.

1.2.10 Bildung und Abbau des NrpA-Proteins

Als nächstes stellte sich die Frage, ob und wie schnell das NrpA-Protein abgebaut wird. Dafür wurde *A. fumigatus* ATCC 46645 zunächst unter einer Bedingung kultiviert, die nicht zur Expression des NrpA-Proteins führt. Anschließend wurde das Myzel in Medium umgesetzt, in dem NrpA normalerweise gebildet wird. Zunächst wurden also $2,4 \times 10^5$ Sporen/ml in je 20 ml AM-Medium angezogen, das 20 mM Nitrat als N-Quelle enthielt. Nach 24 h wurde das Myzel durch sterile, mit Miracloth ausgekleidete Filter geschüttet und mit AMM, das die neue N-Quelle, in diesem Fall also 20 mM Ammonium enthielt, zwei Mal gewaschen und anschließend auch in 20 ml des Mediums überführt. Die Kontrollkulturen wurden wie die restlichen Ansätze behan-

delt. Allerdings wurden sie aber wieder in Medium mit der ursprünglichen N-Quelle gesetzt (Nitrat). Die Inkubation des Pilzes mit der veränderten N-Quelle erfolgte entweder für 3 h oder für 6 h. In einem veränderten Versuchsaufbau wurde untersucht, wie schnell das NrpA-Protein abgebaut wird. Dafür wurde der Pilz zunächst in Anwesenheit einer N-Quelle angezogen, die die Bildung von NrpA induziert. Anschließend wurde das Myzel in ein Medium mit unterdrückender N-Quelle umgesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie für den vorherigen Versuch beschrieben. Wieder wurde Nitrat als nicht induzierende und Ammonium als induzierende N-Quelle verwendet. Aus dem geernteten Myzel wurden Proteinextrakte hergestellt, die für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 verwendet wurden. Wurde das Myzel von einer NrpA unterdrückenden Wachstumsbedingung (Nitrat) zu einer induzierenden Bedingung (Ammonium) „*geschiftet*“, war das Protein nach 3 h nicht nachweisbar und konnte erst nach 6 h auf der Membran detektiert werden. Auch im inversen Versuch zeigte sich, dass das Protein nach einer dreistündigen Inkubation in Medium mit unterdrückender N-Quelle noch nicht abgebaut worden war. Erst nach 6 h konnte ein sehr geringer Abbau oder eine Ausverdünnung von NrpA nachgewiesen werden. Sowohl die Bildung als auch der Abbau von NrpA beginnen erst nach 6 h.

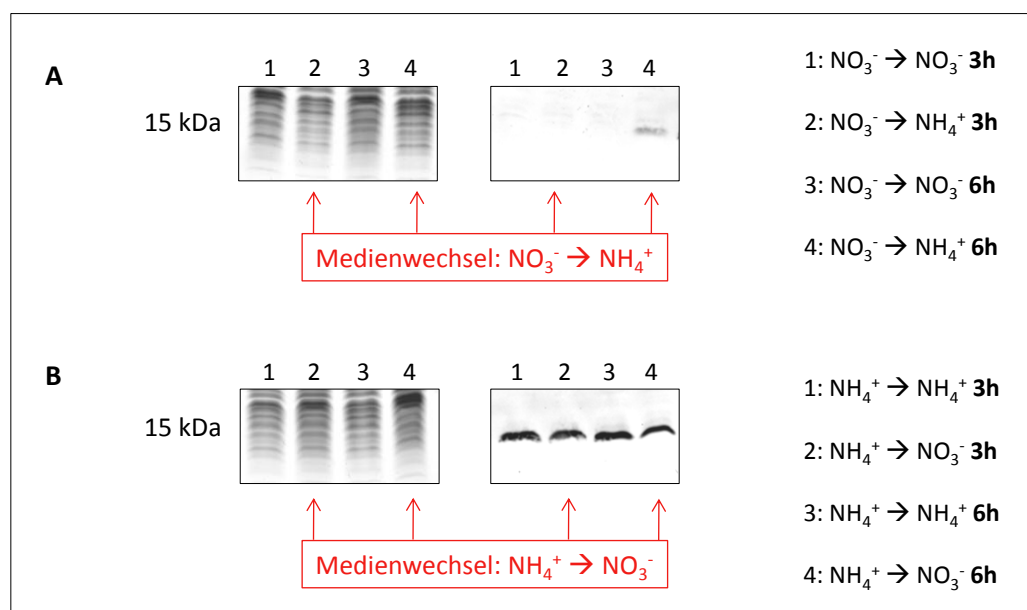


Abb. 22: Zeitverlauf von Abbau und Bildung des NrpA-Proteins

A. fumigatus wurde für 24 h in AMM, das entweder 20 mM Nitrat (A) oder 20 mM Ammonium (B) enthielt, angezogen. Das Myzel wurde gewaschen und in frisches Medium überführt, das entweder die gleich N-Quelle enthielt (1, 3) oder statt Nitrat Ammonium und umgekehrt (2, 4). Das Myzel wurde nach einer weiteren Inkubation für 3 h (1, 2) oder 6 h (3, 4) geerntet und zur Herstellung von Proteinextrakten verwendet. Die Extrakte wurden einerseits in 15%igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und zum anderen für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt (rechts).

1.2.11 Bildung des NrpA-Proteins in *A. fumigatus* unter Stressbedingungen

Das CipC Protein aus *A. nidulans* wird in Anwesenheit von Concanamycin A verstärkt induziert (Melin *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Beobachtung wurden zu CipC homologe Proteine in der Literatur oftmals als stressinduzierte Proteine bezeichnet. Nachdem nun einige grundsätzliche Fragen zur Expression des NrpA-Proteins in *A. fumigatus* geklärt waren, sollte untersucht werden, ob sich die Expression des Proteins in bestimmten Stresssituationen verändert.

1.2.11.1 Osmotischer Stress führt zu keiner veränderten Bildung von NrpA

Zunächst wurde untersucht, ob die Bildung des NrpA-Proteins durch osmotischen Stress verändert wird. Je 20 ml YG_f wurden mit unterschiedlichen Mengen an NaCl versetzt, so dass sich Endkonzentrationen von 0 M, 0,25 M, 0,5 M und 0,75 M ergaben. Nach dem Animpfen mit 1x10⁵ Sporen/ml erfolgte eine Inkubation für 24 h. Die Kulturen mit 0 und 0,25 M NaCl im Medium waren vergleichbar gut gewachsen. Enthielt das Medium dagegen 0,5 M NaCl, war das Wachstum des Pilzes bereits merklich schlechter. Mit 0,75 M NaCl im Medium wuchs der Pilz nur sehr schlecht. Die aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen αNrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt. Für den Versuch wurde die Auftragsmenge der Extrakte über den Proteingehalt der Proben normalisiert. Es konnte kein nennenswerter Unterschied der NrpA-Expression in den verschiedenen Ansätzen festgestellt werden.

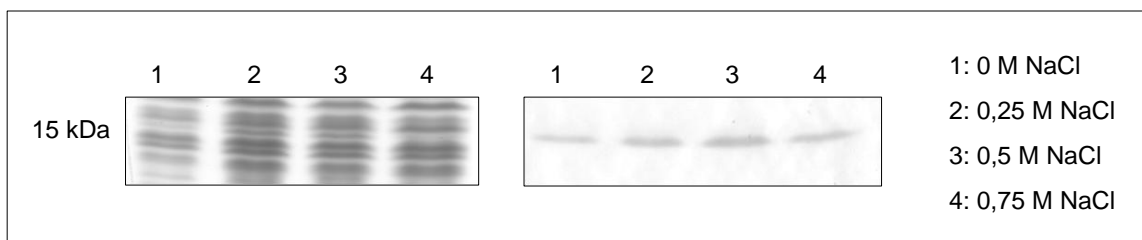


Abb. 23: NrpA-Expression in Anwesenheit von osmotischem Stress

A. fumigatus ATCC 46645 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen NaCl (1:0 M; 2:0,25 M; 3:0,5 M; 4:0,75 M) im Medium (YG_f) angezogen. Die aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden sowohl in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) als auch für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen αNrpA-Antikörper K93 E6 verwendet (rechts).

1.2.11.2 NrpA-Bildung unter oxidativem Stress

Die nächste Untersuchung sollte zeigen, ob sich die Expression von NrpA in *A. fumigatus* durch oxidativen Stress beeinflussen lässt. Dafür wurden zum einen drei verschiedene H₂O₂-Konzentrationen verwendet (500 mM, 125 mM und 30 mM). Zum anderen wurden drei verschiedene Konzentrationen Menadion eingesetzt (40 mM, 10 mM und 2,5 mM). Menadion ist ein

„redox-cycling-agent“ und führt zur Bildung von Superoxidanionen. In jedem Fall wurden 20 ml YG mit 3×10^5 Sporen/ml beimpft und für 20 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von H_2O_2 , Menadion oder – im Falle der Kontrolle – von Wasser. Nach einer weiteren Inkubation für 1,5 h wurden die Kulturen geerntet und die daraus hergestellten Proteinextrakte für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt. Während Menadion dabei führte dabei zu keiner Veränderung der NrpA-Expression führte, bewirkte schon die geringste Menge an H_2O_2 , dass das NrpA-Protein einen deutlichen Molekulargewichts-Shift nach oben machte. Enthielt die Kultur 125 mM H_2O_2 , konnte das NrpA-Protein kaum mehr nachgewiesen werden. Bei der höchsten verwendeten Konzentration war der Nachweis von NrpA nicht mehr möglich. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Proteinkonzentration der beiden Proben mit den höchsten H_2O_2 -Konzentrationen deutlich niedriger waren als die der anderen Proben. Schon bei der Ernte war aufgefallen, dass das Myzel, dem 500 mM H_2O_2 zugeetzt worden waren, im Vergleich zu den anderen Ansätzen nicht gut ausgesehen hatte. Das Myzel schien sich teilweise zersetzt zu haben.

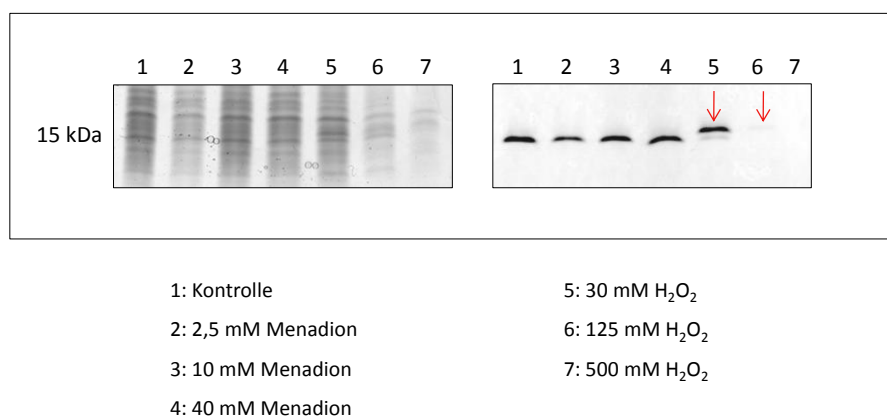


Abb. 24: NrpA-Expression in Antwort auf oxidativen Stress in *A. fumigatus*

A. fumigatus wurde in YG-Medium angezogen und anschließend für 1,5 h in Anwesenheit verschiedener Menadion-Konzentrationen (2:2,5 mM; 3:10 mM; 4:40 mM) oder verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen (5:30 mM; 6:125 mM; 7:500 mM) inkubiert. Einer Kontrollkultur wurde nur H_2O zugesetzt (1). Es sind sowohl mit Coomassie gefärbte 15%ige SDS-Gele (links) als auch Western-Blot-Analysen (rechts) der aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte dargestellt. Für die Western-Blot-Analysen wurde der spezifische α NrpA-Antikörper K93 E6 verwendet.

Die Proteinextrakte der mit H_2O_2 behandelten Kulturen zeigten im SDS-Gel zwei Auffälligkeiten: Zum einen der bereits erwähnte Molekulargewichts-Shift des NrpA-Proteins, zum anderen gab es zwei Proteine, die erst in Anwesenheit der beiden höheren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen in verstärktem Maße gebildet wurden. Diese beiden Proteine blieben auf dem SDS-Gel deutlich zu erkennen, obwohl die Proteinkonzentrationen der Extrakte deutlich abnahmen und einige Proteine bereits nicht mehr zu erkennen waren. Die Proteinproben wurden

nochmals auf einem 12%igen und einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Aus dem 15%-Gel wurden die beiden NrpA-Varianten und aus dem 12%-Gel die beiden anderen beschriebenen Proteine ausgeschnitten und anschließend per MALDI-TOF analysiert. Wie erwartet und durch die Western Blots bereits gezeigt, handelte es sich sowohl bei dem „normal“ großen, als auch bei dem etwas größeren Protein um NrpA. Bei der vergrößerten Variante konnte kein Hinweis auf eine Modifikation, wie etwa eine Myristilierung des Proteins, festgestellt werden. Bei den beiden anderen Proteinen handelte es sich im Falle des etwa 36 kDa großen Protein um eine Transaldolase und im Falle des etwa 52 kDa großen Protein um eine Myoinositolphosphat-Synthase.

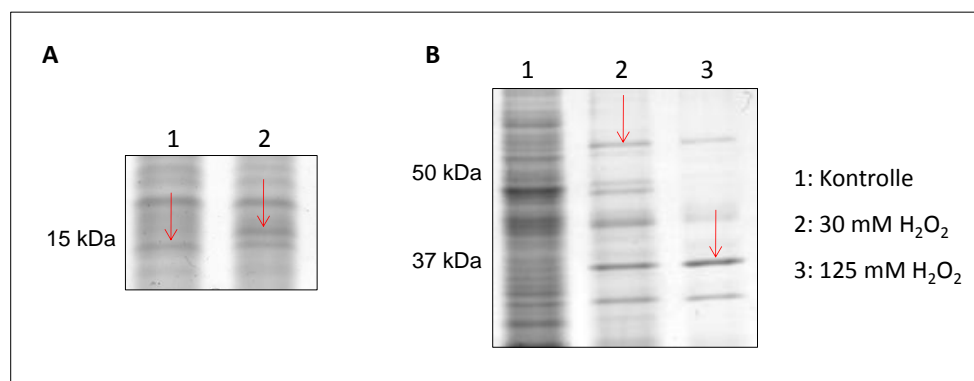


Abb. 25: H₂O₂ führt zu einem Molekulargewichtsshift von NrpA und zu einer verstärkten Expression einer Transaldolase und einer Myoinositolphosphat-Synthase

Ein mit Coomassie gefärbtes 15%ige SDS-Gel (A) zeigt eine Veränderung des Proteinexpressionsprofils von *A. fumigatus* in Anwesenheit von H₂O₂ (2:30 mM) im Vergleich zu Kontrolle (1). Die mit den roten Pfeilen markierten Proteinbanden wurden aus dem Gel geschnitten und per MALDI-TOF analysiert. Es handelt sich in beiden Fällen um NrpA. B zeigt ein mit Coomassie gefärbtes 12%iges SDS-Gel. Auch hier ist in Anwesenheit von H₂O₂ (2:30 mM; 3:125 mM) eine Veränderung des Proteinexpressionsprofils von *A. fumigatus* im Vergleich zur Kontrolle (1) festzustellen. Zwei Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten und per MALDI-TOF analysiert (roter Pfeil). Bei dem ca. 36 kDa großen Protein handelt es sich um eine Transaldolase und bei dem ca. 52 kDa großen Protein um eine Myoinositolphosphat-Synthase.

1.2.11.3 NrpA-Bildung, wenn Glutamin als C- und N-Quelle dient

Im folgenden Versuch sollte getestet werden, ob sich die Expression des NrpA-Proteins aus *A. fumigatus* durch metabolischen Stress verändert. Dafür wurde die NrpA induzierende N-Quelle Glutamin in als C- und N-Quelle verwendet. Das verwendete AM-Medium enthielt also keine Glukose sondern Glutamin in hohen Konzentrationen von 100 mM oder 200 mM. Als Kontrolle diente normales AMM mit Glukose und 20 mM Glutamin. Das Kulturvolumen betrug je 20 ml, die mit 2,4x10⁵ Sporen/ml angeimpft und für 26 h inkubiert wurden. Unter diesen Minimalbedingungen war das Wachstum des Pilzes im Vergleich zum Kontrollansatz stark beeinträchtigt. Aus dem geernteten Myzel wurden Proteinextrakte hergestellt, die für Western-Blot-

Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 verwendet wurden. Die Auftragsmenge der Extrakte wurde über den Proteingehalt der Proben normalisiert. Der Antikörper detektierte im Kontrollansatz wie erwartet das NrpA-Protein. Die Verwendung von Glutamin als C- und N-Quelle, unabhängig davon, ob eine Konzentration von 100 oder 200 mM verwendet worden war, führte dagegen zu keiner Expression von NrpA.

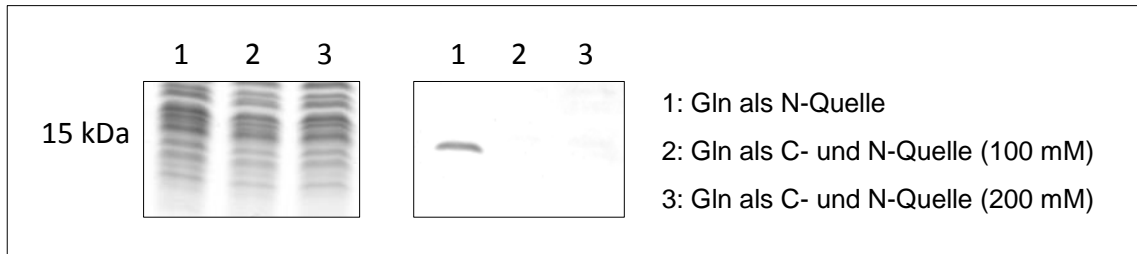


Abb. 26: NrpA-Expression bei Verwendung von Glutamin als C- und N-Quelle

A. fumigatus wurde entweder in normalen AMM mit 20 mM Glutamin als N-Quelle angezogen (1), oder in AMM kultiviert, das als einzige C- und N-Quelle 100 mM (2) oder 200 mM Glutamin (3) enthielt. Dargestellt sind hier sowohl mit Coomassie gefärbte 15%ige SDS-Gele (links), als auch Western-Blot-Analysen unter Verwendung des spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6, der aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte.

1.2.11.4 NrpA-Bildung in Antwort auf C- oder N-Mangel

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Expression des NrpA-Proteins unter Kohlenstoff oder Stickstoffmangel verändert. Dafür wurden 20 ml AM-Medium mit entweder 20 mM Glutamin oder mit 20 mM Ammonium mit $2,4 \times 10^5$ Sporen/ml beimpft und für 23 h inkubiert. Die Inkubationszeit stellte dabei einen Kompromiss zwischen einer ausreichend guten Expression des NrpA-Proteins und der noch spät exponentiellen Wachstumsphase des Pilzes dar. Nun wurden die Kulturen gewaschen und in frisches Medium, das entweder keine C- oder keine N-Quelle enthielt, überführt. Die Kontrollkulturen wurden weiterhin in Medium mit der entsprechenden C- und N-Quelle inkubiert. Die Ernte erfolgte 3 h nachdem die Kulturen unter Mangelbedingungen gesetzt worden waren. Die Inkubationszeit des Pilzes unter Mangelbedingungen konnte nicht länger als 3 h dauern, da Vorversuche gezeigt hatten, dass das Myzel nach längeren Mangelphasen nicht mehr aufzuschließen ist. Die aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA Antikörper K93 E6 eingesetzt. Dabei war zwischen den Kontrollkulturen und den ausgehungerten Pilzen kein Unterschied festzustellen. Weder ein C- noch ein N-Mangel beeinflusst die Bildung des NrpA-Proteins.

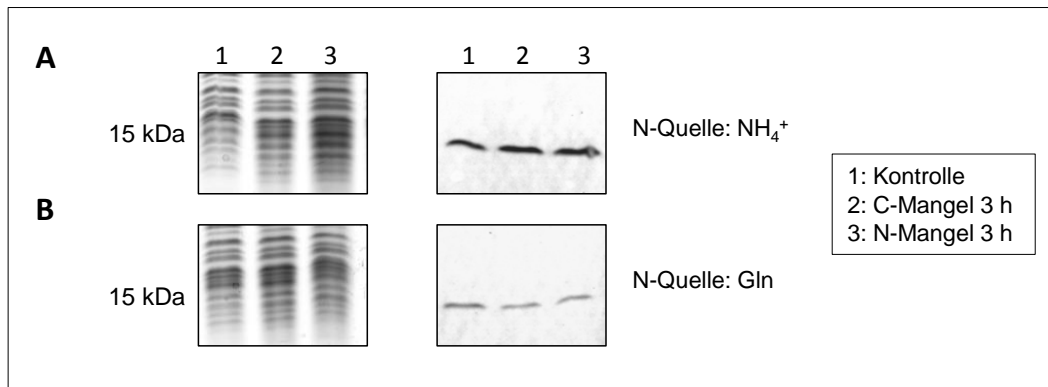


Abb. 27: Expression von NrpA in Anwesenheit eines C- oder eines N-Mangels

A. fumigatus wurde in AMM angezogen, das entweder 20 mM Ammonium (A) oder 20 mM Glutamin als N-Quelle enthielt. Nach einer Inkubation für 23 h wurde das Myzel in neues Medium überführt, das entweder keine C-Quelle (2) oder keine N-Quelle (3) enthielt. Eine Kontrollkultur (1) erhielt wieder Medium mit der gleichen C- und N-Quelle. Die aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden zum einen auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt und zum anderen für eine Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt.

1.2.11.5 Die Inhibierung der Glutaminsynthetase durch MSX führt zu einer reduzierten Expression des NrpA-Proteins

In dem filamentösen Pilz *F. fujikuroi* wurde gezeigt, dass ein zu *cipC* homologes Gen bei Inhibierung der Glutaminsynthetase auch in Anwesenheit einer normalerweise stimulierenden N-Quelle nicht oder kaum exprimiert wird (Teichert *et al.*, 2002). Nun sollte getestet werden, ob dieser Effekt durch die Inhibierung der Glutaminsynthetase mit L-Methionin-DL-Sulphoximin (MSX) auch in *A. fumigatus* beobachtet werden kann. Dafür wurden je 20 ml AMM mit verschiedenen N-Quellen mit 4×10^5 Sporen/ml beimpft und für 26,5 h inkubiert. Der Inhibitor der Glutaminsynthetase (MSX) wurde in einer Endkonzentration von 4 mM sowohl zu einer Kultur, die Glutamin enthielt, als auch zu einer Kultur, die Glutamat als N-Quelle enthielt, zugesetzt. Als weitere Kontrollen dienten Kulturen die Glutamin (20 mM), Glutamat (20 mM), Methionin (20 mM) und eine Kombination von Methionin (20 mM) und Glutamin (20 mM) enthielten. Diese Kontrollen waren nötig, da MSX ein Methioninderivat ist und ein durch Methionin verursachter Effekt auf die NrpA-Expression ausgeschlossen werden sollte. Eine Kultur, die nur den Inhibitor und keine zusätzliche N-Quelle enthielt, war nicht fähig zu wachsen. Dies stellte sicher, dass der Inhibitor nicht als N-Quelle genutzt werden kann. Insgesamt war das Wachstum aller Kulturen etwa gleich gut. Jedoch gab es zwei Ausnahmen: Die Kultur, die Glutamin als N-Quelle enthielt war etwas besser gewachsen und in Anwesenheit von Glutamin und MSX war das Wachstum des Pilzes am stärksten. Eine Western-Blot-Analyse der hergestellten Proteinextrakte mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 ergab folgendes Bild: Das NrpA-Protein konnte weder in Anwesenheit von Glutamat alleine noch in Anwesenheit von Glutamat und MSX nachgewiesen wer-

den. Wurde Glutamin als N-Quelle verwendet, wurde das NrpA-Protein in großer Menge gebildet. Die Kombination von Glutamin und MSX dagegen führte dazu, dass NrpA kaum mehr nachweisbar war, obwohl diese Kultur am besten gewachsen war. Dieser Effekt stand nicht im Zusammenhang mit der Tatsache, dass MSX ein Methioninderivat ist, da sowohl Methionin alleine als auch in Kombination mit Glutamin zu einer NrpA-Expression führt. Dabei war die Expression des Proteins in Anwesenheit von Methionin allerdings deutlich schwächer als in Anwesenheit von Glutamin oder der Kombination von Methionin und Glutamin. Die Bildung des NrpA-Proteins wird in *A. fumigatus* durch MSX, einen Inhibitor der Glutaminsynthetase, fast vollständig verhindert.

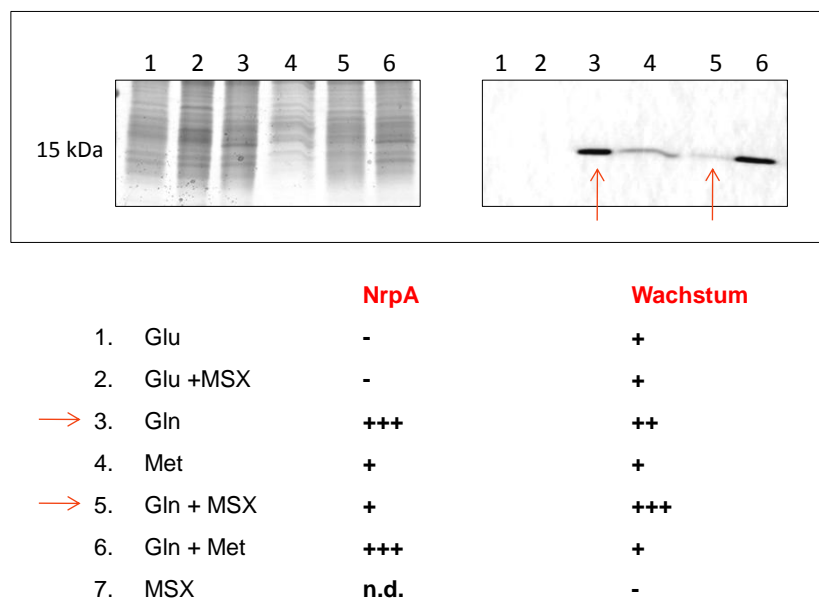


Abb. 28: NrpA-Expression bei Inhibierung der Glutaminsynthetase durch MSX

A. fumigatus wurde in AMM angezogen, das entweder Glutamat (1), Glutamin (3) oder Methionin (4) als N-Quelle enthielt. Zudem wurden Kulturen angezogen, die entweder Glutamat (2) oder Glutamin (5) als N-Quelle enthielten und zusätzlich den Inhibitor der Glutaminsynthetase MSX in einer Endkonzentration von 4 mM. Kontrollkulturen enthielten entweder Glutamin in Kombination mit Methionin (6) oder nur den Inhibitor MSX (7). Alle N-Quellen wurden in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt. Aus dem entstandenen Myzel wurden Proteinextrakte hergestellt. Diese wurden zum einen in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) oder einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 unterzogen (rechts). Der untere Teil der Abbildung zeigt schematisch die Bildung des NrpA-Proteins, sowie das Wachstum der Kulturen unter den gewählten Bedingungen.

1.2.11.6 Rapamycin hat keinen Einfluss auf die gebildete NrpA-Menge

Da in dem filamentösen Pilz *F. fujikuroi* gezeigt worden war, dass die Inhibierung der TOR-Kinase durch Rapamycin zu einer verstärkten Expression des *cipC*-homologen Gens führt (Teichert *et al.*, 2004), sollte dies auch in *A. fumigatus* untersucht werden. Zunächst wurde getestet, ob Rapamycin, der spezifische Inhibitor des TOR-Proteins in *A. fumigatus*, einen biologischen

Effekt verursacht. Dafür wurden AMM-Platten hergestellt, die den Inhibitor in einer Konzentration von entweder 100 oder 200 ng/ml enthielten. Als N-Quelle dienten dabei 20 mM Ammonium. Kontrollplatten enthielten statt des Inhibitors vergleichbare Mengen des Lösungsmittels MeOH. In die Mitte jeder Platte wurde 1 µl einer Sporenstamm suspension aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 40 h war deutlich zu erkennen, dass die Pilze auf den Platten mit dem Inhibitor ein stark verringertes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollplatten zeigten. Das Myzel wies dabei einen Wachstumsphänotyp auf, wie bei einem Wachstum unter Mangelbedingungen. Während der Pilz in der Mitte einen kleinen Myzelbereich ohne Sporen bildete, waren nach außen hin sehr zarte, fast durchsichtige „Suchhyphen“ zu sehen.

Nach diesem Funktionstest wurde folgender Versuch in flüssigem Medium angesetzt: Je 20 ml AMM mit 20 mM Ammonium als N-Quelle wurden mit 3×10^5 Sporen/ml beimpft. Nach einer Inkubation von 21 h wurden einem Kolben 4 µl Rapamycin-Lösung zugesetzt. Dies resultierte in einer Endkonzentration von 200 ng/ml. Der zweite Kolben erhielt 4 µl MeOH. Die Ernte der Kulturen erfolgte nach einer weiteren Inkubation von 5 h. Mit den hergestellten Proteinextrakten wurden Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen αNrpA-Antikörper K93 E6 durchgeführt. Das NrpA-Protein konnte in beiden Ansätzen in etwa gleichen Mengen nachgewiesen werden. Der Inhibitor der TOR-Kinase verursacht in *A. fumigatus* also keinen nachweisbaren Effekt auf die NrpA-Expression.

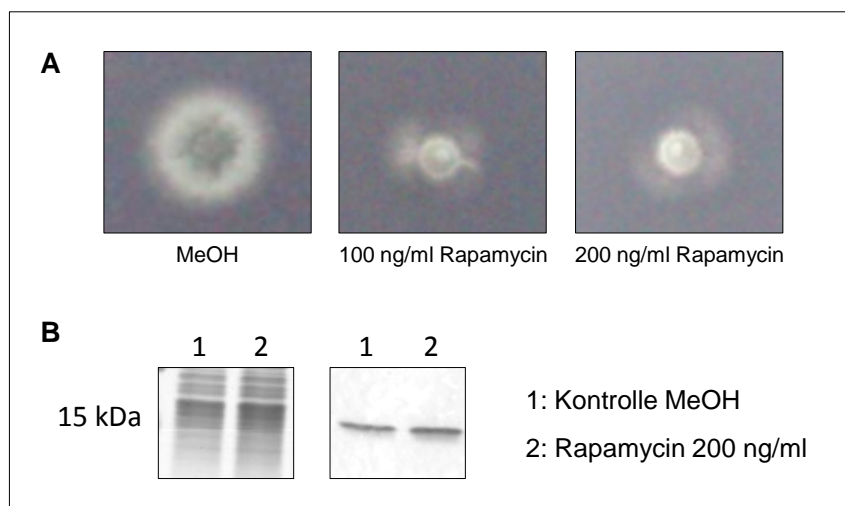


Abb. 29: Expression von NrpA in Anwesenheit von Rapamycin

Rapamycin zeigt sowohl in einer Konzentration von 100 als auch von 200 ng/ml eine Wirkung auf das Wachstum von *A. fumigatus* im Vergleich zur Kontrolle (Methanol), wie in Wachstumstests auf AMM-Platten gezeigt wurde (A). *A. fumigatus*-Myzel wurde mit 200 ng/ml Rapamycin oder gleichen Mengen Lösungsmittel (Methanol) für 5 h versetzt (B). Die daraus hergestellten Proteinextrakte wurden sowohl in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt (links), als auch einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen αNrpA-Antikörpers K93 E6 unterzogen (rechts).

1.3 Untersuchungen zur Bildung und Lokalisation von NrpA in *A. fumigatus* mit Reporterstämmen

1.3.1 Herstellung verschiedener *A. fumigatus*-Stämme, die NrpA-Reportergenkonstrukte exprimieren

1.3.1.1 Herstellung von *A. fumigatus*-Stämmen, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) bilden

1.3.1.1.1 Herstellung von *A. fumigatus*-Stämmen, die ein NrpA-GFP-Fusionsprotein unter einer 1013 Bp großen *nrpA*-Promotorregion exprimieren (Pro_{nrpA} -NrpA-GFP)

Die Expression eines NrpA-GFP-Fusionsproteins sollte helfen, die Lokalisation und die Bildung des Proteins unter verschiedenen Bedingungen *in vivo* genauer zu untersuchen. Da das Fusionsprotein unter dem *nrpA*-Promotor exprimiert werden sollte, wurde eine 1013 Bp große Promotorregion gemeinsam mit dem *nrpA*-Gen ohne Stopkodon unter Verwendung der Primer 276 (5') und 277 (3') mit einer Pfu-Polymerase aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert. Die Sequenz des 5'Primers wurde dabei so gewählt, dass bei der Amplifizierung eine PstI-Schnittstelle in die generierte DNA eingefügt wurde. Durch einen Restriktionsverdau mit PstI konnten also DNS-Fragmente erzeugt werden, die am einen Ende PstI geschnitten waren und am anderen Ende wegen Verwendung der Pfu-Polymerase ein stumpfes DNS-Ende aufwiesen. Aus dem Zielvektor pSK379GFP wurde mit den beiden Restriktionsenzymen MssII und PstI der vor dem *gfp*-Gen lokalisierte *gpdA*-Promotor ausgeschnitten. Die verwendeten Schnittstellen erzeugten zugleich passende Enden, damit nach der Reinigung des Vektors das zuvor amplifizierte und geschnittene DNS-Stück gerichtet in den Vektor ligiert werden konnte. Das neu generierte Plasmid wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und aus zwei der entstandenen positiven Klone (Nr.1; Nr.9) wurde Plasmid-DNS isoliert und für die Protoplasten-Transformation von *A. fumigatus* Δ *akuA* eingesetzt. Dieser Aspergillus-Stamm trägt eine Deletion im Ku70-Protein und ist deswegen nicht in der Lage, fremde DNS über nicht homologe Integration in sein Genom aufzunehmen. Das bedeutet, dass die Integration fremder DNS in diesem Stamm nur gerichtet über homologe Rekombination erfolgen kann (Krappmann *et al.*, 2006). Die Integration von Teilen des Vektors in das *A. fumigatus*-Genom soll aufgrund von homologen DNS-Bereichen im Vektor am Histon-2a-Gen erfolgen. Um auf positive Klone selektieren zu können, enthält die durch homologe Rekombination integrierte Kasette auch ein Gen aus *E. coli*, welches für eine Pyrithiamine-Deaminase kodiert und dem Pilz somit Resistenz gegenüber Pyrithiamine vermittelt. Die Transformation lieferte vier Klone, die beide vom Plasmid 9 abstammten. Unter Anregung von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm leuchteten zwei dieser Klone (Klon 1 und 3) grün, was auf eine Expression von GFP hindeutete. Die Klone wurden

nochmals vereinzelt. Subklone wurden zusätzlich mit Buchstaben bezeichnet. Die Expression des NrpA-GFP-Fusionsproteins wurde einerseits mikroskopisch durch den Nachweis eines grün fluoreszierenden Proteins geführt sowie andererseits mittels Western-Blot-Analysen mit Hilfe des spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6. Der Antikörper erkannte in den Proteinextrakten der getesteten NrpA-GFP-Expressionsstämme neben dem nativen NrpA-Protein noch ein weiteres Protein, das mit einer Größe von 41,7 kDa dem errechneten Molekulargewicht von NrpA-GFP entspricht. Dabei stammen 14,8 kDa von NrpA und 26,9 kDa von GFP. Die Expression von NrpA-GFP scheint deutlich stärker als die des nativen Proteins.

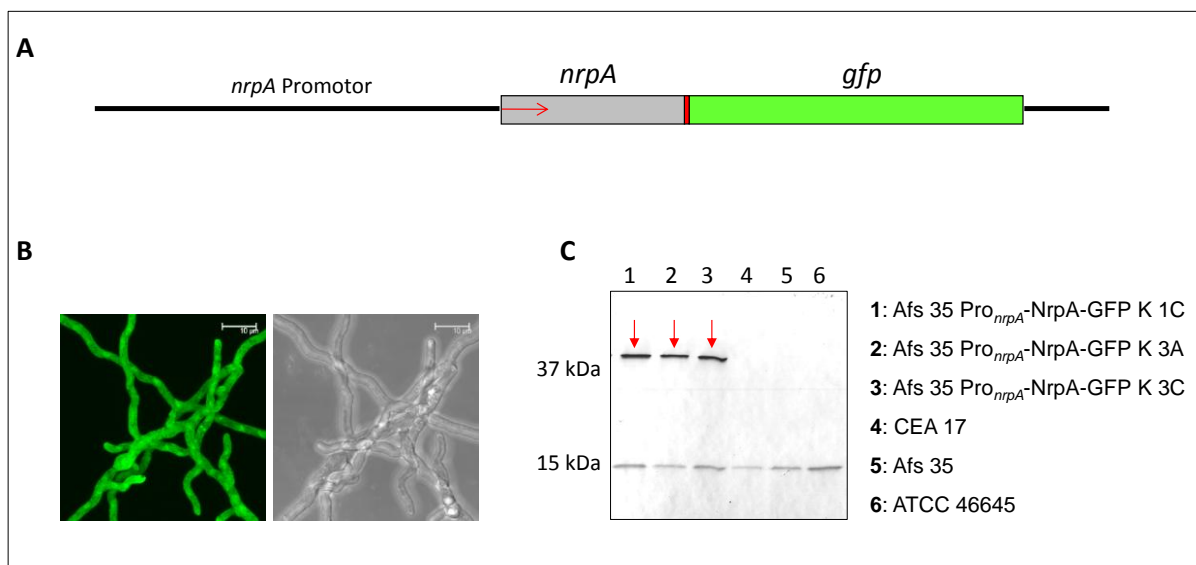


Abb. 30: Herstellung eines *A. fumigatus*-Stammes, der Pro_{*nrpA*}-NrpA-GFP bildet

Die nach der Transformation erhaltenen Stämme sollen ein NrpA-GFP-Fusionsprotein unter einer 1013 Bp großen fiktiven *nrpA*-Promotor-Region bilden. Der Aufbau des Konstrukts ist schematisch in (A) dargestellt (A). Die Funktionalität des GFP konnte durch Anregung mit einem Argon-Laser *in vivo* nachgewiesen werden (B). Dargestellt ist hier eine Projektion verschiedener, im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommenen Z-Ebenen. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m. Die tatsächliche Expression des Fusionsproteins wurde durch Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 nachgewiesen. Dabei wurden sowohl Expressionstämme (C 1, 2, 3) als auch Wildtypstämme (C 4, 5, 6) auf das Vorhandensein des 41,7 kDa großen Fusionsproteins (rote Pfeile) untersucht.

1.3.1.1.2 Herstellung eines *A. fumigatus*-Stammes, der das GFP unter einer 1013 Bp großen *nrpA*-Promotorregion bildet (Pro_{*nrpA*}-GFP)

Ein Kontrollstamm, der nur GFP unter der 1013 bp großen *nrpA*-Promotorregion bildet, sollte helfen zu unterscheiden, ob eine beobachtete Lokalisation des CipC-GFP-Proteins wirklich auf die Lokalisation von NrpA zurückzuführen ist oder durch GFP bedingt ist. Dafür wurde eine fiktive 1013 Bp große *nrpA*-Promotorregion mit den beiden Primern 276 und 287 aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert. Die Herstellung des Stammes

erfolgte ansonsten wie unter Ziffer 3.1.1.1 beschrieben. Die Transformation des Vektors in *A. fumigatus* lieferte vier Klone, von diesen leuchteten unter Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm drei grün.

1.3.1.2 Herstellung eines *A. fumigatus*-Stammes, der die β -Galaktosidase aus Δ unter einer 1016 Bp großen *nrpA*-Promotorregion bildet (Pro_{nrpA} -LacZ)

Durch die Verwendung eines weiteren Reportergens, nämlich *lacZ*, sollten zum einen die mit den GFP-Reporterstämmen erhobenen Daten unabhängig bestätigt werden. Zum anderen sollte die Promotoraktivität gemessen werden. Diese Messungen sind mit dem Reportergen *lacZ* einfacher durchzuführen als mit *gfp* (Brakhage und Langfelder, 2002). Zunächst wurde eine 1016 Bp große fiktive Promotorregion inklusive des Startkodons von *nrpA* mit den beiden Primern 177 und 178 aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden die beiden Schnittstellen BamHI und BglII eingeführt, mit deren Hilfe der Promotor im Vektor pAN argB 1 (van Gorcom *et al.*, 1985; van Gorcom *et al.*, 1986) im richtigen Leserahmen vor das β -Galaktosidase-Gen aus *E. coli* gesetzt werden konnte. Dies wurde durch PCRs bestätigt. Da für die Transformation in *A. fumigatus* ein *pyrG*-Stamm verwendet werden sollte, musste die Resistenzkassette des Vektors mithilfe von XbaI ausgeschnitten und durch eine *pyrG*-Kassette mit flankierenden XbaI-Schnittstellen ersetzt werden. Der fertige Vektor wurde durch Elektroporation in angeschwollene Sporen des *A. fumigatus*-Stammes CEA 17 (d'Enfert, 1996) eingebracht. Zur sofortigen Selektion auf β -Galaktosidase exprimierende Klone wurde der Transformationsansatz auf AMM-Platten ausplattiert. Diese enthielten Ammonium als N-Quelle und waren zuvor mit einer X-Gal-Lösung benetzt worden. Blaue Klone wurden nochmals vereinzelt bevor aus ihnen Sporenstammessuspensionen hergestellt wurden.

1.3.2 Expression der Reporterkonstrukte in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen

Aus Western-Blot-Versuchen war bereits bekannt, dass das NrpA-Protein in Abhängigkeit der N-Quelle gebildet wird. Dabei sind Glutamin und Ammonium Stickstoffquellen, die die Bildung des Proteins induzieren. In Anwesenheit von Glutamat und Nitrat wird das Protein nicht gebildet. Nun sollte überprüft werden, ob mit den hergestellten Reporterstämmen diese differentielle Expression des NrpA-Proteins dargestellt werden kann.

1.3.2.1 Bildung der GFP-Konstrukte (Pro_{nrpA}-NrpA-GFP und Pro_{nrpA}-GFP) in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen

Um die differentielle Bildung des NrpA-Proteins mit den Pro_{nrpA}-NrpA-GFP und den Pro_{nrpA}-GFP exprimierenden Pilzstämmen zu zeigen wurden verschiedene Klone in AM-Medium für die Lebendmikroskopie angezogen. Das AM-Medium enthielt als N-Quelle entweder Glutamat, Glutamin, Nitrat oder Ammonium in einer Konzentration von 20 mM. Anschließend wurde mit Hilfe eines Mikroskops untersucht, ob das GFP-Fusionsprotein gebildet wird. Sowohl das Fusionsprotein als auch das GFP alleine wurden unter jeder getesteten Bedingung gebildet. Die negative Regulation des Proteins war auch in mehreren verschiedenen Klonen nicht festzustellen. Um auszuschließen, dass die Deregulation des NrpA-GFP-Fusionsproteins mit dem verwendeten Ausgangstamm \DeltaakuA beziehungsweise mit der gerichteten Integration des Konstrukts am Histon-2A-Gen zu tun hat, wurde das Expressionskonstrukt auch in den *A. fumigatus*-Stamm ATCC 46645 eingebracht. Die dabei entstandenen Klone sollten das Konstrukt aufgrund der Fähigkeit des Stammes zur nicht-homologen Integration von DNS an verschiedenen zufälligen Stellen im Genom integriert haben. Auch eine Doppelintegration ist in diesem Stamm nicht ausgeschlossen. Mikroskopische Untersuchungen von vier dieser Klone ergaben wiederum keinen Hinweis auf eine Regulation der Expression durch die N-Quelle. Abb. 31 zeigt beispielhaft einen Versuch, in dem Ammonium und Nitrat als N-Quellen verwendet worden waren.

Eine weitere Erklärung für die nicht vorhandene negative Regulation des Fusionsproteins könnte auch eine zu kurze Promotorregion sein. So wurde etwa in *A. nidulans* wurde gezeigt, dass die Transkription des Isopenicillin-N-Synthase-Gens durch eine 2005 Bp große Promotorregion gesteuert wird (Perez-Esteban *et al.*, 1993). Deswegen wurde ein neues Expressionskonstrukt mit längerer Promotorregion hergestellt.

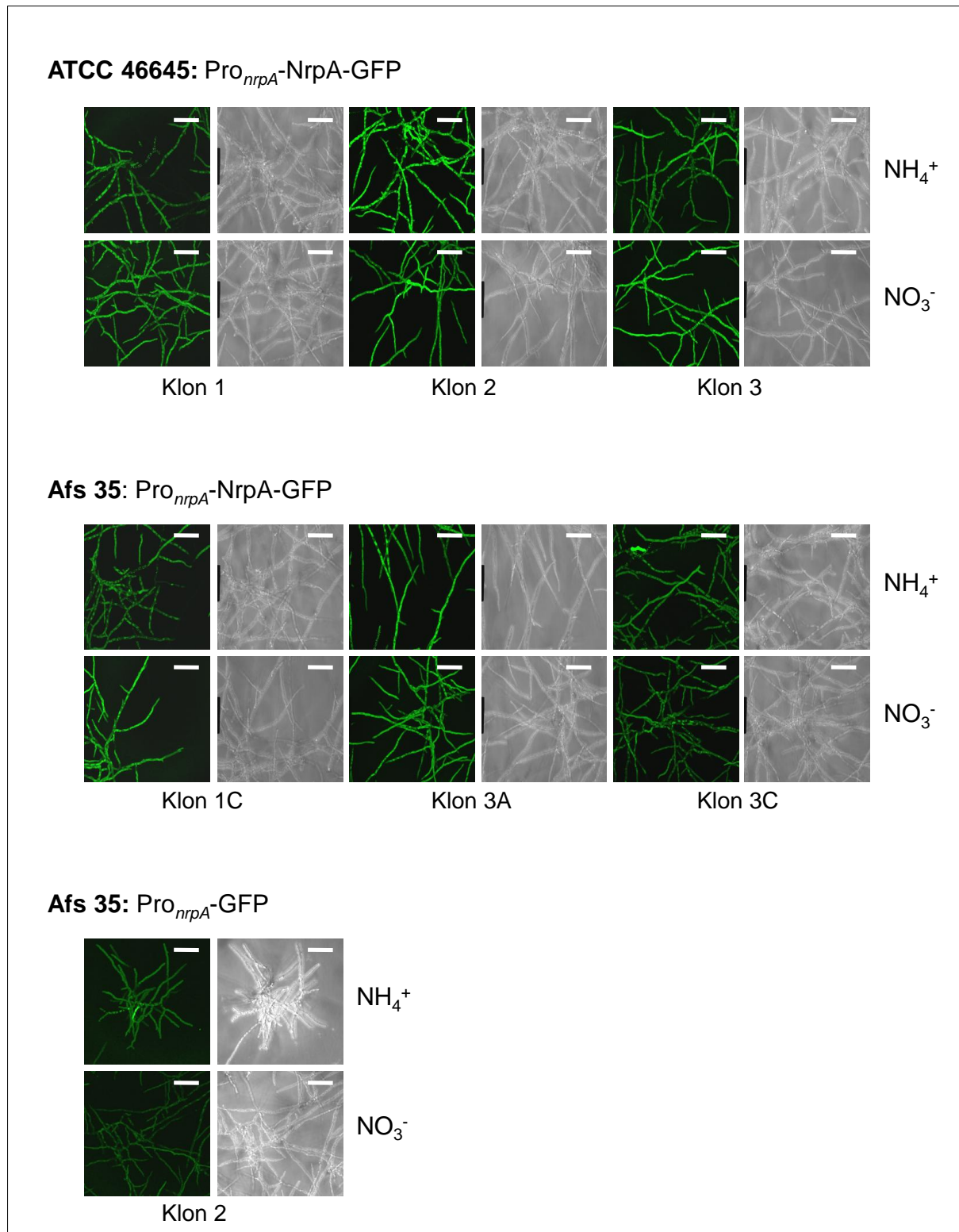


Abb. 31: Untersuchung des NrpA-GFP-Fusionskonstrukts auf eine N-abhängige Regulation

Das Expressionskonstrukt Pro_{nrpA}-NrpA-GFP wurde in zwei verschiedene *A. fumigatus*-Stämme (Afs 35; ATCC 46645) eingebracht. Jeweils drei Klone wurden durch Anregung mit einem Argon-Laser auf die Bildung des Fusionsproteins in Anwesenheit einer induzierenden (Ammonium) und einer nicht induzierenden (Nitrat) N-Quelle getestet. Auch der Kontrollstamm, der das Pro_{nrpA}-GFP-Konstrukt enthält, wurde in gleicher Weise untersucht. Der Größenbalken entspricht 50 μm .

1.3.2.1.1 Herstellung eines Stammes, der das NrpA-GFP-Fusionsprotein unter einer 1576 Bp großen *nrpA*-Promotorregion exprimiert (Pro_{*nrpA1576*}-NrpA-GFP)

Zur Herstellung des Stammes wurde eine 1576 Bp lange *nrpA*-Promotorregion gemeinsam mit *nrpA* ohne Stopcodon unter Verwendung der Primer 286 und 277 aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert. Ansonsten erfolgte die Herstellung des Stammes wie unter Punkt 3.1.1.2 angegeben. Die Transformation in *A. fumigatus* Afs 35 lieferte 13 positive Klone.

1.3.2.1.2 Bildung des GFP-Konstrukts Pro_{*nrpA1576*}-NrpA-GFP in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen

Um die differentielle Bildung des NrpA-Proteins mit dem Pro_{*nrpA1576*}-NrpA-GFP exprimierenden Pilzstamm zu testen wurden verschiedene Klone in AMM-Medium, das entweder Nitrat oder Ammonium in einer Konzentration von 20 mM enthielt, für die Lebendmikroskopie angezogen. Das Myzel in den Mikroskopierschälchen konnten dann mit einem konfokalen Life-Cell-Mikroskop unter Anregung mit einem Argon-Laser auf Expression des GFP-Fusionsproteins untersucht werden. Beide getesteten Klone exprimierten bei jeder der getesteten Bedingungen ein NrpA-GFP-Fusionsprotein. Wie in Abb. 32 zu sehen ist, scheint die Expression des GFP-Fusionsproteins in Anwesenheit der eigentlich nicht induzierenden N-Quelle Nitrat etwas schwächer zu sein. Auch unter Verwendung einer längeren Promotorregion konnte somit die erwartete differentielle Regulation von NrpA nicht dargestellt werden.

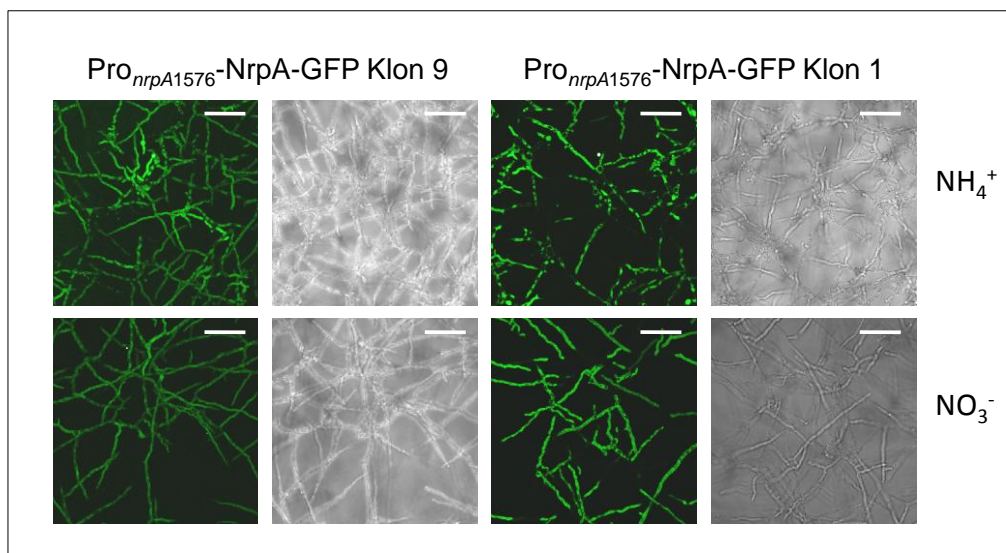


Abb. 32: Untersuchung des Pro_{*nrpA1576*}- NrpA-GFP-Fusionskonstrukts auf eine N-abhängige Regulation

Das Expressionskonstrukt Pro_{*nrpA1576*}-NrpA-GFP wurde in den *A. fumigatus*-Stamm Afs 35 eingebracht und zwei Klone wurden durch Anregung mit einem Argon-Laser auf Expression des Fusionskonstrukts in Anwesenheit einer induzierenden (Ammonium) und einer nicht-induzierenden N-Quelle getestet.

1.3.2.2 Expression des Pro_{nrpA}-LacZ-Konstrukts in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen

Um die differentielle Expression des Pro_{nrpA}-LacZ-Konstrukts zu untersuchen, wurden Sporen von zwei verschiedenen Klonen, die das Konstrukt exprimierten, auf AMM-Agarplatten aufgebracht. Dabei enthielten die Platten als N-Quelle entweder 20 mM Ammonium-Tartrat oder 20 mM Glutamat. Zudem waren die Platten vor Gebrauch mit einer X-Gal-Lösung beschichtet worden, um den Nachweis der β -Galaktosidase durch eine Blaufärbung der Pilze zu ermöglichen. Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 37° C und nochmals zwei Tagen bei 4° C zeigten alle getesteten Klone sowohl in Anwesenheit der induzierenden N-Quelle (Ammonium) als auch der nicht induzierenden N-Quelle (Glutamat) eine deutliche Blaufärbung. Klon A wurde als Kontrolle auch auf einer AMM-Platte (20 mM Glutamat) ohne X-Gal-Lösung ausgestrichen. Die entstandene Kolonie blieb weißlich-beige und zeigte keine Blaufärbung. Die erwartete differentielle Regulation des NrpA-Proteins war auch mit diesem Konstrukt nicht nachweisbar.

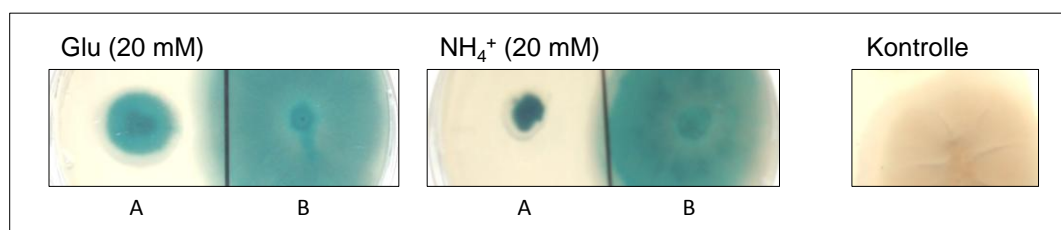


Abb. 33: Untersuchung des Pro_{nrpA}-LacZ-Konstrukts auf eine N-abhängige Regulation

Zwei Klone (A, B) von *A. fumigatus* Pro_{nrpA}-LacZ wurden auf AMM-Platten, die entweder 20 mM Glutamat (nicht induzierend) oder 20 mM Ammonium (induzierend) als N-Quelle enthielten, ausgestrichen. Da die Platten vor Gebrauch mit einer X-Gal-Lösung beschichtet worden waren, konnte die Expression von Pro_{nrpA}-LacZ durch eine Blaufärbung der Kolonien nachgewiesen werden. Die Kontrolle zeigt eine Pilzkolonie auf dem gleichen Nährmedium ohne X-Gal-Lösung.

1.3.3 Bildung von Pro_{nrpA}-NrpA-GFP in Anwesenheit von Concanamycin A

In einem vorherigen Western-Blot-Versuch war gezeigt worden, dass das zu CipC homologe Protein aus *A. fumigatus* in Anwesenheit des Antibiotikums Concanamycin A nicht stärker exprimiert wird. Dieses Ergebniss stand im Widerspruch zu Daten, die für *A. nidulans* erhoben worden waren (Melin *et al.*, 2002). Nun sollte mithilfe des Pro_{nrpA}-NrpA-GFP exprimierenden Pilzstammes untersucht werden, ob sich in Antwort auf Concanamycin A eine veränderte Lokalisation oder Expression des Fusionproteins ergibt. Dazu wurde der Klon 3A in einer Konzentration von 4×10^4 Sporen/ml in Mikroskopierschälchen in YNB Medium für 16 h inkubiert. Nach der Zugabe von Concanamycin A (20 μ g/ml oder 30 μ g/ml) oder des Lösungsmittels Methanol erfolgte eine nochmalige Inkubation für weitere 10 h. Anschließend wurde die grüne Fluoreszenz der Präparate untersucht und dokumentiert. Dabei konnte zunächst schon in der

Durchlichtmikroskopie beobachtet werden, dass Concanamycin A in *A. fumigatus* die beschriebene Wirkung zeigt. Tatsächlich waren die Hyphen in den Ansätzen mit Concanamycin A verkürzt und stark verzweigt gewachsen. Bei Anregung der Präparate mit einem Argon-Laser zeigte sich sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Concanamycin A eine flächige Expression von NrpA innerhalb der Hyphen (siehe Abb. 34).

In einem weiteren mikroskopischen Versuch sollte die Bildung und Verteilung des NrpA-GFP-Fusionsproteins und die Entwicklung der Hyphen in Anwesenheit von Concanamycin A als Zeitrasterfilm dargestellt werden. Dafür wurde YNB Medium mit 4×10^4 Sporen/ml versetzt und in Mikroskopierschälchen für 9,5 h vorinkubiert. Nach Zugabe von (1.) Concanamycin A (20 oder 30 $\mu\text{g/ml}$) oder (2.) Methanol oder (3.) ohne Zugabe wurde das konfokale Life-Cell-Mikroskop so eingestellt, dass ausgewählte Bereiche der Präparate alle 20 min fotografiert wurden. In dem entstandenen Film erkennt man wieder die kurzen verzweigten, durch Concanamycin A verursachten Hyphenformen. Weiterhin entstand in diesen Aufnahmen der optische Eindruck, dass das NrpA-GFP-Protein in Anwesenheit von Concanamycin A etwas stärker gebildet wird als es dies in der Kontrolle getan hat. Um dies genauer zu untersuchen wurden Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen αNrpA -Antikörper K93 E6 durchgeführt. Dazu wurden 2×10^5 Sporen/ml in 8 ml YNB-Medium für 15 h inkubiert und anschließend wurde für weitere 24 h Concanamycin A (20 $\mu\text{g/ml}$) oder Methanol zugesetzt. Aus dem entstandenen Myzel wurden anschließend Proteinextrakte hergestellt. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass das native NrpA-Protein – wie erwartet – in Anwesenheit von Concanamycin A in gleichen Mengen gebildet wurde wie in Abwesenheit des Antibiotikums. Auch das NrpA-GFP-Fusionsprotein zeigte in Anwesenheit von Concanamycin A keine deutlich stärkere Expression. Wiederum ist die etwas stärkere Bildung von NrpA-GFP im Vergleich zum nativen NrpA zu erkennen.

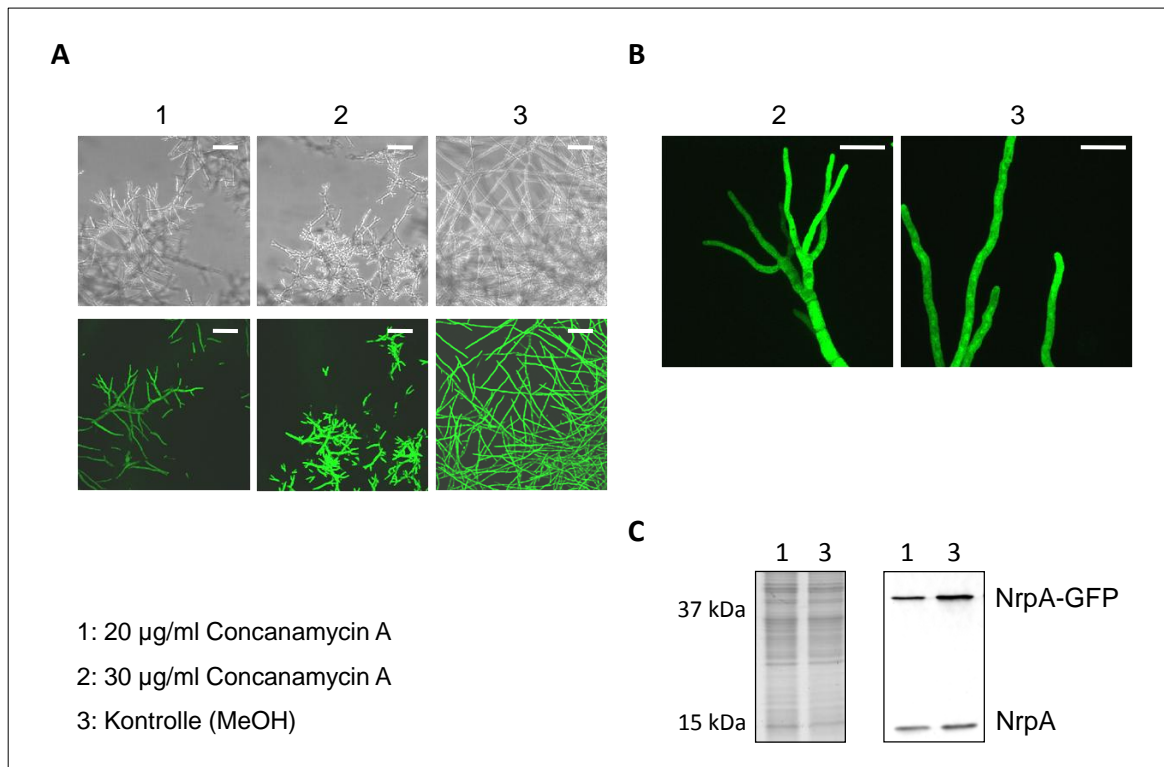


Abb. 34: Bildung des NrpA-Proteins in Anwesenheit von Concanamycin A

Mikroskopische Untersuchungen des *A. fumigatus* Stammes Pro_{nrpA}-NrpA-GFP zeigen die Expression von NrpA-GFP sowohl in Anwesenheit von Concanamycin A (A1: 20 µg/ml, A2: 30 µg/ml) als auch in Anwesenheit des Lösungsmittels Methanol (A3). Der durch Concanamycin A verursachte Wachstumsphänotyp, nämlich die kurzen stark verzweigten Hyphen, konnte beobachtet werden (A, B). In Abb. A steht der Größenbalken für eine Distanz von 60 µm, während er in B 20 µm lang ist. Proteinextrakte von *A. fumigatus*-Pro_{nrpA}-NrpA-GFP Hyphen, die entweder in Anwesenheit von 20 µg Concanamycin A (1) oder Methanol (3) gewachsen waren, wurden sowohl in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt als auch für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen αNrpA-Antikörper K93 E6 eingesetzt (C).

1.3.4 Untersuchung der Lokalisation von NrpA mithilfe der GFP-Reporter-Konstrukte

1.3.4.1 Das NrpA-GFP-Fusionsprotein ist auch in den Sporen nachweisbar

Schon in einer ersten Durchmusterung der Klone im Mikroskop unter Anregung bei 488 nm fiel auf, dass in den NrpA-GFP exprimierenden *A. fumigatus*-Stämmen auch die Sporen grün leuchten. Da es sich bei NrpA um ein eigentlich hyphenspezifisches Protein handelt, sollte geklärt werden, ob die grüne Färbung der Sporen tatsächlich durch das NrpA-GFP-Fusionsprotein verursacht wird. Es wurden Sporenproteinextrakte von zwei verschiedenen Klone hergestellt und im Western Blot analysiert. Tatsächlich erkannte der spezifische αNrpA-Antikörper K93 E6 im Sporenproteinextrakt dieser Klone ein Protein, das der Größe des NrpA-GFP-Fusionsproteins entsprach. Das native Protein wurde weder in Sporen von einem der NrpA-GFP-Klone noch in den Wildtypstämmen nachgewiesen. Aufgrund dieses Befunds stellte sich nun die Frage, ob das

NrpA-GFP-Protein in die Spore eingelagert wird oder auf der Sporenoberfläche lokalisiert ist. Zur Klärung dieser Frage wurden FACS-Analysen mit fixierten Sporen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass zwei unterschiedliche spezifische α NrpA-Antikörper (K93 E6 und K 237) auf der Oberfläche der Sporen kein Protein erkannten, obwohl beide Antikörper durchaus in der Lage waren, fixiertes, an Beads gekoppeltes NrpA-Protein zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Auch die Oberfläche der Sporen hatte durch die Fixierung keinen Schaden genommen, da ein Kaninchenserum, das Antikörper gegen Proteine der Sporenmembran enthält, in diesem Versuch positiv auf die Sporen reagierte. Das NrpA-GFP-Fusionsprotein ist anders als das NrpA-Protein auch in den Sporen nachweisbar. Da es nicht auf der Oberfläche der Konidien lokalisiert ist, scheint es im Inneren der Sporen vorzuliegen.

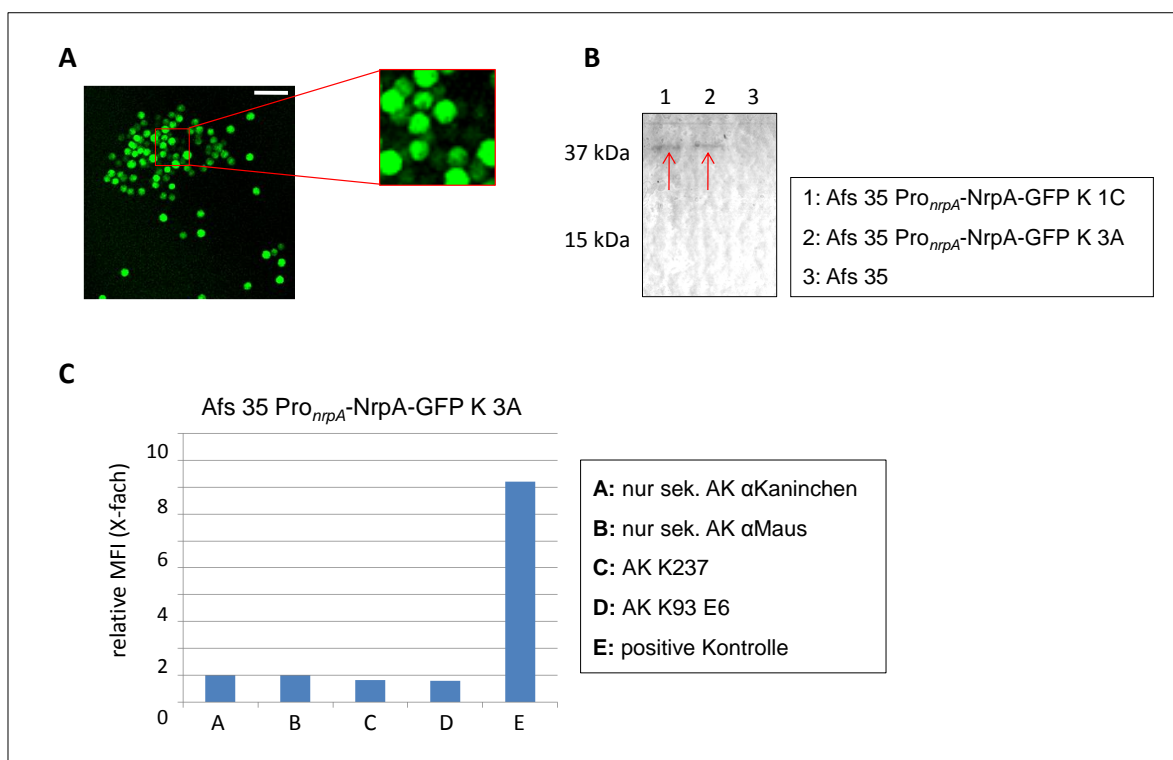


Abb. 35: Untersuchung der Sporen der NrpA-GFP exprimierenden *A. fumigatus*-Stämme auf Anwesenheit des NrpA-GFP-Fusionsproteins

Mikroskopische Untersuchungen der Pro_{nrpA}-NrpA-GFP-Stämme mit einem Argonlaser zeigen, dass auch die Sporen eine grüne Fluoreszenz aufweisen (A). Der Größenbalken steht hier für 10 μ m. Proteinextrakte der Sporen von zwei Expressionstämmen (B1, B2) und des Wildtypstammes (B3) wurden einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung der spezifischen α NrpA-Antikörper K93 E6 und K237 unterzogen. Das NrpA-GFP-Fusionsprotein ist mit roten Pfeilen markiert. Abb. C zeigt eine durchflusscytometrische Untersuchung der Sporenoberfläche des *A. fumigatus*-Stammes Afs 35 Pro_{nrpA}-NrpA-GFP Klon 3A unter Verwendung der beiden spezifischen α NrpA-Antikörper K237 (C) und K93 E6 (D). Eine positive Kontrolle ist unter E dargestellt. Beide verwendeten sekundären Antikörper wurden auch alleine verwendet (A, B). In oben gezeigtem Säulendiagramm ist die relative mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) als X-Faches der Fluoreszenzintensität der Kontrollansätze (A, B) dargestellt.

1.3.4.2 Das NrpA-GFP-Fusionsprotein wird in den Hyphen in großen Mengen gebildet

Im *A. fumigatus*-Stamm Pro_{nrpA}-NrpA-GFP zeigt das Fusionsprotein eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Hyphen. Dabei ergibt sich durch die Verwendung verschiedener Medien kein Lokalisationsunterschied. Entgegen den Erwartungen wird das Fusionsprotein auch in den Sporen exprimiert. In vielen Hyphen war deutlich zu sehen, dass das Fusionsprotein innerhalb bestimmter Zellorganellen fehlt, diese also nicht grün fluoreszieren. Dabei handelt es sich wahrscheinlich der - Größe und Form nach zu urteilen - um die Vakuolen.

Nur sehr selten fanden sich innerhalb eines Präparates Stellen, an denen sich das Protein zu punktförmigen Strukturen formierte. Dieses Verteilungsmuster zeigte sich in den Hyphen, die an der Luft gewachsen waren, deutlich häufiger, als in Myzel, das in flüssigem Medium kultiviert wurde. Die gleichmäßige Verteilung von NrpA im Zytoplasma konnte auch in der Immunfluoreszenz unter Verwendung des spezifischen α NrpA-Antikörper K93 gemacht werden. Die Färbung der Hyphen war dabei nicht auf eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zurückzuführen, wie durch eine Kontrolle gezeigt werden konnte.

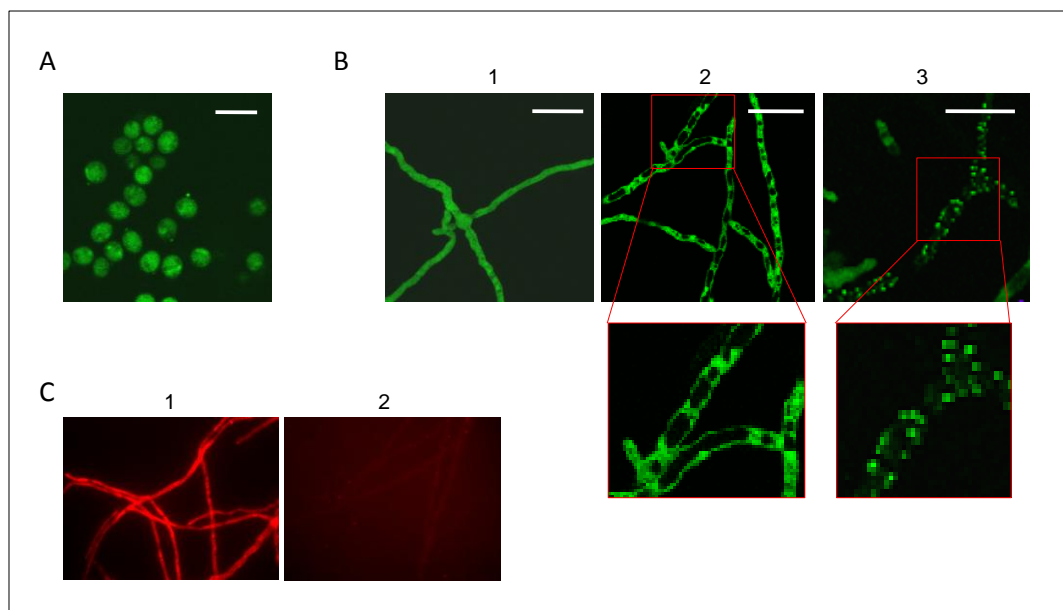


Abb. 36: Lokalisation von Pro_{nrpA}-NrpA-GFP

Im *A. fumigatus*-Stamm Afs 35 Pro_{nrpA}-NrpA-GFP wird das Fusionsprotein sowohl in den Sporen (A) als auch in den Hyphen (B) gebildet, wie die CLS-Mikroskopie unter Anregung bei 488 nm zeigt. In den Hyphen ist das Protein normalerweise gleichmäßig verteilt (B1). Oftmals kann man deutlich erkennen, dass sich das Protein wohl im Cytoplasma, nicht aber innerhalb der Vakuolen befindet (B2), wie hier in einer Z-Ebene eines Bildstapels zu sehen ist. Selten findet man das Protein in punktförmigen Strukturen (B3). Die gleichmäßige Verteilung von NrpA innerhalb der Hyphen konnte auch in der Immunfluoreszenz unter Verwendung des spezifischen α NrpA-Antikörper 93 gezeigt werden (C1). Der sekundäre Antikörper alleine lieferte keine rote Fluoreszenz der Hyphen (C2). Die dargestellten Größenbalken entsprechen bei A 5 μ m und bei B 20 μ m. Vergrößerte Ausschnitte sind mit roter Umrandung dargestellt.

1.3.4.3 H₂O₂ führt zu einer punktförmigen Lokalisation des NrpA-GFP-Fusionsproteins

In Western-Blot-Analysen war aufgefallen, dass das NrpA-Protein in Anwesenheit von etwa 30 mM H₂O₂ als Doppelbande vorliegt, die sowohl aus dem „normalen“ NrpA sowie aus einer leicht vergrößerten Variante mit etwas höherem apparenten Molekulargewicht besteht. Nun sollte unter Zuhilfenahme des *A. fumigatus*-Stammes Pro_{nnpA}-NrpA-GFP untersucht werden, ob sich durch H₂O₂ auch eine veränderte Lokalisation des Proteins ergibt. Für einen ersten Vorversuch wurden mikroskopische Lebendpräparate hergestellt. Für den Versuch wurden H₂O₂-Endkonzentrationen von 0, 0,3 mM, 3 mM und 6 mM H₂O₂ eingesetzt. Am konfokalen Life-Cell-Mikroskop wurden von bestimmten ausgewählten Bereichen der Präparate in regelmäßigen Abständen Bilder gemacht, die zu einem Zeitraffer-Film zusammengesetzt werden konnten. Diese Bildsequenzen starteten etwa 15 min nach der Zugabe von H₂O₂ und endeten nach 1 h 30 min. Dabei zeigte sich deutlich, dass das NrpA-GFP in Anwesenheit von 3 und 6 mM H₂O₂ seine Lokalisation schon nach kurzer Zeit veränderte. War es zunächst noch gleichmäßig in den Hyphen verteilt, begann es sich in punktförmige Strukturen zu formieren. Die beiden Präparate, die kein oder sehr wenig H₂O₂ enthielten, zeigten keine auffällige Veränderung. Durch weitere Versuche wurde festgestellt, dass der Effekt auch bei einer H₂O₂-Konzentration von 30 mM zu beobachten war. Allerdings war der Effekt dann meist schwächer. Noch höhere Konzentrationen von H₂O₂ führten dazu, dass die Fluoreszenz des GFP sehr schnell verblasste. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt durch NrpA und nicht durch GFP bedingt ist, wurde auch der *A. fumigatus*-Stamm Pro_{nnpA}-GFP als Kontrolle verwendet. Die Vitalität der Hyphen unter den angegebenen Versuchsbedingungen wurde durch eine Propidiumjodidfärbung nachgewiesen. Durch eine Kolokalisationsstudie mit DAPI konnte gezeigt werden, dass die punktförmigen Strukturen nicht in den Zellkernen lokalisiert sind.

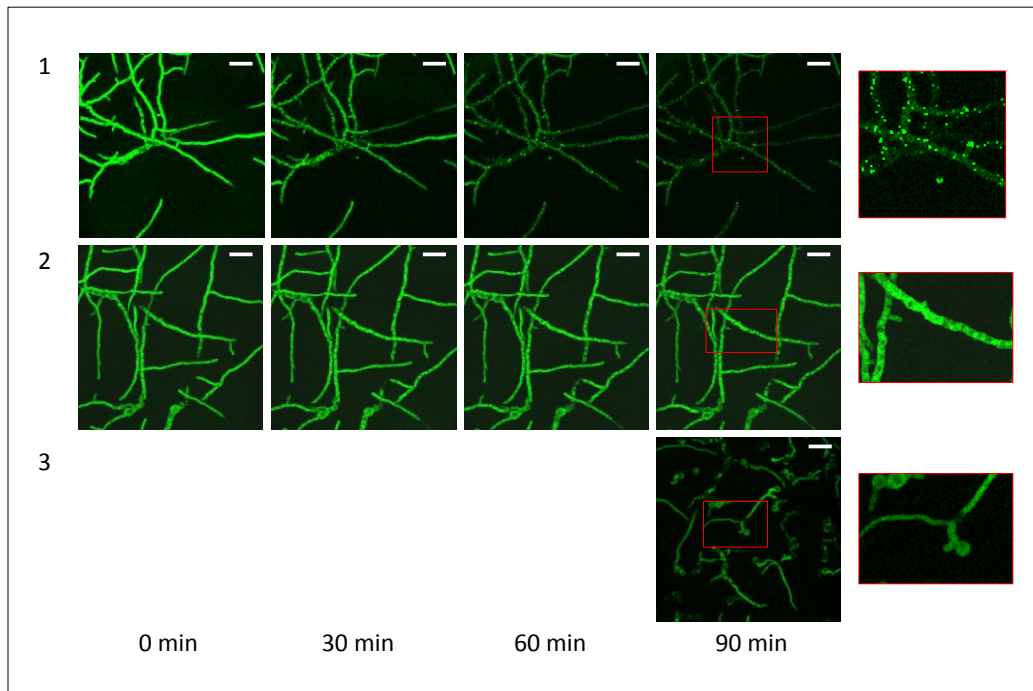


Abb. 37: H₂O₂ führt zu einer punktförmigen Lokalisation von NrpA-GFP

Myzel des *A. fumigatus*-Stammes Pro_{nrpA}-NrpA-GFP (1) wurde einmal nach Zugabe von 3 mM H₂O₂ im CLS-Mikroskop unter Anregung mit einem Argon-Laser alle 30 min photographiert. Die dargestellten Bilder zeigen eine Überlagerung mehrerer Z-Ebenen. Die Größenbalken entsprechen 30 µm. Als Kontrolle wurde zum einen der gleiche Stamm unbehandelt photographiert (2), zum anderen wurde ein Pro_{nrpA}-GFP- Stamm nach der gleichen Inkubationszeit mit der gleichen H₂O₂-Menge photographiert (3). Vergrößerte Bereiche sind rot umrandet dargestellt.

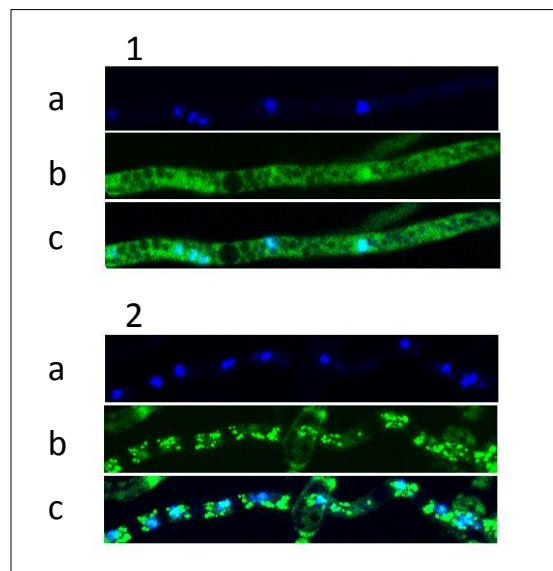


Abb. 38: Die punktförmigen Strukturen von NrpA-GFP sind nicht im Zellkern lokalisiert

Myzel des *A. fumigatus*-Stammes Pro_{nrpA}-NrpA-GFP wurde mit DAPI gefärbt und einmal ohne (1) und einmal mit Zugabe von 3 mM H₂O₂ unter dem Mikroskop photographiert. Die Hyphen sind sowohl nach Anregung mit ultraviolettem Licht (a) als auch nach Anregung mit einem Argon-Laser (b) dargestellt. Die Übereinanderlagerung beider Bilder ist unter c abgebildet.

1.4 Herstellung und Charakterisierung einer *A. fumigatus nrpA*-Deletionsmutante

Die Herstellung einer *nrpA*-Deletionsmutante sollte helfen, die Funktion des NrpA-Proteins zu klären. Für die Herstellung des Deletionskonstrukts wurden zunächst die flankierenden DNS-Bereiche von *nrpA* amplifiziert. Sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des Gens wurde dafür ein Bereich von ca. 1000 Bp ausgewählt. In beiden Fällen wurden die Starteroligonukleotide aus der Genomsequenz von *A. fumigatus* 293 abgeleitet. Die Amplifikation des stromaufwärts gelegenen Bereichs aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 mit den Primern 159 und 160 verlief problemlos. Die zur Amplifikation des stromabwärts gelegenen Bereichs aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 verwendeten Primer 161 und 162 lieferten dagegen ein um ca. 1400 Bp zu großes Amplifikationsprodukt. Um die vermeintliche Fehlpaarung der beiden Primer zu umgehen, wurden zwei neue Oligonukleotide (163 und 164) aus der DNS-Sequenz abgeleitet, mit denen ein ähnlicher Bereich amplifiziert werden sollte. Nachdem auch dieses Amplifikationsprodukt um ca. 1400 Bp zu groß war, sollte durch eine Sequenzierung geklärt werden, warum sich die Genomsequenz von *A. fumigatus* ATCC 46645 an dieser Stelle vom Stamm 293 unterscheidet. Durch die Sequenzierung konnte eine 273 Bp stromabwärts des Stopcodons von *nrpA* beginnende Insertion von 1422 Bp identifiziert werden. Diese Insertion zeigt eine 91-prozentige Identität zu einem Teilbereich des Taf1-Transposons aus *A. fumigatus* (Nukleotide 605 bis 2023 der „accession number AY971670“; Monroy und Sheppard, 2005). Die identifizierte Insertion entspricht dem C-terminalen Teil der Taf1-Transposase, was darauf hindeutet, dass dieses genetische Element biologisch nicht aktiv ist.

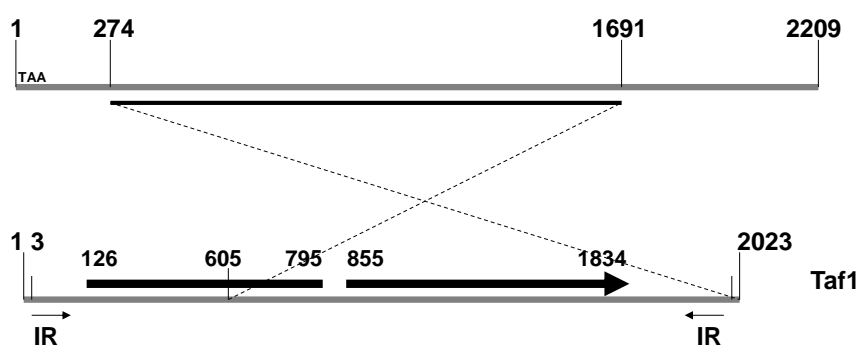


Abb. 39: Schematische Darstellung der genomischen Insertion stromabwärts von *nrpA* in *A. fumigatus* ATCC 46645

Die obere Darstellung zeigt die genomische Region stromabwärts von *nrpA* in *A. fumigatus* ATCC 46645, beginnend mit dem Stopkodon (TAA) von *nrpA*. Im unteren Teil ist das vollständige Taf1-Transposon dargestellt. Der schwarze Pfeil steht dabei für die beiden Exons des Transposase-Gens. Die flankierenden invertierten Wiederholungen („inverted repeats“ IR) sind auch dargestellt. Durch die unterbrochenen Linien wird der homologe Bereich gekennzeichnet. Die angegebenen Zahlen stehen für die Anzahl der Basenpaare basierend auf den jeweiligen Datenbankeinträgen (AM086260 und AY971670).

Aufgrund des stromabwärts von *nrpA* integrierten Transposons im Stamm ATCC 46645 wurden beide DNS-Stücke nochmals unter Verwendung der ursprünglich geplanten Oligonukleotide problemlos aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* CEA 17 amplifiziert. Anschließend konnten die beiden flankierenden DNS-Bereiche über in die Starteroligonukleotide künstlich eingeführte NotI-Schnittstellen entsprechend ihrer Orientierung im Genom zusammenligiert werden. Das entstandene neue Fragment wurde über zwei endständige EcoRI-Schnittstellen in einen zuvor auch mit EcoRI aufgeschnittenen pUC19-Vektor eingebracht. In dieses Plasmidkonstrukt konnte über die NotI-Schnittstelle, die zuvor mit den beiden Primern 157 und 158 aus *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifizierte, ca. 1500 Bp große *pyrG*-Resistenzkassette zwischen den up- und downstream-Bereich gesetzt werden. Die korrekte Zusammensetzung des Konstrukts wurde durch Sequenzierungen bestätigt.

Das über die EcoRI-Schnittstelle wieder aus dem Vektor geschnittene Deletionskonstrukt wurde durch Elektroporation in den Stamm *A. fumigatus* CEA 17 (*pyrG*⁻) eingebracht. Dieser Stamm enthält eine Punktmutation im *pyrG*, welches für die Orotidine-5`-Monophosphatdecarboxylase kodiert und für die *de-novo*-Synthese von Uracil benötigt wird. Soll dieser Stamm auf Minimalmedium wachsen, benötigt er eine Supplementation mit 5 mM Uridine oder Uracil. Auf normalem Minimalmedium kann der Stamm also nur wachsen, wenn er durch Transformation ein intaktes *pyrG*-Gen aufgenommen hat. Durch mehrere Transformationsereignisse entstanden zahlreiche Klone, die das Konstrukt aber an einer anderen zufälligen Stelle im Genom integriert hatten. In keinem dieser Klone war *nrpA* deletiert worden. Wie erwartet, stellt die nicht homologe Rekombination in *A. fumigatus* für die Herstellung einer Deletionsmutante ein großes Problem dar. Um dieses Problem zu umgehen, wurde für die folgenden Transformationen der *A. fumigatus*-Stamm \DeltaakuB verwendet. Dieser Stamm enthält ebenso wie der Ausgangsstamm CEA 17 eine Punktmutation im *pyrG*. Daneben ist durch eine Deletion des *akuB*-Gens das zu Ku80 homologe Protein ausgeschaltet (\DeltaakuB) (da Silva Ferreira *et al.*, 2006). Dadurch ist dieser Stamm nicht mehr in der Lage, eine nicht-homologe Rekombination auszuführen und kann fremde DNS daher nur über homologe Rekombination ins Genom aufnehmen. Aus der Transformation dieses Stammes ging ein Klon hervor, der das Deletionskonstrukt an der richtigen Stelle integriert hatte.

Zunächst wurde die Deletion von *nrpA* in *A. fumigatus* CEA 17 \DeltaakuB mittels PCR überprüft. Dafür wurden Primer verwendet, von welchen jeweils einer innerhalb des Konstrukts (innerhalb der *pyrG* Kassette) und ein anderer außerhalb des Konstrukts bindet. Mit dieser Kombination von Starteroligonukleotiden konnten PCR-Produkte nur gebildet werden, wenn das Deletionskonstrukt an der richtigen Stelle im Genom integriert worden war. Zunächst wurde chromosomale DNS der potentiellen Mutanten sowie des Ursprungsstammes isoliert und für die

Test-PCR eingesetzt. Der erste PCR-Ansatz sollte die richtige Integration des Deletionskonstrukts vom 3`-Ende her prüfen. Die beiden Starteroligonukleotide 201 und 202 amplifizierten aus der DNS der potentiellen Mutante K15 ein 1692 Bp großes DNS-Fragment, welches im Ursprungsstamm nicht gebildet worden war. Die zweite PCR-Reaktion sollte die Integration von der anderen Seite ausgehend beweisen. Auch hier wurde mit den beiden Starteroligonukleotiden 203 und 204 aus der DNS der potentiellen Mutante ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1457 Bp amplifiziert. Wieder war die PCR im Kontrollstamm negativ. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die richtige Integration des Deletionskonstrukts und somit die Deletion von *nrpA* bestätigt werden. Für den Nachweis, dass das Deletionskonstrukt an nur einer, nämlich der richtigen Stelle im Genom integriert wurde, wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Dafür wurde chromosomale DNS der potentiellen Mutante und des Ursprungsstammes mit BsiI verdaut und für den Southern-Blot eingesetzt. Die verwendete Sonde mit einer Größe von 502 Bp wurde mit den Starteroligonukleotiden 185 und 186 aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* amplifiziert. Im Kontrollstamm sollte sie an ein 1638 Bp großes DNS-Fragment binden. Tatsächlich erkennt man auf der Membran etwas oberhalb der kleinsten Markerbande, die eine Größe von 1515 Bp hat, ein Signal. Da das Restriktionsenzym BsiI im *nrpA*-Gen schneidet und in der *pyrG*-Kassette dagegen nicht, verschwindet diese Schnittstelle durch eine Deletion von *nrpA*. Die Sonde würde in diesem Fall an ein DNS-Fragment mit einer Größe von 4058 Bp binden. Tatsächlich detektierte die Sonde in der aufgetrennten, auf der Membran fixierten DNS der potentiellen $\Delta nrpA$ -Mutante ein DNS-Fragment, das zwischen den beiden Marker-DNS-Banden mit einer Größe von 3639 Bp bzw. 4889 Bp gelaufen war. Damit wurde auch die einmalige Integration des Deletionskonstrukts bestätigt.

Zuletzt sollte auch noch mit Hilfe von Western-Blots gezeigt werden, dass das NrpA-Protein im Stamm CEA 17 $\Delta akuB \Delta nrpA$ nicht gebildet wird. Dafür wurden Proteinextrakte des Deletionsstammes und des Ursprungsstammes hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Der α NrpA-Antikörper K93 E6 reagierte mit keinem Protein der Mutante. Im Ursprungsstamm dagegen erkannte er ein Protein passender Größe.

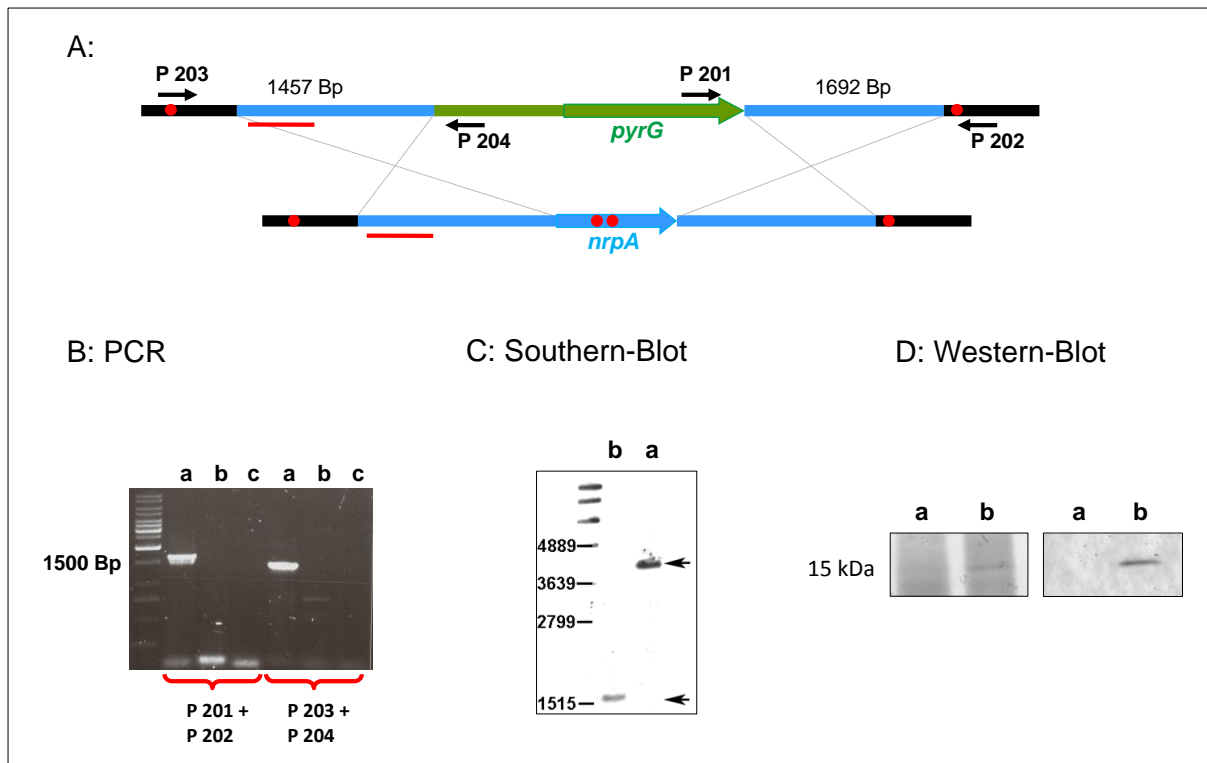


Abb. 40: Nachweis der Deletion von *nrpA* in *A. fumigatus* \DeltaakuB

Das Deletionskonstrukt, als auch die Bindungsorte der für die PCR-Reaktion verwendeten Starteroligonukleotide sind unter A abgebildet. Die roten Linien markieren die Hybridisierungsorte der für den Southern-Blot verwendeten Sonde. Rote Punkte kennzeichnen die BsiI-Schnittstellen. Der Nachweis der Deletion von *nrpA* erfolgte mittels PCR (B), Southern-Blot-Analyse (C) und Western-Blot-Analyse (D) unter Verwendung des spezifischen α NrpA-Antikörpers K93 E6. Die potentielle $\DeltaakuB\Delta nrpA$ -Mutante (a) wurde jeweils mit dem \DeltaakuB -Stamm (b) verglichen. Eine Kontroll-PCR-Reaktion unter Verwendung von H₂O als Matritze ist unter c dargestellt.

Nachdem die korrekte Deletion des *nrpA*-Gens in *A. fumigatus* CEA 17 \DeltaakuB bestätigt worden war, sollte der Phänotyp der Mutante bestimmt werden, um genauere Hinweise auf die Funktion des Proteins zu erhalten. Damit Mutante und Wildtyp gleiche Wachstumsvoraussetzungen haben, wurde als zugehöriger Wildtypstamm *A. fumigatus* CEA 17 \DeltaakuB *pyrG*⁺ verwendet. Zur Vereinfachung wird im folgendem der Stamm *A. fumigatus* CEA 17 \DeltaakuB $\Delta nrpA$ als $\Delta nrpA$ -Mutante oder Mutante und der Stamm CEA 17 \DeltaakuB *pyrG*⁺ als Wildtyp-Stamm bezeichnet.

1.4.1 Vergleichende Wachstumsversuche von Wildtyp und Mutante

Das Wachstum von filamentösen Pilzen kann entweder durch Bestimmung des Feucht- oder Trockengewichts oder durch das Messen des radialen Wachstums auf Agarplatten erfolgen. Bei den folgenden Versuchen wurde das radiale Wachstum des Pilzes auf festen Nährmedien verfolgt.

1.4.1.1 Radiales Wachstum bei verschiedenen Temperaturen

Beim Vergleich des radialen Wachstums von Mutante und Wildtyp auf PD-Agarplatten ergab sich sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C und 46°C kein auffälliger Wachstumsunterschied.

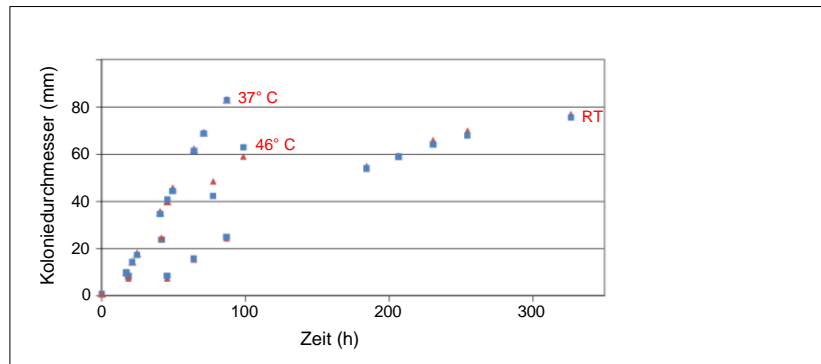


Abb. 41: Radiales Wachstum der $\Delta nrpA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Temperaturen

Das radiale Wachstum der $\Delta nrpA$ -Mutante (■) und des Wildtyps (▲) wurde bei Raumtemperatur (RT), bei 37° C und bei 46° C bestimmt.

1.4.1.2 Radiales Wachstum in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Glutamat und Ammonium

Das radiale Wachstum von Mutante und Wildtyp wurde auch auf AMM-Agarplatten bei 37° C getestet, die jeweils folgende N-Quellen in den angegebenen Konzentrationen enthielten: Ammonium-Tartrat (2; 20; 40 mM) und Na-Glutamat (0,5; 5; 50 mM). Bei keiner der getesteten Konditionen konnte ein Wachstumsunterschied festgestellt werden.

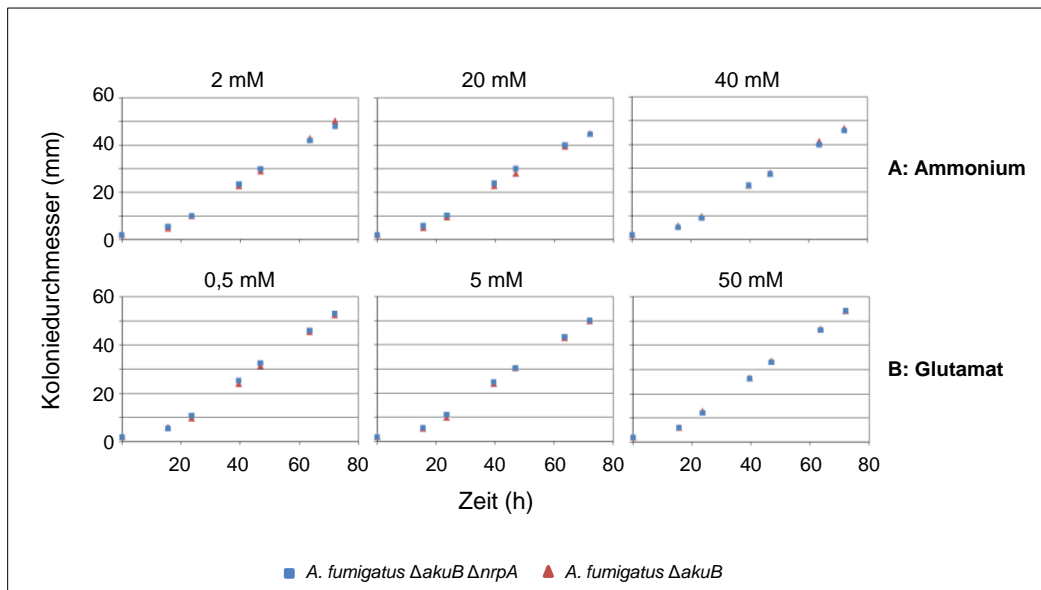


Abb. 42: Radiales Wachstum der $\Delta nrpA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in Anwesenheit verschiedener N-Quellen

Das radiale Wachstum der $\Delta nrpA$ -Mutante (■) und des Wildtyps (▲) wurden in Anwesenheit von 2, 20 und 40 mM Ammonium (A) und 0,5, 5, 50 mM Glutamat (B) bestimmt.

1.4.2 Tüpfeltests

Tüpfeltests werden bei Pilzmutanten oft zur Charakterisierung des Phänotyps eingesetzt, da auf diese Weise schon geringe Wachstumsunterschiede zwischen Mutante und Wildtyp dargestellt werden können.

1.4.2.1 Tüpfeltests auf verschiedenen Gradientenagarplatten

Für die Tüpfeltests wurden AMM-Agarplatten verwendet, die jeweils einen unterschiedlichen Konzentrationsgradienten aufwiesen. Es handelte sich dabei zum einen um einen Konzentrationsgradienten folgender N-Quellen: Ammonium (20; 10; 5; 2,5 mM), Nitrat (100; 70; 7; 0,7 mM) und Glutamat (50; 5; 0,5 mM). Die Konzentrationsangaben in den Klammern beziehen sich auf die jeweilige Maximalkonzentration auf der Platte. Zum anderen wurden Standard-AMM-Agarplatten untersucht, die einen NaCl-Konzentrationsgradienten enthielten. In diesem Fall betrug die verwendete Maximalkonzentration 1 M. Auf keiner dieser Platten konnte ein Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden, obwohl auch Bedingungen getestet wurden, unter denen NrpA normalerweise gebildet wird (Ammonium, NaCl).

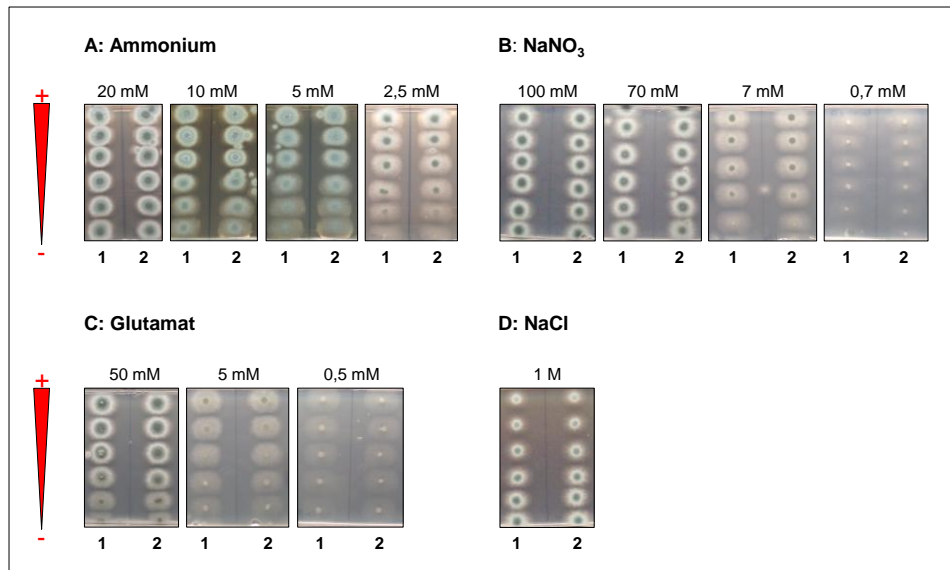


Abb. 43: Vergleichende Tüpfeltests auf Gradientenagarplatten

Die $\Delta nrpA$ -Mutante (2) und der Wildtyp (1) wurden auf Gradientenagarplatten mit verschiedenen N-Quellen durch Tüpfeltests untersucht. Die jeweilige Maximalkonzentration ist angegeben.

1.4.2.2 1.4.1.2.2 Tüpfeltests in Anwesenheit verschiedener C- oder N-Quellen

Für diese Tüpfeltests wurden Standard-AMM-Agarplatten mit folgenden unterschiedlichen C-Quellen hergestellt: Glukose, Glycerin, Ethanol, Saccharose, Fruktose, Sorbit, Maltose, Galaktose, Mannose, Mannit, Laktose, BSA und Ammoniumacetat. Alle C-Quellen wurden 1-prozentig verwendet. Daneben wurden auch AMM-Platten verwendet, die verschiedene N-Quellen, nämlich Ammonium (20 mM), Glutamat (5 mM) und Nitrat (70 mM), enthielten. Als Kontrollen dienten Platten ohne C- oder N-Quelle. Auf keiner der getesteten Platten konnte ein Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden.

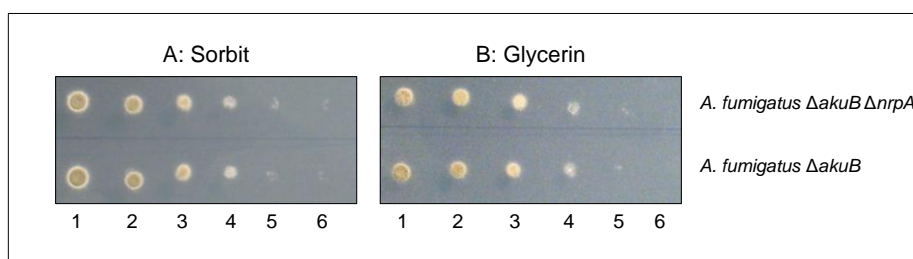


Abb. 44: Vergleichende Tüpfeltests in Anwesenheit verschiedener C- oder N-Quellen

Die $\Delta nrpA$ -Mutante (oben) und der Wildtyp (unten) wurden auf Agarplatten mit verschiedenen C- oder N-Quellen durch vergleichende Tüpfeltests untersucht. Hier sind beispielhaft die Tüpfeltests der Agarplatten, die Sorbit (A) oder Glycerin (B) enthielten, gezeigt. Insgesamt wurden sechs verschiedenen Verdünnungsstufen untersucht (1-6).

1.4.3 Phenotyp-Microarray

Zur Identifizierung von Wachstumsunterschieden zwischen Mutante und Wildtyp in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsbedingungen wurden *Phenotyp-Microarrays* durchgeführt. Dafür wurden zwei verschiedene Biolog-Platten verwendet: mit der einen Platte (PM9) konnten 96 verschiedene N-Quellen getestet werden, während an Hand der anderen Platte das Wachstum in Anwesenheit unterschiedlicher 96 pH-Werte (PM10) und Bedingungen analysiert werden konnte. Eine genaue Auflistung der untersuchten Konditionen ist im Anhang zu finden. Mutante und Wildtyp zeigten auf der Platte PM10 (pH-Werte) kein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Ein hier sichtbarer Wachstumsunterschied basiert auf einem Fehler beim Animpfen. Der einzige identifizierte leichte Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp konnte auf der Platte PM9 (N-Quellen) gefunden werden. Die Mutante hat am Ende der Inkubationszeit weniger Sporen gebildet als der Wildtyp, sie scheint somit in Anwesenheit von Asparagin etwas schlechter wachsen zu können.

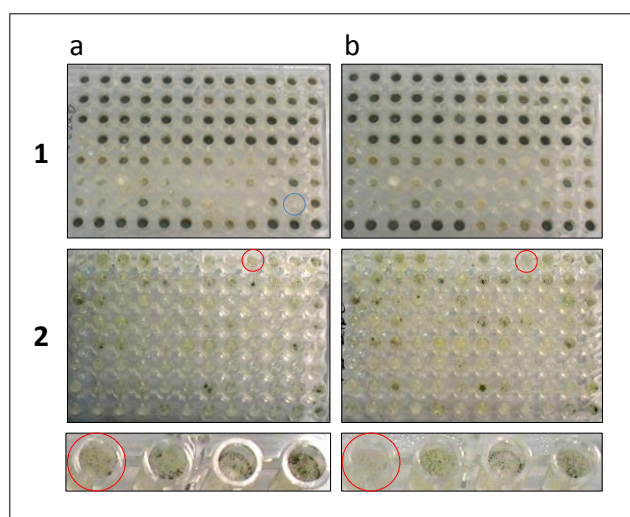


Abb. 45: Phenotyp-Microarray

Das Wachstum des Wildtyps (a) und der $\Delta nrpA$ -Mutante (b) wurde sowohl in Anwesenheit unterschiedlicher pH-Werte (1) als auch in Anwesenheit unterschiedlicher N-Quellen verglichen. Der optisch identifizierte in blau markierte Wachstumsunterschied basiert auf einem Fehler beim Animpfen. Der optisch identifizierte und rot markierte Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp in Anwesenheit der N-Quelle Asparagin ist auch in einer vergrößerten Ansicht dargestellt (unten).

1.4.4 Hemmhofversuch mit H_2O_2

Da H_2O_2 für eine punktförmige Lokalisation des NrpA-Proteins verantwortlich zu sein scheint (siehe Punkt 3.4.3) und weiterhin auch in Blot-Experimenten zu einem veränderten Laufverhalten von NrpA geführt hatte, sollte nun untersucht werden, ob sich Mutante und Wildtyp in Anwesenheit von H_2O_2 unterschiedlich verhalten. Sporen beider Pilzstämmen wurden in gleichen

Konzentrationen auf PD-Agarplatten ausplattiert. In die Mitte der Agarplatte wurden mit H_2O_2 getränkte Filterplättchen gelegt und die gebildeten Hemmhöfe wurden nach ca. 48 h ausgemessen. Der mittlere Hemmhofdurchmesser der Mutante betrug 3,85 cm und der des Wildtyps 3,8 cm. Somit konnte kein unterschiedliches Wachstumsverhalten von Mutante und Wildtyp in Anwesenheit von H_2O_2 festgestellt werden.

1.4.5 In der *A. fumigatus* $\DeltaakuB\Delta nrpA$ -Mutante wird die Katalase 1 stärker exprimiert

Nach Auftrennung der Proteinextrakte in SDS-Gelen und anschließender Färbung mit Coomassie waren im Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp zwei Proteinbanden aufgefallen, die in der Mutante stärker exprimiert schienen. Um diese beiden zwischen 75 und 100 kDa laufenden Banden präzise aus einem Gel auszuschneiden und mittels MALDI-TOF zu identifizieren, wurden die Proben zunächst über 12%-prozentige SDS-Gele sehr lange aufgetrennt. Die anschließenden MALDI-TOF-Analysen der ausgeschnittenen Proteinbanden ergaben, dass es sich bei dem etwas kleineren Protein um die Myzel-Katalase 1 handelt, die auch als Katalase B bezeichnet wird (Calera *et al.*, 1997). Diese Identifizierung erfolgte mit hoher Signifikanz. Das etwas größere Protein wurde mit geringer Signifikanz als Dipeptidylpeptidase identifiziert. Beide Proteine entsprachen etwa ihrer vorhergesagten Größe von 80 bzw. 87 kDa.

Um die Überexpression der Katalase 1 in der $\Delta nrpA$ -Mutante unabhängig zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit Proteinextrakten der Mutante und des Wildtyps unter Verwendung des spezifischen α Cat1-Antikörper I224-1 (Taubitz, 2005) durchgeführt. Der Antikörper reagierte mit dem Proteinextrakt der Mutante deutlich stärker als mit dem des Wildtyps. Das erkannte Protein entsprach mit 80 kDa der für die Cat1 erwarteten Größe.

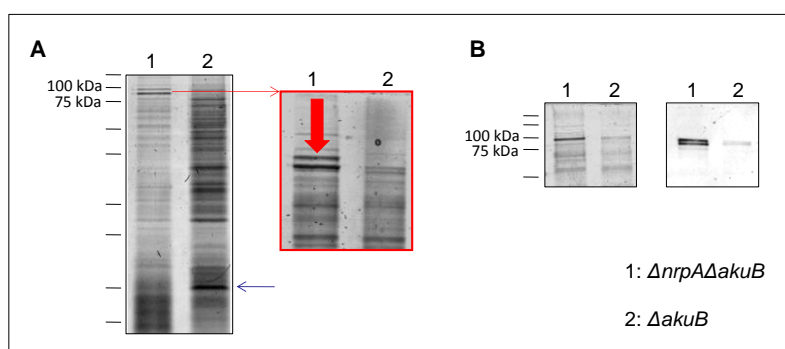


Abb. 46: Identifizierung von zwei in *A. fumigatus* $\Delta nrpA$ $\Delta akuB$ und *A. fumigatus* $\Delta akuB$ unterschiedlich exprimierten Proteine

Proteinextrakte von *A. fumigatus* $\Delta akuB$ $\Delta nrpA$ (1) und *A. fumigatus* $\Delta akuB$ (2) wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der blaue Pfeil markiert NrpA. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt (A). Ein vergrößerter Teilbereich des Gels ist mit roter Umrandung dargestellt. Ein roter Pfeil weist auf die in den beiden Stämmen differenziell exprimierten Proteine hin. Proteinextrakte der beiden Stämme wurden auch einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α Cat1-Antikörper I224-1 unterzogen (B). Dabei ist links ein mit Coomassie gefärbtes 12 %iges SDS-Gel dargestellt und rechts der Western-Blot.

1.5 Die Rolle des NrpA-Proteins während der Virulenz von *A. fumigatus*

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war gezeigt worden, dass ein zu *cipC* und somit auch zu *nrpA* homologes Gen in *C. neoformans* während der Infektion in einem Meningitis-Modell deutlich stärker exprimiert wird als in der Kontrolle (Steen *et al.*, 2003). Mit den nun zur Verfügung stehenden molekularen Werkzeugen (monoklonaler Antikörper, Deletionsmutante) sollte versucht werden zu klären, ob das NrpA-Protein auch während der Virulenz von *A. fumigatus* eine wichtige Rolle spielt.

1.5.1 ABPA-Patienten bilden keine Antikörper gegen das NrpA-Protein

Patienten mit allergischer bronchoalveolarer Aspergillose (ABPA) bilden bekannterweise spezifische IgE-Antikörper gegen einige Hyphenproteine aus *A. fumigatus* (Hemmann *et al.*, 1999). Diese Antigene sind daher für die Diagnostik der ABPA sehr nützlich. Da bei ABPA-Patienten eine lokale Kolonisierung des Lungeninneraums auftritt und das NrpA-Protein in Pilzhyphen in sehr großen Mengen vorkommt, wäre es durchaus vorstellbar, dass das Immunsystem von ABPA-Patienten mit diesem Protein in Kontakt kommt und in der Folge auch Antikörper dagegen bildet. Um dies zu testen, wurde rekombinantes, aufgereinigtes NrpA-Protein auf einem Gel mit nur einer großen Tasche aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau gefärbt und die nun sichtbare Proteinbande wurde mit Bleistift markiert. Da nur sehr geringe Mengen Patientenserum zur Verfügung standen, wurde der Bereich, auf dem sich die Proteinbande befand, aus der Membran ausgeschnitten und in acht kleine Teile zerteilt. Jeder Teil konnte dadurch mit einem sehr kleinen Volumen der unverdünnten Patientenseren inkubiert werden. Die Patientenseren wurden dabei als Primär-Antikörper eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde für die Patientenseren ein α -Human-IgE-Antikörper eingesetzt. Die positive Kontrolle, bei der ein α NrpA-Antikörper als primärer Antikörper eingesetzt wurde, musste dagegen mit einem sekundären α -Maus-Antikörper behandelt werden. Als negative Kontrolle diente ein Ansatz, der nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde. Kein Patientenserum enthielt Antikörper, die das gereinigte NrpA-Protein erkennen konnten. Der spezifische α NrpA-Antikörper dagegen erkannte das gereinigte Protein auf der Membran.

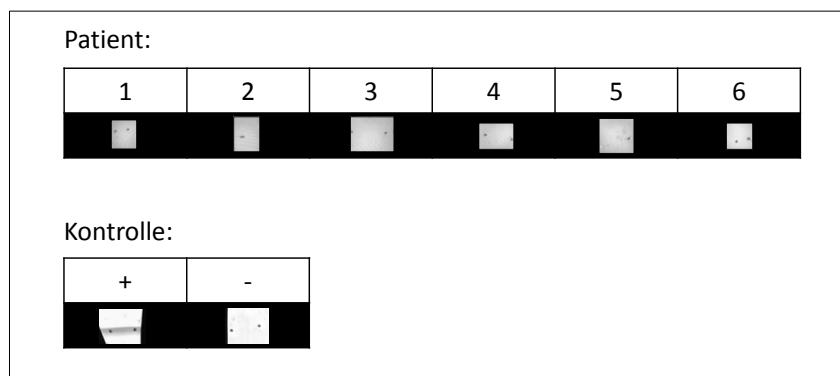


Abb. 47: ABPA-Patienten bilden keine Antikörper gegen das NrpA-Protein

Im oben gezeigten Western-Blot wurden Seren von sechs verschiedenen ABPA-Patienten (1-6) auf das Vorhandensein von spezifischen α NrpA-IgE-Antikörpern untersucht. Die Position der NrpA-Bande ist durch Punkte markiert. Ein spezifischer α NrpA-Antikörper (K93 E6) erkannte das NrpA-Protein auf der Membran (Kontrolle+). Nur der sekundäre Antikörper (α Maus) zeigte dagegen keine Reaktion (Kontrolle-).

1.5.2 Die Deletion von *nrpA* verursacht keine veränderte IL-10 und TNF α -Ausschüttung von murinen Makrophagen

Makrophagen stellen im menschlichen Körper eine erste Verteidigung gegen in die Lunge eingedrungene *A. fumigatus*-Sporen dar. In einem Assay sollte deshalb getestet werden, ob Makrophagen auf die *A. fumigatus* Δ *akuB* Δ *nrpA*-Mutante in einer veränderten Weise reagieren. Zunächst wurden primäre, murine Knochenmarksmakrophagen mit rechnerisch je zehn *A. fumigatus* Sporen infiziert. Nach einer Inkubation von 18 h wurden die Überstände abgenommen und im ELISA auf die Anwesenheit des Interleukins 10 (IL-10) und des Tumornekrosefaktors α (TNF α) untersucht. Diese beiden Zytokine des Immunsystems haben antagonistische Rollen, IL-10 wirkt anti-inflammatorisch und TNF α pro-inflammatorisch. Als Kontrollen dienten unstimulierte als auch durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulierte Makrophagen. Wie in Abb. 47 zu sehen ist, führte eine Infektion mit Sporen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu keiner veränderten IL-10 und TNF α -Ausschüttung der Makrophagen.

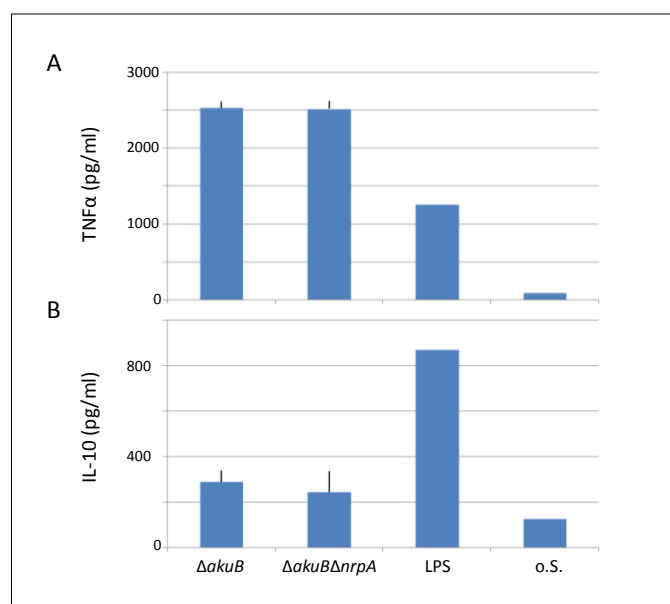


Abb. 48: Die Deletion von *nrpA* führt zu keiner veränderten IL-10 oder TNF α -Ausschüttung von murinen Makrophagen

Murine Makrophagen wurden mit Sporen von *A. fumigatus* \DeltaakuB oder $\DeltaakuB\Delta nrpA$ infiziert. Nach einer Inkubation von 18 h wurde im ELISA untersucht, wieviel TNF (A) und IL-10 (B) die Zellkulturüberstände enthielten. Als Kontrollen dienten zum einen unstimulierte (o.S.) und zum anderen mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierte Makrophagen. Das Experiment wurde in dreifacher Ausföhrung durchgeföhrt, die Standardabweichungen sind angegeben

1.5.3 Infektionsversuche mit der *A. fumigatus* $\DeltaakuB\Delta nrpA$ -Mutante und dem zugehörigen Wildtyp in embryonierten Hühnereiern

Um einen Effekt des NrpA-Proteins während der Virulenz des Pilzes zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit der Mutante und dem Wildtyp in embryonierten Hühnereiern durchgeföhrt. Dabei wurden die Eier zum einen mit 100 und zum anderen mit 1000 Sporen infiziert. Dieses Modell wurde am Hans-Knöll-Institut in Jena etabliert, um attenuierte Mutanten zu identifizieren, mit denen dann anschließend Infektionen im Mausmodell durchgeföhrt werden (Jacobsen *et al.*, 2010). Die hier gezeigten Versuche wurden von Ilse Jacobsen am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeföhrt. Auch in diesem Infektionsmodell war zwischen Mutante und Wildtyp kein Unterschied zu erkennen. Neun Tage nach der Infektion waren in beiden Fällen nur noch 20% der verwendeten Hühnereier am Leben. Bei den Kontrolleiern, denen entweder PBS zugesetzt wurde oder die die Prozedur ohne Injektion durchliefen, betrug die Überlebensrate nach neun Tagen etwa 90%.

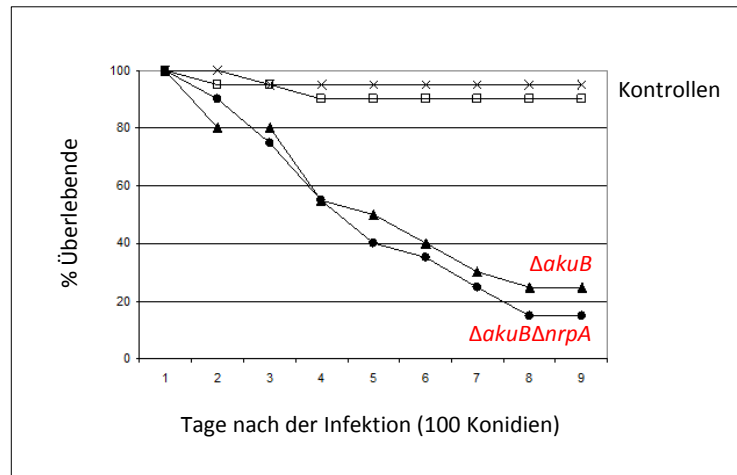


Abb. 49: Infektionsversuch in embryonierten Hühnereiern

Sowohl Sporen der *A. fumigatus* $\DeltaakuB\Delta nrpA$ Mutante (●) als auch des zugehörigen Wildtyps (\DeltaakuB) (▲) wurden für Infektionsversuche in embryonierten Hühnereiern verwendet. Als Kontrollen dienten Eier, denen nur PBS (□) injiziert wurde, sowie Eier, die die Prozedur ohne Injektion (X) durchliefen. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Infektion mit 100 Konidien pro Ei. (Ilse Jacobsen, HKI Jena)

2. Identifizierung der mitochondrialen MnSOD von *A. fumigatus*

Neben NrpA waren im Vergleich der Proteinmuster der verschiedenen *A. fumigatus*-Morphotypen auch weitere differentiell exprimierte Proteine aufgefallen. Eines dieser Proteine war eine Mangan-abhängige Superoxiddismutase, die auch als Asp6 bezeichnet wird.

Wie bereits in der Einleitung (A 7.2) erwähnt wurde, ist nur eine der zwei MnSODs von *A. fumigatus*, nämlich das Hyphen-spezifische Allergen Asp6, genauer charakterisiert worden (Cramer und Blaser, 1995). Bisher wurde auch im Allgemeinen davon ausgegangen, dass es sich dabei um die mitochondriale MnSOD handelt (Rementeria *et al.*, 2005). Eine Sequenzanalyse beider MnSODs mit einem Programm, das mitochondriale Signalsequenzen vorhersagt (MITOPROT II-v1.101), ergab allerdings folgendes Bild: Asp6 scheint keine Mitochondrien-Signalsequenz zu enthalten. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist, beträgt nur 0,0914. Die zweite MnSOD dagegen enthält wohl eine N-Terminale Signalsequenz, die 33 Aminosäuren lang ist. Diese wird wohl an der 34. Aminosäure abgeschnitten. Die Lokalisationswahrscheinlichkeit dieses Proteins in den Mitochondrien wird mit 0,9993 angegeben. Um die Rolle der verschiedenen MnSODs genauer zu verstehen, sollten nun spezifische Antikörper gegen die MnSOD (mMnSOD) mit putativem Sortierungssignal hergestellt werden. Gegen Asp6 waren bereits zu einem früheren Zeitpunkt monoklonale Antikörper generiert worden (Schwienbacher, 2005).

2.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die putative mitochondriale MnSOD

2.1.1 Amplifizierung des *mMnSod*-Gens sowie Überexpression und Reinigung des abgeleiteten Proteins

Zunächst wurden aus der Genomsequenz von *A. fumigatus* 293 Starteroligonukleotide abgeleitet (241, 242), mit welchen das 690 Bp große Zielgen aus cDNS von *A. fumigatus* ATCC 46645 amplifiziert wurde. Dadurch konnte zusätzlich der Nachweis erbracht werden, dass dieses putative Gen tatsächlich als Leserahmen dient. Das gereinigte DNS-Fragment wurde ungerichtet in den Expressionsvektor pQE30-UA kloniert. Klone mit korrekter Orientierung des Gens im Vektor wurden mittels PCR identifiziert und anschließend durch Sequenzierung bestätigt. Das auf dem Plasmidkonstrukt kodierte Protein wurde in *E. coli* M15 pRep durch Zugabe von 1mM IPTG heterolog überexprimiert. Die dabei generierten Proteine erhalten einen N-terminalen Hexa-His-Tag, der durch die Vektorsequenz bedingt ist. Dadurch sind sie um 2,1 kDa größer als die nativen

Proteine. Das in *E. coli* M15 *pRep* gebildete MnSOD Protein mit Hexa-His-Tag entsprach mit ca. 27,3 kDa der rechnerisch vorausgesagten Größe. Das Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels Affinitätschromatographie an einer Co²⁺-Talon-Matrix aufgereinigt, da die heterolog produzierte MnSOD unlöslich war. Zum größten Teil konnte es bei der ersten Elution mit 166,6 mM Imidazol im Elutionspuffer von der Matrix gelöst werden. Vor der Immunisierung von zwei Mäusen mit dem gereinigten Protein wurde das Eluat dialysiert, um die denaturierenden Reagenzien im Elutionspuffer zu entfernen.

2.1.2 Die hergestellten monoklonalen Antikörper gegen die putative mitochondriale MnSOD von *A. fumigatus* sind spezifisch

Die gereinigte MnSOD wurde nun zur Immunisierung von zwei Mäusen verwendet. Nach etwa vier Wochen erfolgte die Fusion der Lymphozyten der Mäuse mit den Myelomzellen P3-X63-Ag8.653. Aus dieser Fusion gingen 154 Hybridomzellklone hervor. Western-Blot-Analysen zeigten, dass 19 der getesteten 154 Kulturüberstände Antikörper gegen die gereinigte mMnSOD enthielten. Die besten zwölf dieser positiven Kulturüberstände wurden auf eine Kreuzreaktion mit der putativen cytosolischen MnSOD (Aspf6) getestet. Dies war nötig, da die beiden MnSOD-Proteine Homologien aufweisen und ein Antikörper, der sein Epitop in einem homologen Bereich hat, möglicherweise beide Proteine detektieren würde. Nur ein in diesem Versuch generierter Antikörper reagierte auch mit Aspf6. Weiterhin wurden in einem Western-Blot getestet, ob die sezernierten Antikörper auch das native mMnSOD-Protein in einem Gesamtproteinextrakt von *A. fumigatus* ATCC 46645 erkennen können. Dabei enthielten nur fünf Überstände Antikörper, die ein Protein passender Größe erkannten. Antikörper aus zwei Überständen erkannten ein wesentlich größeres Protein und fünf Überstände enthielten Antikörper, die mit keinem Protein aus *A. fumigatus* reagierten. Demnach produzierten fünf Hybridomzellklone Antikörper mit der gewünschten Spezifität. Diese wurden cryokonserviert. Zwei dieser positiven Hybridomzellklone wurden durch Subklonierung vereinzelt, um eine Zellpopulation zu erhalten, die mit Sicherheit nur auf einer Einzelzelle basiert. Dadurch ist sichergestellt, dass die ins Medium abgegebenen Antikörper nur eine Spezifität haben. Die Fähigkeit der Subklone zur Bildung spezifischer Antikörper wurde nochmals untersucht. Wieder wurden einige der positiven Subzellklone cryokonserviert. Ein Subklon, nämlich P118 A7, wurde im Weiteren als Standard-Antikörperproduzent verwendet. Bei dem von diesem Klon gebildeten Antikörper handelt es sich um die Immunglobulinsubklasse IgG1, was mithilfe eines ELISAs festgestellt wurde.

2.2 Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD

Zunächst sollte geklärt werden, ob die putative mitochondriale MnSOD von *A. fumigatus* tatsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist.

2.2.1 Analyse der Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD mithilfe von differentieller Zentrifugation

In einem ersten Versuch sollte eine differentielle Zentrifugation über die Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD Auskunft geben. Dafür wurde ein Hyphenproteinextrakt zunächst für 15 min bei 15000 g und 4° C zentrifugiert. Das Sediment sollte nun folgende Zellbestandteile enthalten: Zellkerne, Cytoskelett, Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen. Nachdem das Sediment und der Überstand getrennt worden waren und ein Aliquot des Überstands für die anschließende Western-Blot-Analyse abgenommen worden war, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 45 min bei 43500 g und 4° C. Die zweite Zentrifugation sollte zu einer vollständigen Sedimentation der oben genannten Zellbestandteile führen. Damit sollte der Überstand nur noch Plasmamembranteile, Fragmente des endoplasmatischen Retikulums, kleine Vesikel, Mikrosomen, Ribosomen, Zytoplasma und Makromoleküle enthalten. Die vier zur Verfügung stehenden Proben (die sedimentierten Proteine der Zentrifugationen bei 15000 g und 43500 g sowie die Proteine des Überstands dieser beiden Zentrifugationsschritte) wurden nun für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die mMnSOD schon beim ersten Zentrifugationsschritt von 15000 g teilweise im Sediment nachgewiesen wurde. Eine große Menge des Proteins blieb im Überstand. Dieser Protein-Anteil ließ sich auch durch den zweiten Zentrifugationsschritt bei 43500 g nicht sedimentieren.

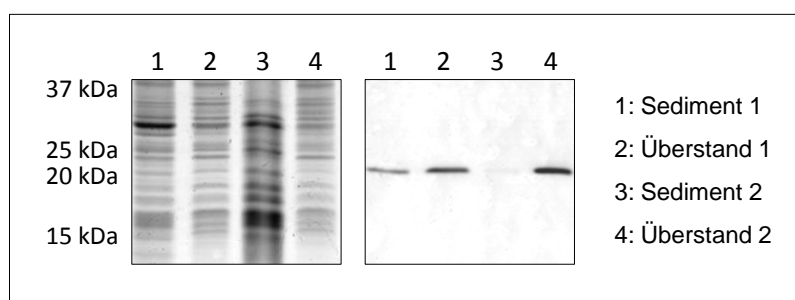


Abb. 50: Untersuchung zur Lokalisation der putativen mMnSOD durch differentielle Zentrifugation

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* wurde einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 15000 g bei 4° C, wurden Sediment (1) und Überstand (2) getrennt. Durch eine zweite Zentrifugation des Überstands für 45 min bei 43500 g und 4° C konnten wieder Sediment (3) und Überstand (4) getrennt werden. Die vier Proben wurden auf einem 15%igem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) oder für Western-Blot-Analysen (rechts) mit dem spezifischen Antikörper P118 A7 eingesetzt.

2.2.2 Analyse der Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD mithilfe einer GFP-Fusion der putativen Signalsequenz

Um die Lokalisation der mMnSOD in den Mitochondrien mit einer alternativen Methode darzustellen, wurde ein *A. fumigatus* Stamm hergestellt, der das putative Mitochondrien-sortierungssignal als GFP-Fusion bildet. Dafür wurde die Signalsequenz am N-Terminus der mMnSOD mit den beiden Starteroligonukleotiden (290a; 291a) aus chromosomaler DNS von *A. fumigatus* unter Verwendung einer Pfu-Polymerase amplifiziert. Die ausgewählten Starteroligonukleotide erlaubten eine Amplifizierung der ersten 37 AS (111 Bp) der mMnSOD. Weiterhin wurde durch den 3'-Primer ein *Spacer*, der aus einer Wiederholung der Aminosäure Glycin besteht, eingefügt. Der *Spacer* sollte die korrekte Faltung des GFP sowie die räumliche Trennung des GFP und des putativen Sortierungssignals erleichtern. Das DNS-Fragment mit glatten Enden wurde anschließend phosphoryliert und konnte dann in den mit MssII aufgeschnittenen Vektor pSK379 GFP in den Leserahmen vor das GFP gesetzt werden. Nach dieser ungerichteten Ligation des DNS-Fragments mußte die richtige Orientierung des Fragments im Vektor mithilfe einer PCR und einer Sequenzierung kontrolliert werden. Von vier positiven Klonen wurde die Plasmid-DNS isoliert. Für die anschließende Protoplasten-Transformation von *A. fumigatus* Afs 35 wurde die DNS von Klon 10 verwendet. Die Transformation lieferte zahlreiche Klone, die zum größten Teil auch unter Anregung mit einem Argon-Laser grünes Licht emittierten. Zwei dieser Klone (7, 13) wurden für die folgende mikroskopische Untersuchung in einem CLS-Mikroskop verwendet. Schon in den Hyphen zeigte sich eine eher netzartige Verteilung des GFP. Die mikroskopische Analyse von Sporen zeigte allerdings einen viel deutlicheren Unterschied zwischen Kontrolle und mMnSOD-Signalsequenz-GFP-Fusion. Im verwendeten Kontrollstamm Pro_{n_rp_a}-NrpA-GFP ist das Fusionsprotein gleichmäßig in den Sporen verteilt. Die Fusion der putativen mMnSOD-Signalsequenz mit GFP führt zu einer distinkten Lokalisation des GFP innerhalb der Sporen. Das Protein liegt in runden Strukturen vor, die sich innerhalb der Spore ringförmig formieren. Bei der putativen mMnSOD scheint es sich also tatsächlich um eine mitochondriale MnSOD zu handeln.

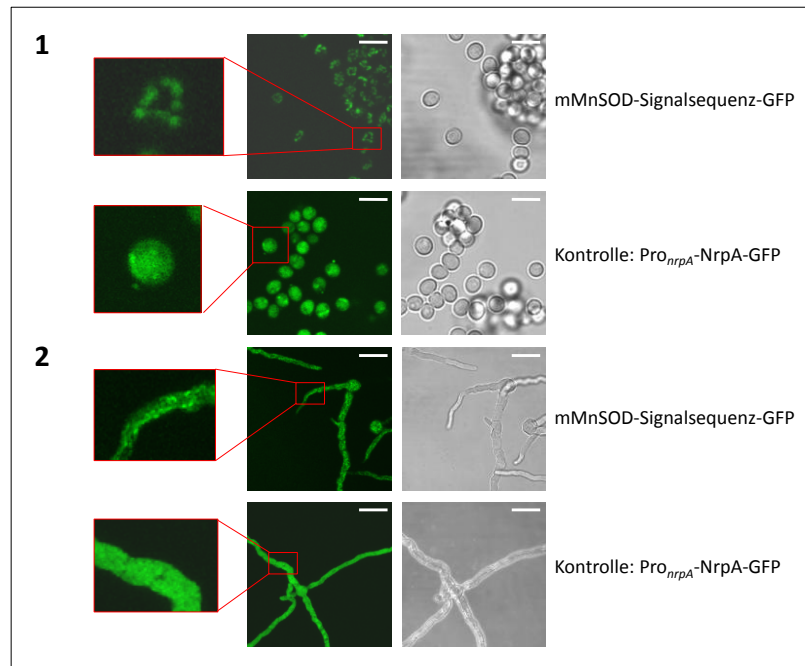


Abb. 51: Untersuchung der Lokalisation einer Fusion der putativen mMnSOD-Signalsequenz mit GFP

Mikroskopische Aufnahmen mittels CLS-Mikroskopie zeigen nach Anregung mit einem Argon-Laser die Lokalisation der putativen mMnSOD-Signalsequenz mit GFP im Vergleich zu einem cytosolischem, mit GFP fusionierten Protein sowohl in den Sporen (1) als auch in den Hyphen (2). Es ist jeweils eine Überlagerung mehrerer Z-Ebenen dargestellt. Vergrößerte Bereiche sind rot umrandet. Der dargestellte Größenbalken entspricht unter (1) 5 μm und unter (2) 20 μm .

2.3 Immunblots von *A. fumigatus*-Proteinextrakten mit Antikörpern gegen die mitochondriale MnSOD und Asp6

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus*, der aus Myzel hergestellt wurde, das für 22 h in YG Medium gewachsen war, das zuvor mit 3×10^5 Sporen/ml angeimpft worden war, wurde für eine Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α Asp6-Antikörper B12 eingesetzt. Wie erwartet, erkannte der Antikörper auf der Membran ein Protein mit etwa 23,4 kDa. Nun wurde dieselbe Membran nochmals mit dem spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 behandelt. Dieser erkannte auf der Membran ein Protein, das etwas kleiner als Asp6 ist. Die vorausgesagte Größe des Proteins liegt dagegen bei 25,2 kDa. Der Versuch zeigt deutlich, dass zwei unterschiedliche Proteine von den Antikörpern spezifisch erkannt werden.

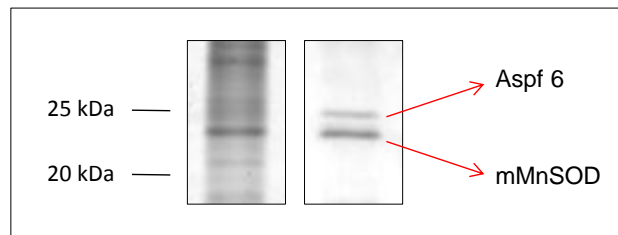


Abb. 52: Immunologische Untersuchung eines Proteinextrakts von *A. fumigatus* mit den beiden Antikörper α Aspf6 B12 und α -mMnSOD P118 A7

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* wurde in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) sowie einer Western-Blot-Analyse (rechts) unterzogen. Dabei wurde die Membran zuerst mit dem spezifischen Antikörper α Aspf6 B12 inkubiert und im Anschluß mit dem spezifischen Antikörper α -mMnSOD P118 A7 behandelt. Die beiden von den Antikörpern erkannten Proteine sind mit roten Pfeilen markiert.

2.4 Expressionsprofil der mitochondrialen MnSOD im Vergleich zu Aspf6

Zunächst stellte sich die Frage, ob sich die Expression der beiden MnSODs in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. fumigatus* von einander unterscheidet. Dafür wurden in einer Western-Blot-Analyse Sporenproteinextrakte und Hyphenproteinextrakte miteinander verglichen. Die mitochondriale MnSOD ließ sich dabei sowohl in der Sporenfraktion als auch im Hyphenextrakt nachweisen. Aspf6 dagegen konnte wie erwartet nur in den Proteinextrakten der Hyphen nachgewiesen werden.

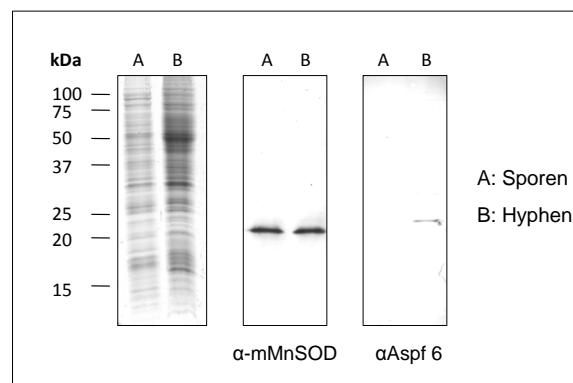


Abb. 53: Expressionsprofil von Aspf6 und mMnSOD in Proteinextrakten aus Sporen und Hyphen von *A. fumigatus*

Proteinextrakte aus Sporen (A) und Hyphen (B) wurden entweder in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt (links) oder für Western-Blot-Analysen verwendet. Dabei wurde zum einen der spezifische Antikörper α -mMnSOD P118 A7 (mitte) und der spezifische Antikörper α Aspf6 BM1 A12 (rechts) eingesetzt.

2.5 Die mitochondriale MnSOD liegt möglicherweise als Dimer vor

Weiterhin sollte geklärt werden, ob die mitochondriale MnSOD mit sich selbst oder mit anderen Proteinen interagiert. Dafür wurde ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Der Säulendurchlauf wurde in 30 Fraktionen gesammelt und mittels einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen α -mMnSOD Antikörpers P118 A7 analysiert. Dabei wurde die mMnSOD nur in den Fraktionen 12, 13 und 14 nachgewiesen. Ein Eichprotein, nämlich BSA (*Bovines serum albumin*), mit einer Größe von 66 kDa eluierte etwa in den Fraktionen 12–15. Der Versuch zeigt, dass die mMnSOD entweder mit einem oder mehreren anderen Proteinen interagiert oder als Trimer vorliegt.

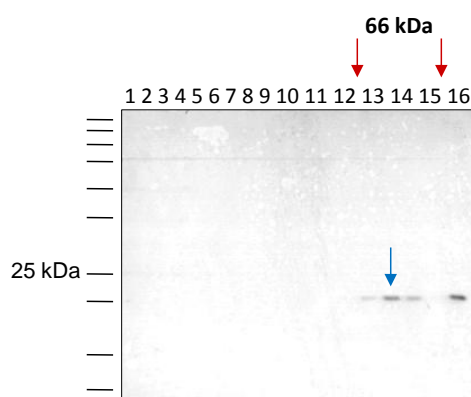


Abb. 54: Gelfiltrationsanalyse eines Proteinextrakts von *A. fumigatus* unter Verwendung eines spezifischen α -mMnSOD-Antikörpers

Dieser Western-Blot zeigt die gesammelten Fraktionen 1-15 einer Gelfiltration eines Hyphenproteinextrakts von *A. fumigatus* ATCC 46645. Der Nachweis der mMnSOD erfolgte mit Hilfe des Antikörpers P118 A7 (blauer Pfeil). Das Eichprotein BSA mit einer Größe von 66 kDa eluierte in den mit roten Pfeilen markierten Fraktionen. Ein Kontrollextrakt wurde an Position 16 aufgetragen.

Zur genaueren Untersuchung wurden zusätzlich Crosslinking-Experimente durchgeführt. Dafür wurde ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* mit insgesamt vier verschiedenen *Crosslinkern*, nämlich EGS, Sulfo-EGS, DSP und BS³, in einer Endkonzentration von 2 mM versetzt. Als negative Kontrollen dienten die Lösungsmittel der *Crosslinker*, für BS³ handelte es sich hierbei um PBS, für alle anderen um DMSO. Die Proteinextrakte wurden dann zum einen im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt und zum anderen einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen α -mMnSOD-Antikörpers P118 A7 unterzogen. Neben dem Monomer bei ca. 24 kDa erkannte der Antikörper in allen Ansätzen auf der Membran eine zusätzliche Doppelbande, die knapp unterhalb des 50-kDa-Markerproteins lag und in den Kontrollansätzen nicht zu sehen war. Diese Daten sprechen also für das mögliche Vorkommen eines Dimers. In der folgenden Abbildung werden beispielhaft nur die mit EGS behandelten Proteinextrakte gezeigt. Für den

hier durchgeführten Versuch wurden die unter Punkt 2.5 beschriebenen Proteinextrakte verwendet.

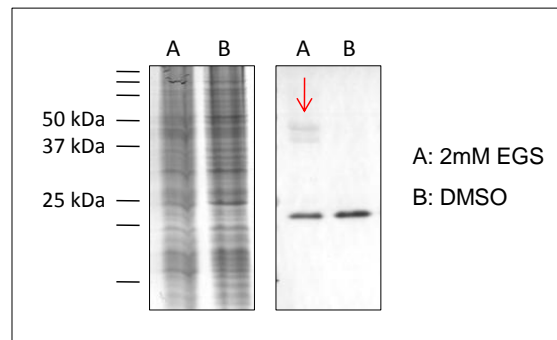


Abb. 55: Crosslinking-Experimente mit einem *A. fumigatus*-Proteinextrakt und anschließender immunologischer Nachweis der mMnSOD

Ein Proteinextrakt von *A. fumigatus* wurde entweder mit dem Crosslinker EGS (2 mM) versetzt (A) oder als Lösungsmittelkontrolle mit den gleichen Mengen DMSO behandelt (B). Die Extrakte wurden einerseits in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und andererseits einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 unterzogen. Eine etwa 50 kDa große Doppelbande, die nur in Anwesenheit von EGS auftaucht, ist durch einen roten Pfeil markiert.

2.6 Expression der putativen mitochondrialen MnSOD im Zeitverlauf

Um zu testen, ob die mitochondriale MnSOD im Wachstumsverlauf einer *A. fumigatus*-Kultur unterschiedlich stark gebildet wird, wurden die unter Punkt 2.8 erwähnten Proteinextrakte einer Zeitreihe durch eine Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein der mMnSOD untersucht. Der spezifische α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 erkannte in jeder der getesteten Proben ein Protein passender Größe. Die Signalstärke veränderte sich dabei bei den Proben der Wachstumszeiten von 16, 20, 24 und 28 h nicht. In den Proteinextrakten der beiden späten Zeitpunkte, nämlich 48 und 60 h, schien sich die Intensität des Signals etwas zusteigern, obwohl die aufgetragene Proteinmenge dieser beiden Proben deutlich niedriger war als die der restlichen Proben, wie mit Coomassie gefärbte SDS-Gele zeigten.

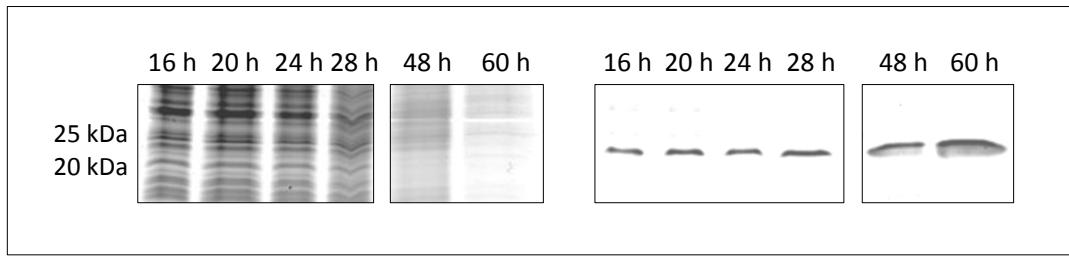


Abb. 56: Expression der mMnSOD in *A. fumigatus* in Abhängigkeit der Wachstumszeit

Nach einem Wachstum von 16 h, 20 h, 24 h, 40 h und 60 h wurde das Myzel geerntet und zu Proteinextrakten verarbeitet. Diese wurden einerseits in einem 15%igen SDS-Gele aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und andererseits für Western-Blot-Analysen (rechts) unter Verwendung des spezifischen α -mMnSOD-Antikörpers P118 A7 eingesetzt.

2.7 Expression der putativen mitochondrialen MnSOD in Abhängigkeit der Animpfdichte

Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Expression der mitochondrialen MnSOD von der verwendeten Animpfmenge der Sporen abhängt. Dafür wurden alle Kulturen zum gleichen Zeitpunkt (nach 16 h) geerntet, aber jede Kultur mit einer anderen Sporenkonzentration beimpft. Dabei entsprachen die verwendeten Sporenkonzentrationen einem Zehntel, einem Fünftel, der Ein-, der Vier- und der Zehnfachen Sporenmenge, die im vorherigen Versuch verwendet worden war. Für den Versuch wurden die unter Punkt 2.8 beschriebenen Proteinextrakte mit der Standard-N-Quelle Ammonium einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 unterzogen. Abb. 57 zeigt, dass die mMnSOD in allen getesteten Proteinextrakten in vergleichbaren Mengen durch den Antikörper nachgewiesen wurde. Die Expression der mMnSOD hängt somit nicht von der Kulturdichte ab.

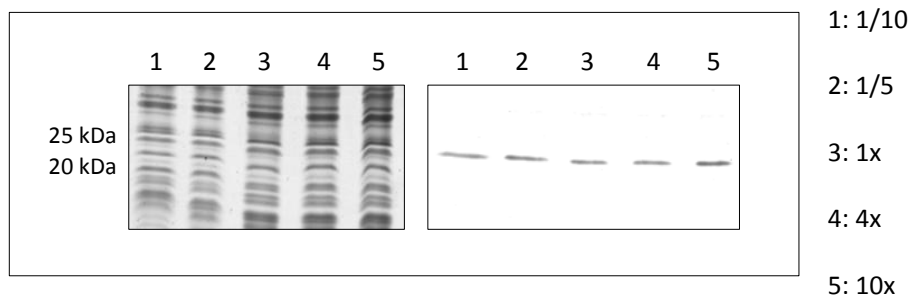


Abb. 57: Die Expression der mMnSOD in Abhängigkeit der zum Animpfen verwendeten Sporenmenge

Je 20 ml AMM, das 20 mM Ammonium als N-Quelle enthielt, wurde mit unterschiedlichen Mengen *A. fumigatus* ATCC 46645-Sporen beimpft. Dabei wurde ein Zehntel (1), ein Fünftel (2), die einfache (3), die vierfache (4) und die zehnfache (5) Sporenmenge des vorherigen Versuchs verwendet. Die Kulturen wurden nach 16 h geerntet und das entstandene Myzel zu Proteinextrakten verarbeitet. Die Extrakte wurden einerseits in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) und andererseits einer Western-Blot-Analyse mit dem spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 unterzogen.

2.8 Bildung der mitochondrialen MnSOD und Aspf6 in Anwesenheit von oxidativem Stress

Als Enzyme, die Superoxidanionen entgiften, stellen MnSODs wichtige Schutzmechanismen der Zellen gegenüber oxidativem Stress dar. Mit diesen Versuchen sollte gezeigt werden, ob die Bildung einer oder beider von uns untersuchten MnSODs aus *A. fumigatus* in Folge von oxidativem Stress verändert wird.

2.8.1 Bildung der putativen mitochondrialen MnSOD und Aspf6 in Anwesenheit von Menadion

Für diesen Versuch wurden die unter Punkt 2.10.2 beschriebenen Proteinextrakte verwendet. Bereits vorinkubiertes Myzel wurde für 1,5 h mit verschiedenen Konzentrationen (2,5 mM, 10 mM und 40 mM) des *Redox-cycling-agent* Menadion, das zur Bildung von Superoxidanionen führt, versetzt. Der Kontrollkultur wurde dagegen nur Wasser zugesetzt. Die Proteinextrakte wurden einerseits in SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt und andererseits für Western-Blot-Analysen mit dem spezifischen α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 oder dem spezifischen α Aspf6-Antikörper B12 eingesetzt. Die putative cytosolische MnSOD (Aspf6) war bei jeder getesteten Kondition gleich deutlich nachweisbar (Abb. 58 A). Die mitochondriale MnSOD zeigte in diesem Versuchsansatz in Anwesenheit der höchsten Menadion-Konzentration einen geringen Anstieg der Expression (Abb. 58 B). Auf einer Membran, die mit beiden Antikörpern behandelt wurde, ist deutlich zu sehen, dass von den Antikörpern zwei unterschiedliche Proteine erkannt werden.

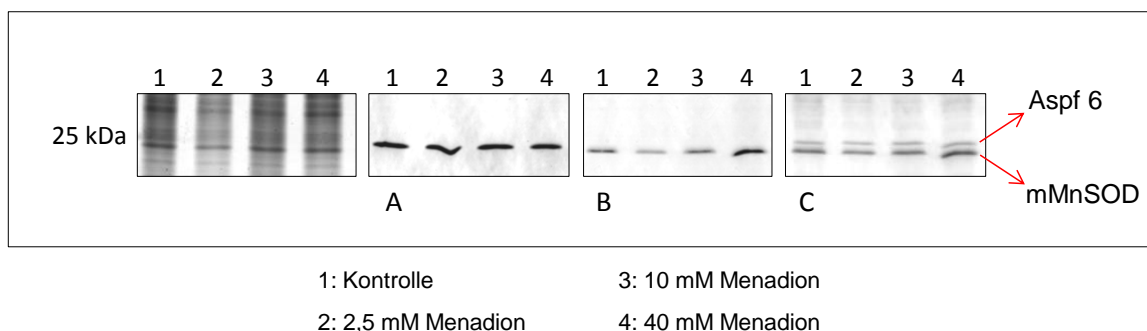


Abb. 58: Bildung von Aspf 6 und mMnSOD in Antwort auf verschiedene Menadion-Konzentrationen

Frisches Myzel von *A. fumigatus* wurde mit 0 (1), 2,5 mM (2), 10 mM (3) oder 40 mM (4) Menadion für 1,5 h versetzt. Die aus dem Myzel hergestellten Proteinextrakte wurden entweder in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt (ganz links) oder für Western-Blot-Analysen eingesetzt. Dabei wurde zum einen der spezifischen α Aspf6-Antikörper B12 (A) verwendet und zum anderen der spezifische α -mMnSOD-Antikörper P118 A7 (B) eingesetzt. Desweiteren wurde die unter B verwendete Membran zusätzlich noch mit dem spezifischen α Aspf6-Antikörper B12 inkubiert (C). Die Lokalisation von Aspf6 und der mMnSOD auf der Membran ist mit roten Pfeilen markiert.

2.8.2 Bildung der mitochondrialen MnSOD und Aspf6 in Anwesenheit von H₂O₂

MnSODs entgiften Superoxidanionen und produzieren dabei H₂O₂ und O₂. Mit dem folgenden Versuch sollte getestet werden, ob hohe Mengen an H₂O₂ die Expression bzw. die Stabilität der mitochondrialen MnSOD und von Aspf6 beeinflussen. Dafür wurden bereits vorhandene Proteinextrakte genutzt, deren Herstellung unter Punkt 2.10.2 näher beschrieben ist. Vorinkubiertes Myzel wurde für 1,5 h mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen (0 mM, 30 mM, 125 mM, 500 mM) versetzt. Der Kontrollkultur wurden nur entsprechende Mengen Wasser zugegeben. Nach der Ernte wurde das Myzel zu Proteinextrakten verarbeitet und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Hierbei fiel auf, dass es in Anwesenheit der beiden höchsten H₂O₂-Konzentrationen zu einer deutlichen Abnahme des Gesamtproteingehalts der Extrakte kam. Western-Blot-Analysen der Proteinextrakte mit dem spezifischen α-mMnSOD-Antikörper P118 A7 und dem spezifischen αAspf6-Antikörper B12 zeigten folgendes: Die detektierte Menge an Aspf6 veränderte sich in Abhängigkeit der verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen nur leicht. Die mittlere und die höchste H₂O₂-Konzentration führte je zu einer leichten Verminderung des Signals. Die mitochondriale MnSOD war dagegen nur in Anwesenheit der geringsten H₂O₂-Konzentration deutlich nachweisbar. Dabei war die Intensität des Signals im Vergleich zur Kontrolle schon hier stark verringert. In Anwesenheit der mittleren H₂O₂-Konzentration konnte die mMnSOD kaum mehr nachgewiesen werden und in Anwesenheit der höchsten Konzentration gar nicht mehr.

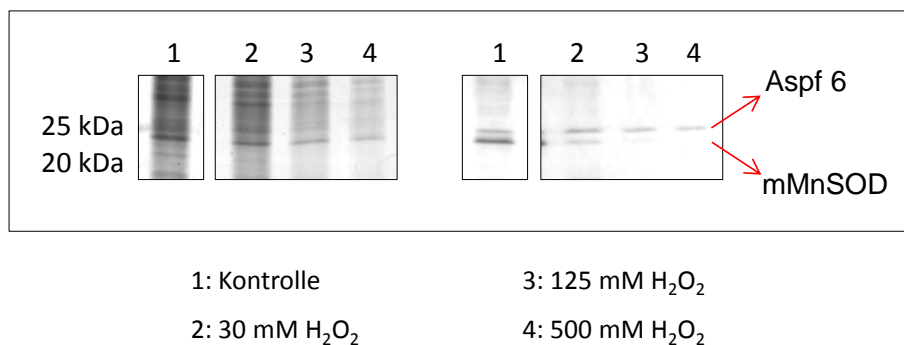


Abb. 59: Bildung von Aspf6 und mMnSOD in Antwort auf verschiedene H₂O₂-Konzentrationen

A. fumigatus wurde für 1,5 h mit 0 (1), 30 mM (2), 125 mM (3) oder 500 mM (4) H₂O₂ versetzt. Die hergestellten Proteinextrakte wurden entweder in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt oder für Western-Blot-Analysen eingesetzt. Dabei wurde zunächst der spezifische α-mMnSOD-Antikörper P118 A7 verwendet. Nach der Entwicklung wurde die Membran nochmals mit einem weiteren Antikörper, nämlich αAspf6 B12, inkubiert. Die Lokalisation der beiden Proteine auf der Membran ist mit roten Pfeilen markiert.

3. Untersuchungen zum anaeroben Wachstum von *A. fumigatus*

Paralell zu den beiden anderen Aspekten dieser Arbeit wurde ein dritter Themenkomplex bearbeitet. Dieser Teil beschäftigt sich mit der Frage, ob *A. fumigatus* in der Lage ist, in sauerstoffarmen oder freien Umgebungen zu wachsen. Zudem sollte die Rolle der Atmung während der Auskeimung geklärt werden. Für andere filamentöse Pilze wurde bereits beschrieben, dass sie in anaeroben Umgebungen Ammonium fermentieren können (Takasaki *et al.*, 2004). Gerade für einen pathogenen Organismus wie *A. fumigatus* wäre eine Anpassung an sauerstofflimitierende Bedingungen von großem Vorteil und könnte dem Organismus neue Nischen im Wirt eröffnen. Bisher ist dieser Aspekt in *A. fumigatus* nicht untersucht worden.

3.1 Rolle der Atmung während der Auskeimung

3.1.1 Rolle der Proteinbiosynthese während der Auskeimung von *A. fumigatus*

Zunächst sollte die Rolle der Proteinbiosynthese während der frühen Phase der Auskeimung geklärt werden. In *A. nidulans* war bereits gezeigt worden, dass hohe Konzentrationen (2 mg/ml) eines Inhibitors der Proteinbiosynthese (Cycloheximid) die Auskeimung und selbst das Anschwellen der Sporen verhindern. In diesem Versuch wurden folgende drei Entwicklungszustände des Pilzes unterschieden: Ruhende Sporen, angeschwollene Sporen und auskeimende Sporen (genauer siehe Material und Methoden). Sporen (1×10^7 /ml) von *A. fumigatus* wurden in 20 ml YG_r-Medium in Anwesenheit von 50 µg/ml, 100 µg/ml oder 2 mg/ml Cycloheximid für 9 h bei 37° C inkubiert. Nach dieser Zeitspanne waren in der unbehandelten Kontrolle kaum mehr ruhende Sporen zu finden. Über 80% waren bereits ausgekeimt und die restlichen Sporen angeschwollen. Die höchste Konzentration des Inhibitors war tatsächlich in der Lage, die Auskeimung der Sporen vollständig zu blockieren. Lediglich ein geringer Prozentsatz der Sporen war noch in der Lage anzuschwellen. Die beiden niedrigeren Cycloheximid-Konzentrationen konnten nur die Bildung von Keimschläuchen verhindern, nicht aber das Anschwellen der Sporen. Wurden die mit Cycloheximid behandelten Sporen gewaschen und in frisches Medium überführt, konnten sie auskeimen und normal weiterwachsen. Das bedeutet, dass die verwendeten Konzentrationen des Inhibitors nicht toxisch waren.

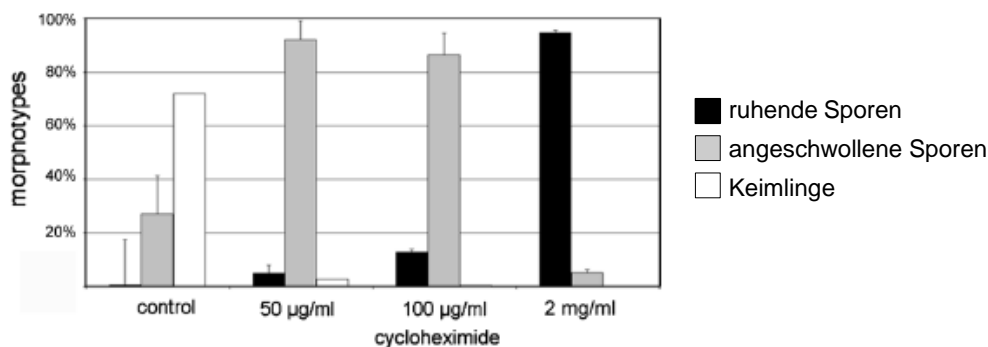


Abb. 60: Einfluss von Cycloheximid auf die Auskeimung von *A. fumigatus*

Die Sporen wurden für 9 h in YG_r-Medium bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mikroskopisch die relative Häufigkeit der folgenden Morphotypen bestimmt: Ruhende Sporen (dunkle Balken), angeschwollene Sporen (graue Balken) und Keimlinge (schwarze Balken). Der Inhibitor wurde in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet. Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, die Standardabweichungen sind angegeben (modifiziert nach Taubitz *et al.*, 2007).

3.1.2 Aktivierung der Mitochondrien während der Auskeimung

In einem nächsten Schritt folgte die Untersuchung von auskeimenden Sporen auf das Vorhandensein von aktiven Mitochondrien. Dafür wurde ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der nur in aktiven Mitochondrien zurückgehalten und aktiviert wird, nämlich *Mitotracker red CM H2X-ROS*. Tatsächlich konnten auf diese Weise aktive Mitochondrien sowohl in angeschwollenen Sporen als auch in Keimlingen mikroskopisch dargestellt werden. Um die respiratorische Aktivität während der Auskeimung direkt nachzuweisen, wurde die Sauerstoffkonzentration von auskeimenden Pilzkulturen in dicht verschlossenen Erlenmayerkolben gemessen. Wie in Abb. 60 zu sehen ist, nimmt der Sauerstoffgehalt der Kulturen nach einer Inkubationszeit von etwa 200 min signifikant ab. Zu diesem Zeitpunkt sind angeschwollene Konidien der dominierende Morphotyp. Nach einer Inkubation von etwa 7 h ist der Sauerstoffgehalt innerhalb der Erlenmayerkolben kaum mehr detektierbar. Die Ergebnisse beider Versuche deuten auf eine frühe Aktivierung der Atmungskette während der Auskeimung hin.

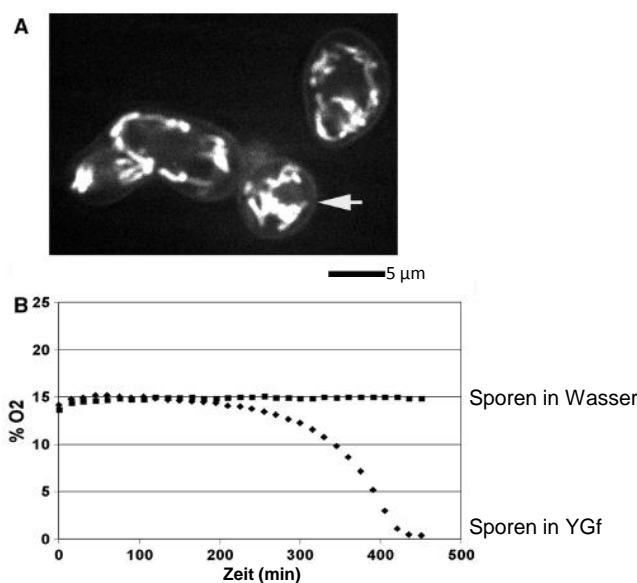


Abb. 61: Atmung von *A. fumigatus* während der frühen Auskeimungsphase

A: Sporen wurden in YG_f bei 37° C inkubiert und aktive Mitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Mitotracker red CM H2X-ROS“ angefärbt. Der Balken entspricht einer Größe von 5 µm. Der Pfeil markiert ein angeschwollenes Konidium. B: Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in 30 ml Kulturen, die 10⁸ Sporen enthielten. Die Quadrate stehen dabei für in Wasser inkubierte Sporen, die Rauten für in YG_f kultivierte Sporen (modifiziert nach Taubitz *et al.*, 2007).

3.1.3 Auskeimung und Hyphenwachstum im anaeroben Milieu

Um zu analysieren, ob Sauerstoff für die Auskeimung der Sporen und das Wachstum von Hyphen nötig ist, wurden Sporen von *A. fumigatus* mittig auf Sabouraud- und Schaedler-Agarplatten getupft und bei 37° C für zwei Tage sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Im Aeroben hatte sich unter diesen Bedingungen ein Myzel gebildet, während unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum stattgefunden hatte. Das bedeutet, dass die Auskeimung im Anaeroben verhindert wird. Nun sollte getestet werden, ob das Hyphenwachstum von einer anaeroben Umgebung weniger beeinflusst wird. Dafür wurden Platten für zwei Tage bei 37° C im Aeroben inkubiert. Anschließend wurden die Ränder der gewachsenen Kolonien markiert, um weiteres Wachstum sichtbar machen zu können und die Platten wurden entweder im Aeroben oder im Anaeroben für weitere zwei Tage inkubiert. Unter anaeroben Bedingungen wurde ein weiteres Wachstum komplett verhindert, unter aeroben Bedingungen dagegen hatte sich der Durchmesser des Pilzmyzels deutlich vergrößert. Das Wachstum von *A. fumigatus* scheint also unter diesen Bedingungen vollständig von der Anwesenheit von Sauerstoff abzuhängen.

Um den Einfluß von Anoxia auf den Auskeimungsprozess genauer zu beobachten wurde YG_r-Medium mit ruhenden Sporen angeimpft und für 70 h bei 37° C im Anaeroben oder im Aeroben inkubiert. Die entstandenen Morphotypen wurden dann mikroskopisch untersucht. Im Aeroben war der Pilz innerhalb dieser Zeitspanne in der Lage, Hyphen und Conidophoren zu bilden. Nach der Inkubation im Anaeroben waren die Sporen optisch nicht von den ruhenden Sporen des Kontrollpräparats zu unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass die Abwesenheit von Sauerstoff unter diesen Versuchsbedingungen selbst das Anschwellen der Sporen verhindert.

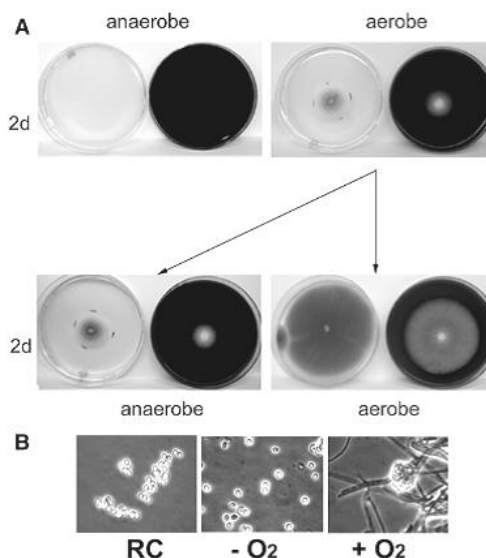


Abb. 62: Inkubation unter anaeroben Bedingungen

A: Sporen wurden punktförmig auf Sabouraud-Platten (hell) und Schaedler-Platten (dunkel) aufgebracht und sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen für zwei Tage inkubiert (obere Reihe). Aerob inkubierte Platten wurden für weitere zwei Tage im Aeroben oder im Anaeroben weiterinkubiert (untere Reihe). B: Sporen wurden in YG_r-Medium für 70 h entweder in Anwesenheit (+ O₂) oder in Abwesenheit (- O₂) von Sauerstoff inkubiert, unter dem Mikroskop fotografiert und mit ruhenden Sporen (RC) verglichen (modifiziert nach Taubitz *et al.*, 2007).

3.1.4 Auskeimung und Wachstum im anaeroben Milieu in Anwesenheit von Nitrat und Ethanol.

Wie bereits erwähnt, ist *A. nidulans* in der Lage in einer anaeroben Umgebung in Anwesenheit von Nitrat und Ethanol zu wachsen (Takasaki *et al.*, 2004). Um zu testen, ob *A. fumigatus* auch über diese Fähigkeit verfügt, wurden Sabouraud-Agarplatten mit 10 mM Natriumnitrat und 300 mM Ethanol supplementiert, mit *A. fumigatus* inokkuiert und für fünf Tage bei 37° C inkubiert. Platten, die im Aeroben kultiviert worden waren, zeigten ein deutliches Hyphenwachstum. Dagegen wurde auf Platten, die im Anaeroben kultiviert worden waren, kein Myzel gebildet (Daten nicht gezeigt). *A. fumigatus* ist also im Gegensatz zu *A. nidulans* nicht in der Lage, in Anwesenheit von Nitrat oder Ethanol in einer anaeroben Umgebung zu wachsen.

3.2 Sporen können unter einem Deckgläschen auch im anaeroben Topf auskeimen

In anderem Zusammenhang war aufgefallen, dass Sporen im anaeroben Topf auskeimen konnten, wenn sie in einem Gefäß mit flüssigem Medium unter ein Deckgläschen zum Liegen kamen. Nun sollte diese Beobachtung genauer untersucht werden. Dafür wurde eine sterile Zellkulturschale aus Plastik mit 24 Vertiefungen verwendet. Je vier dieser Vertiefungen wurden entweder mit 1 ml RPMI + 25 mM HEPES oder 1 ml YG_f befüllt. In die Hälfte der Vertiefungen wurden etwa 5x10⁶ Sporen/ml pipettiert. In die vier restlichen Vertiefungen wurden Glasdeckgläschen gelegt, auf denen zuvor mit Hilfe des Zellklebers „Celltak“ mittig eine kleine Menge Sporen fixiert worden war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die aufgeklebten Sporen auf der Unterseite des Deckgläschens zum Liegen kamen. Somit befanden sich die Sporen während des Versuchs zwischen dem Deckglas und dem Boden des Gefäßes. Die Zellkulturschale wurde anschließend in einem „anaeroben Topf“ für sechs Tage inkubiert. Sofort nach dem Öffnen des Topfes wurden die Sporen fixiert, mikroskopisch (Axiovert 25; Zeiss) ausgewertet und mit einer Digitalkamera (Power Shot A6; Canon) photographiert. Sporen, die ohne Deckgläschen inkubiert worden waren, entwickelten sich nicht weiter. Dagegen bildeten die Sporen, die unter das Deckglas geklebt worden waren, in allen Fällen zum Teil lange Hyphen. Unter bestimmten Umständen können Sporen also im „anaeroben Topf“ auskeimen.

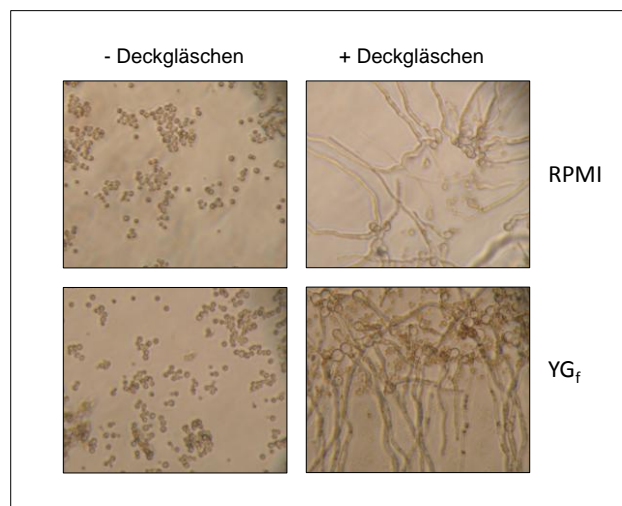


Abb. 63: Untersuchung des Entwicklungsverhaltens von Sporen von *A. fumigatus* ATCC 46645 im anaeroben Topf

Sporen wurden entweder in RPMI oder YG_f-Medium in einem anaeroben Topf für sechs Tage inkubiert. Sie waren entweder frei ins Medium überführt worden oder zuvor mittig auf einem Deckgläschen mit Hilfe des Zellklebers „Cell Tak“ fixiert worden. Anschließend wurden die Deckgläser mit den Sporen nach unten in das Medium überführt. Nach der Inkubation wurden die Präparate fixiert und mikroskopisch analysiert.

D. Diskussion

1. Das NrpA-Protein aus *A. fumigatus*

1.1 NrpA, ein hyphenspezifisches Protein

Den Hauptaspekt dieser Arbeit stellte die Untersuchung des zu CipC homologen Proteins aus *A. fumigatus* (AFUA_5G09330) dar. Dabei handelt es sich um ein Protein, dessen Funktion zu Beginn dieser Arbeit unbekannt war und das in *C. neoformans* als Virulenz-assoziiertes Faktor identifiziert wurde (Steen *et al.*, 2003). Im Verlauf der Arbeit erfolgte eine Umbenennung des Proteins in NrpA (*Nitrogen Regulated Protein A*).

Der Leserahmen des auf dem Chromosom 5 kodierten *nrpA*-Gens wird von zwei Introns unterbrochen. Für den kodierenden Bereich ergibt sich dadurch eine Größe von 393 Bp. Abbildung 64 A zeigt eine schematische Darstellung des Gens, während im Teil B der Abbildung die umgebende Genomregion des sequenzierten Stammes Af293 dargestellt ist. Im Genom von *A. fumigatus* ATCC 46645 konnte 273 Bp stromabwärts von *nrpA* ein verkürztes Transposon identifiziert werden, das im sequenzierten Referenzstamm Af293 nicht vorhanden ist. Bei dem hier gefundenen mobilen genetischen Element handelt es sich um einen Teilbereich des Taf1 Transposons (Monroy und Sheppard, 2005). Aufgrund der Verkürzung hat dieses genetische Element seine Mobilität verloren und kann deswegen zur Unterscheidung verschiedener *A. fumigatus*-Stämme herangezogen werden.

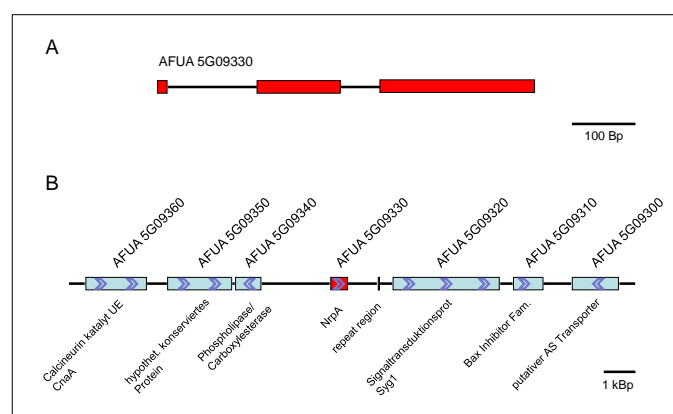


Abb. 64: Genetische Organisation und Umgebung von AFUA_5G09320

A zeigt die genetische Organisation von AFUA_5G09320. Kodierende Bereiche sind in Rot dargestellt, während den Leserahmen unterbrechende Introns als schwarze Linien eingezeichnet sind. Ein Größenstandard ist angegeben. Unter B ist die genetische Umgebung von AFUA_5G09320 (in rot) gezeigt. Dabei sind stromauf- und stromabwärts gelegene offene Leserahmen in blau dargestellt. Die genetische Orientierung ist jeweils durch blaue Pfeile markiert. Ein Größenstandard ist angegeben.

In den zunächst durchgeführten Sequenzanalysen ließen sich auch unter Verwendung verschiedener Computerprogramme keine funktionellen Domänen innerhalb der Sequenz von NrpA identifizieren. Die Vorhersage einer möglichen biologischen Funktion des Proteins konnte somit nicht gemacht werden. Weitere Sequenzanalysen zeigten, dass zu CipC homologe Proteine ausschließlich in Pilzen zu finden sind. Während sie in den meisten filamentösen Pilzen vorkommen, sind sie in Hefen jedoch weniger verbreitet. Mitunter lassen sich im Genom eines Pilzes auch mehrere homologe Gene dieser Familie finden. Verschiedene Lokalisationsvorhersagen lieferten unterschiedliche Ergebnisse. NrpA könnte demnach entweder als zytosolisches Protein vorliegen oder als Protein, das zwischen Zytosol und Kern pendelt.

1.2 Grundlegende Erkenntnisse zur NrpA-Bildung

Um die genauere Untersuchung von NrpA zu ermöglichen, wurden zunächst monoklonale Antikörper gegen das Protein hergestellt, deren Spezifität gezeigt werden konnte. Die schon vor Beginn dieser Arbeit in 2D-Gel-Elektrophorese-Studien beobachtete Hyphen-spezifische Expression von NrpA (Schwienbacher, 2005) wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt. Doch eine Untersuchung, die sich mit der Zusammensetzung der Sporenhülle des *A. fumigatus*-Stammes D141 beschäftigte (Asif *et al.*, 2006), gelangte zu einem anderen Ergebnis. Hier wurde ein zu CipC homologes Protein (NrpA) auf der Oberfläche der Konidien gefunden. Das Fehlen einer N-terminalen Signalsequenz spricht zunächst gegen einen Transport von NrpA auf die Oberfläche der Sporen. Es gibt in Pilzen jedoch sogenannte „Moonlighting“-Proteine, die ohne N-terminale Signalsequenzen die pilzliche Oberfläche erreichen (Gancedo und Flores, 2008). Durch FACS-Analysen der Sporen von *A. fumigatus* D141 und *A. fumigatus* ATCC 46645 sollten zum einen stammspezifische Expressionsunterschiede ausgeschlossen werden, zum anderen sollte das Ergebnis der Western-Blots durch eine unabhängige Methode bestätigt werden, denn es war unklar, ob durch die angewendeten Standard-Proteinpräparationsmethoden Membranproteine in ausreichender Menge isoliert werden konnten. Die FACS-Versuche zeigten eindeutig, dass NrpA weder auf der Sporenoberfläche des Stammes D141 noch des Stammes ATCC 46645 lokalisiert ist. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern konnte auch weitgehend ausgeschlossen werden, dass ein negatives Ergebnis auf ein möglicherweise unzugängliches Erkennungs-Epitop zurückzuführen ist. Nun blieb nur noch die Möglichkeit, dass das NrpA-Protein auf der Oberfläche der Konidien durch die hydrophobe Schicht, die die ruhenden Sporen ummantelt, verdeckt wird. Durch weitere FACS-Versuche mit einer *Aspergillus*-Mutante ($\Delta rodA$), die diese hydrophobe Schicht nicht bilden kann, konnte auch diese These ausgeschlossen werden. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass es sich bei NrpA um ein hyphenspezifisches Protein

handelt. Die Ergebnisse von *Asif* und seinen Kollegen können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass sich das mengenmäßig sehr dominante Hyphenprotein NrpA nach der Lyse der Hyphen an der Oberfläche der Konidien angelagert hat.

Laut einer Lokalisationsvorhersage handelt es sich bei NrpA mit einer hohen Wahrscheinlichkeit um ein zytosolisches Protein. Bislang gab es aber in der Literatur keine experimentellen Daten, die dies bestätigen. Eine differentielle Zentrifugation lieferte erste Hinweise darauf, dass das Protein tatsächlich im Zytosol vorliegt. Selbst nach einem Zentrifugationsschritt bei 43500 g verblieb NrpA im Überstand. Dieser sollte nur noch Fragmente der Plasmamembran und des endoplasmatischen Retikulums sowie kleine Vesikel, Mikrosomen, Ribosomen und Makromoleküle enthalten (Koolmann und Röhm, 2002). Damit konnte also eine Lokalisation des Proteins in größeren Zellkompartimenten ausgeschlossen werden. Durch einen *A. fumigatus*-Stamm, der NrpA als Fusionsprotein mit GFP bildet, konnte die zytosolische Lokalisation des Proteins unabhängig bestätigt werden. Das Fusionsprotein zeigte normalerweise innerhalb der Hyphen eine gleichmäßige Verteilung. Häufig konnte beobachtet werden, dass das Protein bestimmte Zellorganellen ausspart. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um die Zellvakuolen. Für das Lokalisationsverhalten des Proteins spielte es keine Rolle, in welchem Medium die Hyphen gewachsen waren. Auch in verschiedenen Stämmen, die die *nrpA-gfp*-Fusion unter unterschiedlich langen *nrpA*-Promotorregionen exprimierten, ergab sich für das Fusionsprotein kein verändertes Lokalisationsverhalten. Somit konnte eine zytosolische Lokalisation des Proteins experimentell bestätigt werden. Bislang gibt es in der Literatur keine experimentellen Hinweise auf eine zytosolische Lokalisation des Proteins.

Gelfiltrationsanalysen konnten zunächst nicht eindeutig klären, ob NrpA als Monomer oder Dimer vorliegt oder mit einem anderen kleinen Protein interagiert. Erst *Crosslinking*-Studien zeigten den monomeren Aufbau des Proteins eindeutig. Dabei wurde durch die Verwendung einer positiven Kontrolle die Funktionalität der verwendeten *Crosslinker* nachgewiesen. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass ein negatives Ergebnis auf ein möglicherweise unzugängliches Erkennungs-Epitop zurückzuführen ist, da der Versuch mit zwei unterschiedlichen α NrpA-Antikörpern durchgeführt wurde.

1.3 NrpA wird in Abhängigkeit der N-Quelle gebildet

Ein zu *cipC* homologes Gen wird in *F. fujikuroi* in Anwesenheit der N-Quellen Ammonium und Glutamin exprimiert, während es bei Wachstum in Gegenwart von Glutamat nicht exprimiert wird (Teichert *et al.*, 2006). Diese auf Northern-Blots basierenden Daten konnten in dieser Ar-

beit für *A. fumigatus* auf Proteinebene bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Bildung des NrpA-Proteins auch in Antwort auf andere N-Quellen differentiell reagiert. Nitrat und Harnstoff führten dabei zu keiner, Tryptophan zu einer sehr geringen, Valin zu einer schwachen und Asparagin und Asparaginsäure zu einer moderaten Bildung des NrpA-Proteins. Wachstum auf Vollmedium führte zu großen Mengen an NrpA. Die Bildung von NrpA ist in *A. fumigatus* somit eindeutig von der N-Quelle abhängig. Diese Erkenntnisse führten zur Umbenennung des Proteins in NrpA (*Nitrogen regulated protein A*). Eine von *A. fumigatus* sekretierte Glutaminase ist bei Wachstum in Collagen-Medium bereits beschrieben worden (Leonie Heesemann, persönliche Mitteilung). Die Vermutung, dass *A. fumigatus* die N-Quelle Glutamin durch eine ins Medium sekretierte Glutaminase in Ammonium und Glutamat spaltet und diese Produkte anschließend getrennt aufnimmt, konnte nicht bestätigt werden. Somit scheint die Aufnahme von Glutamin in ungespaltener Form stattzufinden. Die These hätte eine Erklärung für die Beobachtung sein können, dass der Pilz in Anwesenheit der N-Quelle Ammonium mehr NrpA bildet als in Anwesenheit von Glutamin.

Das NrpA-Protein wird in Anwesenheit einer N-Quelle, die die Bildung des Proteins induziert, auch dann gebildet, wenn zusätzlich eine normalerweise die Proteinbildung unterdrückende N-Quelle vorhanden ist. Damit dominiert die positive Regulation der Proteinbildung über die negative. Daraus kann man schlussfolgern, dass das Protein auch in Anwesenheit normalerweise unterdrückender Signale scheinbar keine negativen Auswirkungen auf den Pilz hat. Desweiteren zeigte sich, dass die gebildete Menge des NrpA-Proteins von der Inkubationszeit der Kultur abhängt. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führte dabei zu größeren Mengen des NrpA-Proteins. In diesem Versuch konnten die Proteinextrakte der Kulturen, die nach 48 und 60 Stunden geerntet worden waren, für die Analysen nicht verwendet werden, da die Proteinkonzentrationen zu gering waren. Der Grund hierfür könnte sein, dass sich die Pilzkultur zu diesem Zeitpunkt bereits in der Absterbephase befunden hat und es zum Abbau des Myzels kam. Die Vermutung wird durch eine Feuchtgewichtsbestimmung gestützt, die eine deutliche Abnahme des Feuchtgewichts zu diesen beiden Zeitpunkten zeigt. Doch auch die Menge der zum Animpfen verwendeten Sporen wirkte sich auf die Bildung des NrpA-Proteins aus. Höhere Sporenmengen führten zu einer vermehrten Bildung. In beiden Versuchen wird also bei höheren Kulturdichten, die entweder durch längere Wachstumszeiten und oder durch höhere Animpfdichten verursacht wurden, mehr NrpA gebildet. In Versuchen, in denen *A. fumigatus* Glutamin als C- und N-Quelle nutzen musste, wurde kein NrpA gebildet. Auch unter diesen Versuchsbedingungen waren die Kulturdichten im Vergleich zu Kulturen, die in Standardmedien gewachsen waren, relativ niedrig. Neben der Kulturdichte scheint auch ein komplexeres und reichhaltigeres Medium die NrpA-Bildung zu fördern. Dafür spricht, dass in einem Vollmedium meist noch mehr NrpA gebildet

wird, als in einem Minimalmedium. Somit könnte NrpA eine mögliche Funktion als Speicherprotein haben und *A. fumigatus* in Anwesenheit von Mangelbedingungen zum Überleben verhelfen. Während eines dreistündigen C- oder N-Mangels verringerte sich die NrpA-Menge allerdings nicht. Dies spricht also eher gegen die Funktion als Speicherprotein. Die Kultur des Pilzes unter Mangelbedingungen konnte nicht für einen längeren Zeitraum erfolgen, da der Aufschluss des Myzels sonst nicht mehr möglich war.

Wird Pilzmyzel in Medium angezogen, das die Bildung von NrpA fördert, und anschließend in Medium umgesetzt, welches die Bildung eigentlich unterdrückt, kann erst nach sechs Stunden ein leichter Rückgang der Proteinmenge beobachtet werden. Auch in der umgekehrten Versuchsvariante dauerte es sechs Stunden, bis das Protein in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Der Anpassungszeitraum erscheint relativ langsam. Somit wird eine tragende Rolle für NrpA bei der metabolischen Anpassung des Pilzes an die induzierende N-Quelle sowie deren Abbau unwahrscheinlicher. In Anwesenheit einer nicht induzierenden N-Quelle scheint NrpA wieder keine negativen Auswirkungen auf den Pilz zu haben, da auch hier der Abbau oder die Ausverdünnung des Proteins eher langsam ablaufen.

Die Deletion der Glutamin-Synthetase führt in *F. fujikuroi* zu einer geringeren Expression eines zu *cipC* homologen Gens (Teichert *et. al.*, 2004). Dieser Effekt konnte durch die externe Gabe von Glutamin nicht ausgeglichen werden. Auch eine Inhibierung der Glutaminsynthetase durch den spezifischen Inhibitor MSX führte zu einer deutlich geringeren *cipC*-Expression. Diese Beobachtung konnte in *A. fumigatus* auf Proteinebene bestätigt werden. Auch hier verursacht MSX in Anwesenheit der N-Quelle Glutamin eine deutlich verringerte Bildung von NrpA. Dieses Ergebnis erscheint widersprüchlich. Einerseits wird NrpA in Anwesenheit von Glutamin gebildet und in Anwesenheit von Glutamat nicht gebildet. Andererseits scheint die Bildung von der Aktivität der Glutamin-Synthetase abzuhängen. Dieses Enzym überträgt Ammonium auf Glutamat und führt zur Bildung von Glutamin. Gerade in Anwesenheit der N-Quelle Glutamat sollte das Enzym also sehr aktiv sein, während in Anwesenheit von Glutamin nur eine geringe Aktivität zu erwarten ist. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Bindung von MSX an die Glutamin-Synthetase die Interaktion des Enzyms mit einem anderen Protein stört und dadurch die Regulation von *nrpA* beeinflusst. Schon vor längerem konnte gezeigt werden, dass die Glutamin-Synthetase in *Bacillus subtilis* (Wray *et al.*, 2001) und in *N. crassa* (Dunn-Colemann und Garrett, 1980, 1981) als wichtiger Genregulator in Abhängigkeit der N-Quelle dient. Auch die oben genannte Studie in *F. fujikuroi* kommt zu der Schlussfolgerung, dass die Glutamin-Synthetase eine bedeutende Rolle in der N-Metabolit-Repression spielt. Eine Regulation von *nrpA* in Abhängigkeit der Glutamin-Synthetase scheint somit nicht unwahrscheinlich. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Beobachtung um einen sekundären Effekt handelt.

Desweiteren konnte in *F. fujikuroi* von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Inhibierung der TOR-Kinase durch Rapamycin zu einer verstärkten Expression eines zu *cipC* homologen Gens führt (Teichert *et al.*, 2006). Bei den TOR-Kinasen handelt es sich um stark konservierte Serin/Threonin-Kinasen, die sowohl in Hefen als auch in Säugern eine Schlüsselrolle in der nährstoffabhängigen-Signaltransduktion spielen (Cutler *et al.*, 1999). In filamentösen Pilzen scheint es im Gegensatz zu den Hefen nur ein homologes Protein zu geben, welches bisher nicht ausgiebig untersucht wurde. In *Saccharomyces cerevisiae* führt sowohl ein N-Mangel als auch die Inhibierung der TOR-Kinasen zur Expression von Genen, die unter der N-Katabolit-Repression stehen (Beck und Hall, 1999). Eine Inhibierung der TOR-Kinase spiegelt der Zelle also eine N-Mangelsituation vor. In *F. fujikuroi* scheint *cipC* bei einem N-Mangel verstärkt gebildet zu werden. Der selbe Effekt wurde auch in einem anderen Pilz, nämlich *Ustilago maydis*, beobachtet. Dieses Ergebnis wird allerdings nur als unpublizierte Daten in einer anderen Studie erwähnt (Böhmer *et al.*, 2007). In *A. fumigatus* konnte auf Proteinebene kein durch die Inhibierung von TOR verursachter Effekt auf die gebildete NrpA-Menge nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht also dafür, dass NrpA in *A. fumigatus* während eines N-Mangels keine Rolle spielt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass auch ein dreistündiger N- oder C-Mangel die Menge des gebildeten NrpA-Proteins nicht beeinflusst. Somit scheint sich *A. fumigatus* in diesem Aspekt von *F. fujikuroi* und *U. maydis* zu unterscheiden.

Alle in dieser Arbeit hergestellten *A. fumigatus*-Reporterstämme, die *gfp*, *lacZ*, oder eine *nrpA-gfp*-Fusion unter dem *nrpA*-Promotor exprimieren, zeigen eine Auffälligkeit: Der Promotor verursacht auch unter normalerweise reprimierenden Wachstumsbedingungen die Bildung von NrpA. Somit konnte die N-abhängige Regulation des *nrpA*-Gens mithilfe dieser Stämme nicht gezeigt werden. Auch die Verwendung einer längeren Promotorregion führte nicht zum wildtypischen Regulationsverhalten. In den GFP-Reporter-Stämmen wird NrpA-GFP auch innerhalb der Konidien gebildet, die, wie eindeutig gezeigt wurde, das Protein normalerweise nicht enthalten. Somit ist für die negative Regulation der Genaktivität von *nrpA* der gewählte Promotorbereich von 1016 bzw. 1576 Bp nicht ausreichend. Ob die Wahl einer noch längeren Promotorregion die negative Genregulation wiederherstellen könnte, wurde nicht überprüft. Die Länge der hier gewählten Promotorregionen hätte zur vollständigen Regulation anderer Gene aus *A. fumigatus* genügt. So wird z. B. die Regulation des Isocitratlyase-Gens aus *A. fumigatus* durch eine 942 Bp große Promotorregion gesteuert (Ebel *et al.*, 2006). Die Notwendigkeit von langen Promotorregionen scheint in filamentösen Pilzen vorzukommen. In *A. nidulans* wurde z. B. gezeigt, dass die Transkription des Isopenicillin-N-Synthase-Gens durch eine 2005 Bp große Promotorregion reguliert wird (Perez-Esteban *et al.*, 1993). Auffälligerweise befindet sich flussaufwärts des *nrpA*-Gens ein großer intergenischer Bereich (siehe Abb. 63 B). Ob dies im Zusammenhang

mit der negativen Regulation von *nrpA* steht bleibt spekulativ. Die Versuche zeigen aber deutlich, dass sich der *nrpA*-Promotor sehr gut als Expressionspromotor einsetzen lässt. Er führt zu einem starken Expressionslevel und dadurch zu hohen Proteinkonzentrationen. Desweiteren besitzt er sowohl in Sporen als auch in Hyphen eine Aktivität. Der Promotor ist von daher sicher auch für andere Experimente etwa für Proteinüberexpressionen geeignet.

1.4 NrpA als stressinduziertes Protein

Zu CipC und somit auch zu NrpA homologe Proteine werden in der Literatur oftmals als stressinduzierte Proteine bezeichnet. Grund hierfür ist wohl, dass das CipC-Protein aus *A. nidulans* als Concanamycin-A-induziertes Protein beschrieben worden ist (Melin *et al.*, 2002). Unter Verwendung der als wirksam beschriebenen Antibiotikumkonzentration (20 µg/ml) konnte in *A. fumigatus* allerdings keine verstärkte Bildung des Proteins nachgewiesen werden. Auch mehrere Versuchsvarianten wie die Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien oder veränderte Inkubationszeiten führten dabei zu dem selben Ergebnis. Auch unabhängige Versuche mit einem *A. fumigatus*-Stamm, der neben dem nativen NrpA ein NrpA-GFP-Fusionsprotein bildet, zeigten keine durch Concanamycin A verstärkte NrpA-Bildung. Normalerweise war im Mikroskop optisch kein Unterschied der NrpA-GFP-Menge in den Hyphen in An- oder Abwesenheit von Concanamycin A auszumachen. Der in einem Versuch entstandene optische Eindruck einer etwas verstärkten NrpA-GFP-Bildung in Anwesenheit von Concanamycin A konnte in Western-Blot-Analysen eindeutig widerlegt werden. Weiterhin zeigte die Untersuchung des NrpA-GFP-Stammes, dass das Antibiotikum auch zu keinem verändertem Lokalisationsverhalten von NrpA führt. Das Protein blieb weiterhin gleichmäßig in den Hyphen verteilt. Bei Concanamycin A handelt es sich um ein Plecomacrolid-Antibiotikum, das die Aktivität von vakuolären ATPasen durch Bindung an den V_0 -Komplex hemmt (Huss *et al.*, 2002). In filamentösen Pilzen führt die Inhibierung der V-ATPase zu einem auffälligen Wachstumsverhalten, nämlich zur Bildung von kurzen, dicklichen und stark verzweigten Hyphen (Bowman *et al.*, 1997). Durch die Beobachtung des beschriebenen Wachstumsphänotyps, konnte die biologische Aktivität von Concanamycin A in *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Der Name CipC steht in *A. nidulans* für Concanamycin A induziertes Protein C (CipC). Nachdem hier eindeutig gezeigt werden konnte, dass das homologe Protein aus *A. fumigatus* durch Concanamycin A nicht induziert wird, wurde das Protein aufgrund vorher beschriebener Ergebnisse in NrpA (*Nitrogen regulated Protein A*) umbenannt.

Desweiteren wurde die Auswirkung von osmotischem Stress auf die Bildung des NrpA-Proteins untersucht. Dabei zeigte sich, dass NaCl in den verwendeten Konzentrationen (250 mM, 500 mM und 750 mM) keine Auswirkung auf die Bildung des NrpA-Proteins hatte. Die Salzkonzentratio-

nen waren so gewählt, dass der Pilz unter starkem osmotischem Stress stand. Dies zeigte sich vor allem dadurch, dass das Wachstum des Myzels in Anwesenheit der höheren NaCl-Konzentrationen deutlich beeinträchtigt war. Auch eine *A. fumigatus*- $\DeltaakuB\Delta nrpA$ -Mutante zeigte bei Tüpfeltests in Anwesenheit eines NaCl-Konzentrationsgradienten kein verändertes Wachstumsverhalten. Somit konnte gezeigt werden, dass das NrpA-Protein bei osmotischem Stress keine Rolle spielt.

Auch der Einfluss von oxidativem Stress auf die NrpA-Bildung wurde untersucht. Hier zeigte sich, dass erhöhte interne Konzentrationen an Superoxidanionen, die durch verschiedene Konzentrationen von Menadion verursacht wurden, keine Auswirkung auf die Bildung von NrpA hatten. Die verwendete Chemikalie Menadion führt *in vivo* zur Bildung von Superoxidanionen (Powis, 1989). Durch eine einstufige Reduktion von Menadion durch Flavoenzyme wird das entsprechende Semiquinon gebildet (Chesis *et al.*, 1984; Nakamura und Hayashi 1994), welches anschließend durch Autooxidation unter Superoxidfreisetzung wieder zu Menadion reagiert. Die in diesem Versuch eingesetzten Menadionkonzentrationen (2,5 mM, 10 mM, 40 mM) orientierten sich an einer Studie mit *S. cerevisiae*. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie zu oxidativen Schäden innerhalb der Zelle führen und den Pilz unter enormen oxidativen Stress setzen. Durch H₂O₂ verursachter oxidativer Stress führte zu einer Veränderung des Molekulargewichts von NrpA. Die etwas vergrößerte Proteinvariante war in Anwesenheit von 30 mM H₂O₂ sehr deutlich nachweisbar. Höhere H₂O₂-Konzentrationen führten dazu, dass man NrpA sowie die vergrößerte Variante kaum mehr (125 mM) bzw. nicht mehr (500 mM) nachweisen konnte. Durch MALDI-TOF-Analysen konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem etwas vergrößerten Protein um NrpA handelt. Es wurden aber keine Hinweise auf eine Myrestilierung oder eine sonstige Proteinmodifikation gefunden. Die hier verwendeten H₂O₂-Konzentrationen wurden so gewählt, dass man von einer oxidativen Schädigung der Zelle ausgehen kann. Nachdem man auch in den mit Coomassie gefärbten SDS-Gelen der gleichen Extrakte bei steigender H₂O₂-Konzentration eine deutliche Abnahme der Proteinmenge beobachten kann, scheint es also durch den enormen oxidativen Stress bereits zur Zerstörung des Myzels und zur Zersetzung von Proteinen gekommen zu sein. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass das Myzel der Pilzkultur, die die höchste Konzentration erhalten hatte, sehr schlecht aussah. Allerdings konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass die verringerten Proteinkonzentrationen durch einen schlechteren Aufschluß des Myzels bedingt waren. In den mit Coomassie gefärbten SDS-Gelen waren zwei Proteine aufgefallen, deren Bildung sich in Anwesenheit von 30 und 125 mM H₂O₂ deutlich verstärkt hatte. Da diese verstärkte Bildung möglicherweise eine Anpassung des Pilzes an die erhöhten H₂O₂-Konzentrationen darstellen könnten wurden diese Proteine per MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Es handelt sich um eine Transaldolase (ca. 36 kDa) und eine Myo-

Inositolphosphat-Synthase (ca. 52 kDa). Die Transaldolase ist ein Schlüsselenzym des reversiblen, nicht-oxidativen Zweigs des Pentosephosphatwegs. Dieser Zweig ist für die Generierung von NADPH verantwortlich, welches Glutathion in der reduzierten Form hält und Zellen dadurch vor ROS schützt. Eine Untersuchung aus dem Jahr 1996 zeigt, dass die Transaldolase in humanen Jurkat-T-Zellen die Balance zwischen den beiden Zweigen des Pentose-Phosphat-Wegs reguliert und dadurch die Sensibilität der Zellen gegenüber Zelltod-Signalen beeinflusst. Eine Überexpression der Transaldolase führte dazu, dass die NADPH- und Glutathion-Level innerhalb der Zelle niedrig waren und die Zellen sehr empfänglich auf Apoptose-Signale reagierten (Banki *et al.*, 1996). Somit deutet die Überexpression der Transaldolase in Antwort auf hohe H_2O_2 -Konzentrationen möglicherweise auf die bevorstehende Apoptose des Pilzes hin. Die Myo-Inositolphosphat-Synthase katalysiert die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Myo-Inositol-1-phosphat. Es handelt sich dabei um den ersten und limitierenden Schritt der Biosynthese aller Inositol-haltiger Verbindungen. Inositol-Phospholipide spielen bekanntermaßen eine wichtige Rolle für die Membranbildung, die Biosynthese der Zellwand, für Signal-Transduktionen und für die zelluläre Stressantwort (Loewus, 1990). Die vermehrte Bildung der Myo-Inositolphosphat-Synthase stellt also vermutlich eine Anpassung von *A. fumigatus* an die oxidative Stressbelastung dar.

In mikroskopischen Untersuchungen des Pro_{nrpA}-NrpA-GFP-Stammes zeigte sich ein durch H_2O_2 verursachter Effekt auf die Lokalisation von NrpA-GFP. Das Fusionsprotein war zunächst gleichmäßig innerhalb der Hyphen verteilt und formierte sich anschließend nach der Zugabe von H_2O_2 in punktförmigen Strukturen, die innerhalb der Hyphen verteilt waren, sich aber nicht innerhalb der Zellkerne befanden. Aus Zeitmangel konnten keine weiterführenden Kollokalisationsstudien durchgeführt werden und es gibt somit keinen Hinweis darauf, in welchen Zellkompartimenten sich diese punktförmigen Strukturen befinden. Das NrpA-Protein wurde in einer Lokalisationsvorhersage als zwischen Kern und Cytoplasma pendelnd gesehen. Zumindest als Reaktion auf den oxidativen Stress bewegt sich das Fusionsprotein aber nicht in den Kern und ist somit weder direkt noch indirekt an der Genregulation beteiligt.

Insgesamt zeigen die beiden unabhängigen Versuche deutlich, dass H_2O_2 einen Effekt auf das NrpA-Protein ausübt. Obwohl Menadion indirekt auch zu einer vermehrten Bildung von H_2O_2 führen sollte, zeigt sich hier aber kein Effekt. Dies ist dadurch erklärbar, dass der beobachtete Einfluss von H_2O_2 erst bei physiologisch hohen Konzentrationen zu beobachten ist, die durch die hier verwendeten Menadionkonzentrationen wohl nicht erreicht werden.

1.5 Charakterisierung des Phänotyps einer *A. fumigatus*- Δ *nrpA*-Mutante

Durch die Charakterisierung des Phänotyps einer im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *A. fumigatus*- Δ *nrpA*-Mutante sollten Hinweise auf die biologische Funktion von NrpA erlangt werden. Nachdem die Mutante lebensfähig war, konnte es sich bei NrpA um kein essentielles Protein handeln. In den durchgeführten vergleichenden Wachstumsversuchen war zwischen der Mutante und dem Wildtyp-Stamm kein Unterschied festzustellen. Dabei wurde sowohl das radiale Wachstum des Pilzes bei unterschiedlichen Temperaturen (RT, 37° C, 46° C), als auch in Anwesenheit verschiedener N-Quellen (2, 20, 40 mM Ammonium-Tartrat und 0,5, 5, 50 mM Glutamat) untersucht. Es erfolgte auch eine Untersuchung des Wachstums durch Tüpfeltests. Diese wurden zum einen auf Gradientenagarplatten durchgeführt. Dabei wurden wieder verschiedene N-Quellen (Ammonium: 20, 10, 5, 2,5 mM; Nitrat: 100, 70, 7, 0,7 mM; Glutamat: 50, 5 0.5 mM) und osmotischer Stress (NaCl; 1M) untersucht. Zum anderen erfolgten die Tüpfeltests auf normalen Agarplatten mit verschiedenen C- (Glukose, Glycerin, Ethanol, Saccharose, Fruktose, Sorbit, Maltose, Galaktose, Mannose, Mannit, Laktose, BSA, Ammoniumacetat) oder N-Quellen (Ammonium, Glutamat, Nitrat). Die durchgeführten Versuche zeigen, dass das NrpA-Protein auch in Anwesenheit einer N-Quelle (Ammonium), die stimulierend auf die Bildung des Proteins wirkt, nicht für das Wachstum der Mutante nötig ist. Folgerichtig hat die Abwesenheit des Proteins bei Wachstum auf N-Quellen, die keine NrpA-Bildung bewirken, auch keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutante. In *A. nidulans* war *cipC* in einer Transkriptomanalyse des Wildtyps und einer *creA*-Mutante bei Wachstum auf Glukose und Ethanol als Transkript aufgefallen, das in der *creA*-Mutante in Anwesenheit von Ethanol deutlich stärker exprimiert wird als in den anderen Ansätzen (Mogenson *et al.*, 2006). Das CreA-Protein stellt den üblichen Regulator der Kohlenstoff-Katabolit-Repression dar. Neben *cipC* wurden noch 33 andere Gene in der gleichen Weise reguliert. Viele davon sind für die Biosynthese von Aminosäuren wichtig. Die Gene werden also möglicherweise durch einen synergistischen Effekt der C-Quelle Ethanol und das Fehlens von *creA* reguliert. In den Tüpfeltests wurden verschiedene C-Quellen verwendet. Davon gelten einige innerhalb der Kohlenstoff-Katabolit-Repression als starke Repressoren (Glukose, Saccharose und Acetat), andere als mittlere Repressoren (Mannose, Maltose, Fruktose, Galactose) und wieder andere als Derepressoren (Glycerin, Laktose, Ethanol) (Ruijter und Visser, 1997). Weiterhin wurde darauf geachtet, dass sowohl Mono- als auch Disaccharide, Zuckeralkohole und Alkohole sowie andere C-Quellen im Testsystem vertreten sind. Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion von *nrpA* in Anwesenheit eines intakten *creA*-Gens zu keinem veränderten Wachstum des Pilzes auf einer der genannten C-Quellen führt. Da der in *A. nidulans* nachgewiesene, durch Ethanol verursachte Effekt nur in der *creA*-Mutante zu beobachten war, ist auch davon auszugehen, dass es sich hier um einen sekundären Effekt handelt. Da osmotischer Stress auch in Western-Blot-

Analysen keinen Einfluss auf die gebildete NrpA-Menge hatte, scheint es nicht verwunderlich, dass sich auch in den Tüpfeltests kein verändertes Wachstumsverhalten der Mutante gezeigt hat. Mit diesem Versuch wurde allerdings noch deutlicher, dass NrpA für die Anpassung des Pilzes an durch NaCl verursachten osmotischen Stress unbedeutend ist. Weiterhin wurde auch deutlich, dass das NrpA-Protein für das Wachstum von *A. fumigatus* bei höheren Temperaturen nicht von Bedeutung ist. In *C. neoformans* (Serotyp D Stamm B3501A) wurde eine um das 55fache erhöhte Expression eines zu *cipC* homologen Transkripts bei 37° C im Vergleich zu 25° C nachgewiesen (Steen *et al.*, 2002). Wie in einer weiteren Publikation der selben Arbeitsgruppe als unpublizierte Daten erwähnt wird, zeigte auch eine *cipC*-Deletionsmutante in *C. neoformans* (B3501A) einen temperatursensitiven Wachstumsphänotyp (Steen *et al.*, 2003). Hier wird allerdings auch erwähnt, dass die temperaturabhängige Regulation von *cipC* im Serotyp-A-Stamm nicht beobachtet werden konnte. Da in *A. fumigatus* eine *nrpA*-Deletionsmutante keinen temperaturabhängigen Phänotyp aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass sich *A. fumigatus* und *C. neoformans* (Serotyp D Stamm B3501A) bezüglich der temperaturabhängigen Regulation des zu *cipC* homologen Gens unterscheiden.

Da durch alle bis dahin durchgeführten Wachstumsversuche kein auffälliger Phänotyp der Δ *nrpA*-Mutante charakterisiert werden konnte, wurden *Phenotype Microarrays* durchgeführt. Aufgrund der bekannten N-abhängigen Bildung von NrpA wurde das Wachstum von Mutante und Wildtyp in Anwesenheit 96 verschiedener N-Quellen untersucht. Weiterhin wurde auch eine Testplatte mit unterschiedlichen pH-Werten zur Analyse verwendet, um eine mögliche Notwendigkeit des Proteins für pH-abhängigen Stress zu untersuchen. Eine genaue Auflistung der getesteten Substanzen ist im Anhang zu finden. Dabei wurde ein leichter Wachstumsunterschied zwischen Mutante und Wildtyp nur in Anwesenheit der N-Quelle Asparagin festgestellt. Da der Versuch zum einen optisch ausgewertet und zum anderen nur in einer Ausführung durchgeführt wurde, kann das Ergebnis nur unter Vorbehalt betrachtet werden. Aus Zeitmangel konnte dieses Ergebnis nicht in einem unabhängigen Testsystem überprüft werden. In Western-Blot-Analysen war in Anwesenheit der N-Quelle Asparagin keine Auffälligkeit in Bezug auf die NrpA-Bildung beobachtet worden.

In der *A. fumigatus*- Δ *nrpA*-Mutante wird die Myzel-Katalase 1, die auch als Katalase B bezeichnet wird, im Vergleich zum Wildtypstamm in erhöhtem Maße gebildet. Das Enzym ist für die Umwandlung von H₂O₂ in Sauerstoff und Wasser verantwortlich und sorgt somit für eine Entgiftung von H₂O₂. Das Fehlen von NrpA führt in *A. fumigatus* also zu einem erhöhten Bedarf der H₂O₂-Entgiftung. Erstaunlicherweise führt dieser Expressionsunterschied zu keiner geringeren Sensibilität des Wildtypstammes gegenüber H₂O₂ im Vergleich zum Mutanten-Stamm. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass *A. fumigatus* über zwei Myzel-Katalasen verfügt, deren

Funktion sich gegenseitig ausgleicht und die sich gegenseitig in ihrer Regulation beeinflussen können. *A. fumigatus*-Deletionsmutanten der beiden Katalase-Gene zeigten sich nicht weniger empfindlich gegenüber H_2O_2 als der Wildtyp. Erst ein Doppelmutantenstamm reagierte etwas sensitiver gegenüber H_2O_2 (Calera *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 2003).

Wie unter Punkt 3 bereits diskutiert, zeigt NrpA in Anwesenheit von H_2O_2 ein verändertes Laufverhalten in SDS-Gelen sowie eine punktförmige Lokalisation innerhalb der Hyphen. In der $\Delta nrpA$ -Mutante konnte eine erhöhte Katalase-1-Bildung nachgewiesen werden. Diese führte aber zu keinem Wachstumseffekt in Anwesenheit von H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Insgesamt deuten diese Daten daraufhin, dass NrpA mit der oxidativen Stressantwort von *A. fumigatus* in Antwort auf H_2O_2 in Zusammenhang steht. Welche Rolle dieses Protein dabei spielt bleibt unklar.

1.6 Die Rolle von NrpA während der Virulenz

C. neoformans ist ein pathogener Pilz, der in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen und sowohl in immunkompetenten als auch in immungeschwächten Organismen Meningitis zu verursachen. In einer Studie, die die Genexpression von *C. neoformans* während der Infektion in einem Meningitis-Modell in Kaninchen analysierte, war ein zu *cipC* homologes Gen als das am dritthöchsten induzierte Transkript während der Virulenz aufgefallen (Steen *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe untersuchte die Genexpression von *C. neoformans* mit Hilfe der SAGE-Technik (*Serial Analysis of Gene Expression*). Dabei werden RNA-Moleküle immobilisiert, identifiziert und gezählt. Diese Methode soll einen Überblick über die gesamte Gen-Aktivität einer Zelle geben können. Auch in dem dimorphen Pflanzenpathogen *Ustilago maydis* wurde ein zu *CipC* homologes Protein nach dem Wechsel des Pilzes vom saprophytischen Hefezelltyp zum pythopathogenen filamentösen Morphotyp deutlich hochreguliert (Böhmer *et al.*, 2007). Somit scheint eine Beteiligung dieses Proteins während der Virulenz und/oder der dimorphen Wachstumsweise des Pilzes möglich. Aufgrund dieser Befunde sollte in der vorliegenden Arbeit die mögliche Rolle von NrpA für die Virulenz von *A. fumigatus* geklärt werden.

Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, bilden ABPA-Patienten spezifische Antikörper gegen einige Hyphenproteine von *A. fumigatus*, die deswegen für die Diagnostik sehr wichtig sind (Hemmann *et al.*, 1999). In sechs verschiedenen Seren von ABPA-Patienten konnten keine spezifischen α NrpA-Antikörper nachgewiesen werden. Somit muss man entweder davon ausgehen, dass das Immunsystem während der Etablierung der Krankheit nicht in Kontakt mit dem hypenspezifischen Protein kommt oder dass das Protein nicht immunstimulierend wirkt.

Eine *A. fumigatus* CEA 17 $\DeltaakuB \DeltanrpA$ -Mutante verursachte während eines Infektionsversuchs in murinen Makrophagen keine veränderte IL-10- oder TNF α -Ausschüttung im Vergleich zum Wildtypstamm (*A. fumigatus* CEA17 $\DeltaakuB pyrG^+$). Eine Deletion von *nrpA* führt also zu keiner veränderten Stimulierung der Makrophagen. Während der Inkubationszeit keimen die Sporen aus und bilden Hyphen. Die Makrophagen reagieren darauf wahrscheinlich mit der Bildung von ROS, diese hätten auf die Mutante anders wirken können als auf den Wildtyp. Weiterhin könnte ein Protein wie NrpA, das möglicherweise über die Fähigkeit verfügt, in den Zellkern zu wandern, die Genexpression beeinflussen und dadurch möglicherweise auch für eine Umstrukturierung der Zellwand sorgen, die wiederum die Zytokinantwort der Makrophagen beeinflusst.

Desweiteren sollte die Rolle von NrpA auf das Virulenzverhalten des Pilzes in einem ganzheitlichen System untersucht werden, das alle Phasen der Infektion und möglichen Immunantworten abdeckt. Dafür wurden vergleichende Virulenzversuche von Mutante und Wildtyp im Hühner-eimodell von Ilse Jacobsen am HKI in Jena durchgeführt. Dieses Modell bildet nicht nur die metabolischen Voraussetzungen von Virulenz ab, sondern in den Eiern existiert auch ein Immunsystem mit Phagozyten und Zellen, die den menschlichen Granulozyten entsprechen (Jacobsen *et al.*, 2010). Auch in diesem Modell war kein Unterschied im Virulenzverhalten von Mutante und Wildtyp zu beobachten.

Insgesamt lassen die hier durchgeführten Versuche vermuten, dass das NrpA-Protein für die Virulenz von *A. fumigatus* keine Rolle spielt. Das Protein eignet sich weder als Marker für die Diagnose von ABPA noch als therapeutisches Ziel, da eine Mutante lebensfähig ist, kein verringertes Wachstum zeigt und sich im Virulenzmodell nicht anders verhält als der Wildtyp. Die wichtige Rolle, die ein homologes Protein für die Virulenz von *C. neoformans* zu spielen scheint, wird möglicherweise auch durch andere sekundäre Faktoren verursacht. Zum einen könnten im Virulenzmodell Stoffwechsellanpassungen des Pilzes zu einer höheren Expression des Transkripts führen, zum anderen könnten sich die Kontrollkulturen und die aus den Kaninchen reisolierten *Cryptococcon* zum Erntezeitpunkt in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden haben. Eine Bildung des NrpA-Proteins in Abhängigkeit der Inkubationszeit und Kulturdichte konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

1.7 Ausblick

Bisher waren zu CipC/*cipC* homologe Proteine bzw. Gene nur in Transkriptom oder Transkriptionsanalysen aufgefallen. Genauere und ausführlichere Untersuchungen eines homologen Proteins wurden – abgesehen von dieser Arbeit – bislang nicht durchgeführt. Nach derzeitigem

Kenntnisstand handelt es sich bei dem hier generierten monoklonalen Antikörper um den ersten Antikörper, der gegen ein CipC-homologes Protein gerichtet ist. Desweiteren wurde in dieser Arbeit zum erstenmal eine Mutante charakterisiert, die eine Deletion des zu *cipC* homologen Gens *nrpA* trägt. Aufgrund von Zeitmangel konnten einige interessante Aspekte, wie etwa der durch H₂O₂ verursachte Effekt auf das NrpA-Protein, nicht mehr weiterverfolgt werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse können für eine zukünftige genaue Klärung der Proteinfunktion einen wichtigen Beitrag liefern. Insgesamt wurden hier wichtige grundlegende Resultate über die Bedeutung des NrpA-Proteins in *A. fumigatus* vorgelegt.

2. Die putative mitochondriale MnSOD aus *A. fumigatus*

Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) spielen in der pilzlichen Zelle eine duale Rolle. Zu ihrer Bildung führen zu einem viele Umweltfaktoren wie ionisierende Strahlung, UV-Licht, Temperaturwechsel oder mechanische Beschädigungen der Zelle. Zum anderen entstehen sie als Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels. Insgesamt können sich in der Zelle viele verschiedene ROS bilden, so etwa der Singulett Sauerstoff (¹O₂), das Superoxidanion (O₂^{•-}), das Hydroxylradikal (OH[•]), das Peroxidradikal (HO₂[•]), das Peroxid-Ion (HO₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Stickstoffmonoxid (NO[•]). Die Hauptquelle des Superoxidanions ist die unvollständige Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die Atmungskette (Gessler *et al.*, 2007). Aber es kann auch durch andere Stoffwechselforgänge in der Zelle entstehen, beispielsweise durch die Aktivität folgender Enzyme: Xanthin-Oxidase, Monooxygenase, Lipooxygenase, Cyclooxygenase oder durch die Autooxidation von Thiolen, Flavinen, Quinonen und Catecholaminen (Georgiou *et al.*, 2006). Die Schädlichkeit der ROS für die Zelle und ihre Rolle während des Alterns ist seit längerem bekannt. Doch wie man heute weiß, spielen diese eigentlich schädlichen Radikale in Zellen auch eine positive Rolle: Sie regulieren Reifung, Differenzierung, extrazelluläre Signaltransduktion, Ionen-Transport und Immunantwort (Droge, 2002). Viele Organismen besitzen Enzymsysteme, die ROS gezielt bilden können. Fast alle multizellulären Organismen verfügen über eine NADPH-Oxidase (NOX), die Superoxidanionen produziert. Diese finden dann z. B. im respiratorischen *Burst* ihre Anwendung als Abwehrstrategie. Doch auch die meisten Fruchtkörper bildenden Pilze, wie etwa *A. fumigatus* und *A. nidulans*, verfügen über *nox*-Gene. In *A. nidulans* führt eine Inaktivierung von NOX zu vermehrtem Hyphenwachstum und zur Unterdrückung der asexuellen Reproduktion (Aguirre *et al.*, 2005). Weiterhin scheinen ROS auch die Auskeimung von Sporen zu beeinflussen. Es ist seit langem bekannt, dass Pilzsporen nicht auskeimen, wenn sie zu dünn oder zu dicht beimpft werden. In *M. griseae* konnte diese Entwicklungshemmung durch Zugabe

von Antioxidantien (z. B. SODs und Katalasen) aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass auskeimende Sporen ROS sekretieren und dadurch eine Selbstregulation der Auskeimung bewirken (Gessler *et al.*, 2007). Desweiteren können ROS dem Organismus auch wichtige Dienste im Konkurrenzkampf verschiedener Arten im gleichen Ökosystem leisten. So kann sich z.B. *Talaromyces flavus* durch eine von ihm sekretierte Glukose-Oxidase, die zur Bildung von H_2O_2 führt, gegen andere Organismen behaupten (Fravel und Roberts, 1991). Pilze nützen zudem selbstgebildete Hydroxylradikale auch beim Abbau von Cellulose und Lignin und können sich dadurch Nährstoffquellen sichern (Tornberg und Olsson, 2002). Gerade aber in der Interaktion pathogener Organismen mit ihren Wirten spielen ROS eine wichtige Rolle und dienen Säugerimmunzellen als Abwehrstrategie. Doch auch der pathogene Organismus selbst nutzt wohl zum Teil die schädliche Wirkung der ROS, um den Wirt anzugreifen. So gibt es deutliche Hinweise, dass zumindest zu Beginn einer Infektion von *M. griseae* (dem Erreger des Reisbrandes) nicht die Pflanze sondern der Pilz die einzige ROS-Quelle darstellt. Ob ROS innerhalb der Zelle Schaden anrichten oder regulativ wirken, hängt von ihrer Konzentration ab (Gessler *et al.*, 2007). Besonders pathogene Organismen, die zusätzlich den ROS des Wirts ausgesetzt sind oder selbst ROS gezielt einsetzen, müssen über effiziente und gut regulierte Abwehrmechanismen verfügen, um die ROS stets in den richtigen Konzentrationen zu halten. Pilze verfügen zu diesem Zweck über eine Vielzahl von Antioxidantien. Dabei handelt es sich zum einen um Enzymsysteme wie die Superoxiddismutasen, Katalasen, Glutathionperoxidasen, Glutathionreduktasen, Thiolperoxidasen, Thioredoxine, Glutaredoxine, Peroxyredoxine, Sulfiredoxine oder um alternative Oxidasen. Zum anderen gibt es auch nicht-enzymatische Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Glutathione, Metallothionine, Karotenoide und Melanine (Gessler *et al.*, 2007).

Diese verschiedenen Abwehrstrategien können beispielsweise während der Virulenz eines pathogenen Organismus von großer Wichtigkeit sein und sind zu einem großen Teil bis heute unzureichend untersucht. So sind im Genom von *A. fumigatus*, wie man seit Veröffentlichung der Genomsequenz (Niermann *et al.*, 2005) weiß, vier potentielle Superoxiddismutasen kodiert. Zwei dieser Enzyme sind Mn-abhängig, ein drittes Cu/Zn-abhängig (EAL91677; GI:66851351) und das vierte möglicherweise Fe-abhängig (EAL88576; GI: 66848247). Davon war bei Beginn dieser Arbeit nur eine MnSOD genauer charakterisiert worden. Es handelt sich dabei um das Aspergillus-Allergen Asp6 (EAL90786; GI: 66850459) (Crameri und Blaser, 1995). Dieses Antigen kann für diagnostische Zwecke zur Unterscheidung einer ABPA oder einer allergischen Reaktion herangezogen werden. Spezifische IgE-Antikörper gegen das Allergen können nur in ABPA-Patienten gefunden werden, da Asp6 nur in den Hyphen gebildet wird (Hemmann *et al.*, 1999; Schwienbacher *et al.*, 2005). Im Allgemeinen wird Asp6 in der Literatur als die mitochondriale MnSOD von *A. fumigatus* bezeichnet (Rementeria *et al.*, 2005), obwohl es dafür

keine experimentellen Daten gibt. Normalerweise finden sich MnSODs im Cytosol von Prokaryoten und in der mitochondrialen Matrix von Eukaryoten (Fridovich, 1995). In selteneren Fällen wurden sie auch im Cytosol von Eukaryoten nachgewiesen (Kitayama und Togasaki 1995; Lamarre *et al.*, 2001). Nachdem im Genom von *A. fumigatus* noch eine weitere potentielle MnSODs (EAL89634; GI:66849306) kodiert ist, stellte sich die Frage, welches dieser beiden Enzyme in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Laut einer Sequenzanalyse scheint Asp6 über kein Mitochondrien-Sortierungssignal zu verfügen. Die zweite MnSOD dagegen enthält wohl eine N-terminale, 33 Aminosäuren lange Signalsequenz, die wohl an der 34. Aminosäure abgeschnitten wird. Die Sequenzanalysen deuten also eher darauf hin, dass es sich nicht bei Asp6 sondern bei der zweiten MnSOD um das mitochondriale Enzym handelt. Um diese Vorhersagen experimentell zu bestätigen, wurden zuerst monoklonale Antikörper gegen die zweite MnSOD hergestellt. Gegen Asp6 waren schon zu einem früheren Zeitpunkt monoklonale Antikörper generiert worden (Schwienbacher, 2005). Zunächst wurde sichergestellt, dass die neu hergestellten Antikörper gegen die putative MnSOD auch in Proteinextrakten von *A. fumigatus* spezifisch reagieren. Durch die hohe Sequenzhomologie, die MnSODs im Allgemeinen untereinander aufweisen, könnte ein Antikörper, der sein Erkennungs-Epitop in einem homologen Bereich hat, durchaus unterschiedliche MnSODs erkennen. Ein Western-Blot, der sowohl mit dem α Asp6-Antikörper BM1 A12 als auch mit dem α -mMnSOD Antikörper P118 A7 behandelt wurde, konnte eindeutig zeigen, dass die beiden Antikörper jeweils spezifisch ein Protein erkennen und somit keine Kreuzreaktion der Antikörper mit dem jeweils anderen Protein vorliegt. Mit diesen molekularen Werkzeugen konnte nun als erstes der Frage nachgegangen werden, ob die MnSOD mit putativem Mitochondrien-Sortierungssignal tatsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Bereits in den ersten Western-Blot-Analysen ergaben sich Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation. Während das vom α Asp6-Antikörper erkannte Protein etwa der vorhergesagten Größe von 23,4 kDa entsprach, war die putative mitochondriale MnSOD entgegen der Erwartung nicht 25,2 kDa groß, sondern deutlich kleiner als Asp6. Geht man davon aus, dass das putative Sortierungssignal tatsächlich als Sortierungssignal dient und demzufolge auch abgeschnitten wird, stimmt die tatsächlich erhaltene Größe des Proteins wieder mit der Erwartung überein: Die abgeschnittenen 33 Aminosäuren entsprechen etwa 3,7 kDa. Die putative MnSOD wäre dann, nachdem das Sortierungssignal abgeschnitten wurde, statt 25,2 kDa nur 21,5 kDa groß. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die putative mitochondriale MnSOD sowohl in Sporen- als auch in Hyphenextrakten nachgewiesen werden kann. Für Asp6 dagegen konnte die bereits früher gezeigte (Schwienbacher, 2005) differentielle hyphenspezifische Expression bestätigt werden. Auch dieses Expressionsverhalten spricht eher für eine mitochondriale Lokalisation der MnSOD mit putativer Signalsequenz als für Asp6. In dieser Arbeit wurde bereits an anderer Stelle gezeigt, dass die Atmung ein sehr frühes Ereignis während der Auskeimung (Taubitz *et al.*, 2005)

darstellt. Durch die Atmungskette werden also schon zu einem frühen Zeitpunkt der Germination ROS gebildet, die entgiftet werden müssen. Somit kann man davon ausgehen, dass die mitochondriale MnSOD bereits in den Sporen benötigt wird und auch vorhanden ist. Neben diesen Hinweisen sprechen auch die Ergebnisse einer differentiellen Zentrifugation für eine mitochondriale Lokalisation der MnSOD mit putativer Signalsequenz. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g wurde das Protein durch den Antikörper im Sediment nachgewiesen. Bereits bei diesem Zentrifugationsschritt sollten neben den Zellkernen, dem Cytoskelett, den Lysosomen und den Peroxisomen die Mitochondrien sedimentieren (Koolman und Röhm, 2002). Im Sediment einer weiteren Zentrifugation bei 43500 g wurde das Protein nicht nachgewiesen. Entgegen der Erwartung wurde die putative MnSOD in beiden Überständen der Zentrifugationen gefunden. In diesen Überständen sollten sich folgende Zellbestandteile wiederfinden lassen: Plasmamembranteile, Fragmente des Endoplasmatischen Retikulums, kleine Vesikel, Mikrosomen, Ribosomen, Zytoplasma und Makromoleküle. Die Tatsache, dass ein Teil der putativen MnSOD bereits bei 15000 g sedimentierte, spricht deutlich dafür, dass dieses Enzym in größeren Zellkompartimenten, wie zum Beispiel dem Mitochondrium, lokalisiert ist. Der zusätzliche Nachweis des Proteins in den Überständen lässt sich durch die Herstellungsmethode der Proteinextrakte erklären. Das Myzel wurde zunächst in Anwesenheit von flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend in einem Schüttelhomogenisator durch Glaskugeln zertrümmert. Bei dieser Methode wird sicherlich ein Großteil der Mitochondrien zerstört. Dadurch würde unter anderem die putative MnSOD freigesetzt werden und somit als Makromolekül auch nach einer Zentrifugation bei einer hohen g-Zahl im Überstand verbleiben. Um die tatsächliche Lokalisation der putativen mitochondrialen MnSOD im Mitochondrium unabhängig zu bestätigen, wurde die Funktionalität des putativen Mitochondrien-Sortierungssignals nachgewiesen. Durch die Herstellung eines *A. fumigatus*-Stammes, der die ersten 37 N-terminalen Aminosäuren der putativen MnSOD als Fusionsprotein mit GFP bildet, gelang ein mikroskopischer Nachweis der Lokalisation. Im Vergleich mit einem anderen *Aspergillus*-Stamm, der ein höchstwahrscheinlich cytosolisches Protein als GFP-Fusionsprotein bildet, zeigte sich eine unterschiedliche Lokalisation. Das mit GFP fusionierte cytosolische Protein ist sowohl in den Sporen als auch in den Hyphen gleichmäßig verteilt. Die Fusion des GFP mit der putativen Signalsequenz dagegen führt zu einer distinkten Verteilung des Proteins innerhalb der Sporen. Es scheint in runden Strukturen vorzuliegen, die sich innerhalb der Spore ringförmig formieren. Dieses Verteilungsmuster entspricht der tatsächlichen Lokalisation der Mitochondrien innerhalb der Sporen, wie in einem unabhängigen Versuch durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs *Mitotracker red CM H2X-ROS* gezeigt wurde. In den Hyphen verursacht die Signalsequenz eine eher netzartige Lokalisation des GFP. Hier zeigte sich ebenfalls im Vergleich mit einem *Aspergillus*-Stamm, der ein mitochondriales Protein als GFP-Fusion bildet, ein ähnliches Lokalisationsverhalten. Da Mito-

chondrien in *S. cerevisiae* und zahlreichen filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* und *N. crassa* bekanntlich als dynamisches Netzwerk in den Hyphen vorliegen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994; Westermann und Prokisch 2002), sprechen die hier gemachten Beobachtungen für eine mitochondriale Lokalisation des GFP. Das putative Mitochondrien-Sortierungssignal führt also tatsächlich zu einer mitochondrialen Lokalisation des GFP und verhilft somit der MnSOD *in vivo* zum Import in die Mitochondrien-Matrix. In dieser Arbeit konnte unter Verwendung spezifischer Antikörper zum ersten Mal gezeigt werden, dass in *A. fumigatus* tatsächlich beide im Genom kodierten MnSODs gebildet werden. Weiterhin konnte die durch Sequenzanalysen vorhergesagte mitochondriale Lokalisation der zweiten MnSOD experimentell bestätigt werden. Damit handelt es sich bei dem Allergen Asp6 anders als bisher allgemein angenommen nicht um die mitochondriale MnSOD, sondern um ein cytosolisches Protein.

Nach Klärung der Lokalisation sollte eine Aussage über die Struktur der mitochondrialen MnSOD gemacht werden. Prokaryotische MnSODs liegen normalerweise als Dimer in der Zelle vor, während die eukaryotischen MnSODs als Tetramer vorliegen (Borgstahl *et al.*, 1992). Ausnahmen hiervon stellen die tetramerischen MnSODs von *Thermus thermophilus* und *Thermus aquaticus* dar (Sato und Harris 1977; Sato und Nakazawa 1978). Von den zu diesem Zeitpunkt genauer charakterisierten 14 MnSODs aus filamentösen Pilzen bilden zwölf ein Homotetramer und zwei ein Homodimer (Jeong *et al.*, 2001; Jacob *et al.*, 2001). Von den beiden Homodimeren ist eines ein cytosolisches Protein (*Schizosaccharomyces pombe*) und das andere eine mitochondriale MnSOD (*Paxillus involutus*). Durch eine Strukturaufklärung konnte gezeigt werden, dass auch Asp6 aus *A. fumigatus* ein Homotetramer bildet (Flückiger *et al.*, 2002). Wie in allen anderen bekannten räumlichen MnSOD-Strukturen wird der Metall-Ligand von drei Histidinen, einem Aspartat-Rest und einem Wasser-Molekül koordiniert. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen dafür, dass die mitochondriale MnSOD als Dimer in der Zelle vorliegt. Mit Gelfiltrationsanalysen konnte auch ein Trimer nicht ausgeschlossen werden. *Crosslinking*-Studien wiesen zusätzlich zum Monomer eine Doppelbande knapp unterhalb der 50-kDa-Markerbande auf, die der Größe nach (43 kDa) einem Dimer entspricht. Die Bildung einer Doppelbande wird höchst wahrscheinlich durch eine unterschiedliche Verknüpfung der Monomere durch den *Crosslinker* verursacht. Vor dem Hintergrund bekannter Daten zur Struktur eukaryotischer MnSODs scheint es also nicht unwahrscheinlich, dass die mitochondriale MnSOD von *A. fumigatus* tatsächlich als Dimer vorliegt. Die hier durchgeführten Versuche können nicht ganz ausschließen, dass das Enzym als Tetramer vorliegt, das unter den gewählten Versuchsbedingungen zu zwei Dimeren zerfällt. Allerdings wurden die für das *Crosslinking* verwendeten Proteinextrakte zur Kontrolle auch mit einem anderen, nämlich gegen die ribosomalen Proteine P0, P1 und P2 gerichteten Antikörper behandelt. In diesem Fall konnte der in der Literatur be-

schriebene, von den drei Proteinen gebildete Komplex dargestellt werden (Santos und Ballesta, 2002). Damit konnte also die Verlässlichkeit der hier durchgeführten *Crosslinking*-Studien bestätigt werden. Superoxiddismutasen sind äußerst stabile Enzyme, die sogar bis zu einer Minute bei 100° C ihre Aktivität bewahren. Außerdem sind sie auch unempfindlich gegenüber pH-Wert Schwankungen (Gessler *et al.*, 2007). Diese Stabilität macht ein Zerfallen des Tetramers zu zwei Dimeren unwahrscheinlicher. Eine genaue Aussage kann hier jedoch nur eine Strukturaufklärung des Enzyms liefern.

Die mitochondriale MnSOD aus *S. cerevisiae* spielt nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle für das Überleben der Hefe in der stationären Phase (Longo *et al.*, 1999). Eine Hefe-Mutante, die über keine mitochondriale MnSOD verfügt, ist sensibel gegenüber 100% Sauerstoff, wächst schlecht auf Ethanol und stirbt in der stationären Phase deutlich schneller ab als der Wildtyp. Unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit von Glukose zeigt sie dagegen keinen auffälligen Phänotyp. Darum sollte auch in dieser Arbeit die Rolle der mitochondrialen MnSOD von *A. fumigatus* in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden. Dafür wurden Kulturen von *A. fumigatus* nach unterschiedlichen Wachstumszeiträumen (16, 20, 24, 28, 48, 60 h) zu Proteinextrakten verarbeitet und auf das Vorhandensein der mitochondrialen MnSOD untersucht. Die MnSOD konnte nach 16, 20, 24 und 28 Stunden deutlich in jeweils gleichen Mengen nachgewiesen werden. Nach 48 und 60 Stunden waren sogar noch größere Mengen des Enzyms in den Proteinextrakten vorhanden. Schon nach 28 Stunden befindet sich eine Pilzkultur, unter den gewählten Versuchsbedingungen in der stationären Phase, wie in einer Feuchtgewichtsbestimmung des Myzels gezeigt wurde. Nach einer Wachstumszeit von 48 und 60 Stunden nimmt das Feuchtgewicht der Pilzkultur wieder ab, sie befindet sich also in der Absterbephase. Dies wird auch in den mit Coomassie gefärbten SDS-Gelen der Proben deutlich. Die Extrakte dieser späten Zeitpunkte enthalten deutlich geringere Proteinkonzentrationen als die früheren Werte. Dies spricht zusätzlich dafür, dass bereits eine Zersetzung der Hyphen begonnen hat. Die Tatsache, dass die mitochondriale MnSOD zu diesen späten Zeitpunkten in verstärktem Maße nachgewiesen wird, spricht dafür, dass das Enzym auch in *A. fumigatus* während der späten stationären Phase und der Absterbephase eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin deutet es auf die bekannte Verknüpfung zwischen der Bildung von radikalen Sauerstoffspezies und der Alterung hin (Ames *et al.*, 1995). Diese Beobachtung wird durch eine aktuelle Untersuchung der *A. fumigatus* SODs bestätigt. Die Autoren wiesen mithilfe einer Real-Time-PCR eine gesteigerte Genexpression der mitochondrialen MnSOD zu späten Wachstumszeitpunkten (30 h) nach (Lambou *et al.*, 2010).

Wie bereits oben erwähnt, können von den auskeimenden Sporen sekretierte ROS zur Autoregulation der Sporenentwicklung in Abhängigkeit der Animpfdichte beitragen (Gessler *et al.*, 2007). In einem hier durchgeführten Versuch sollte geklärt werden, ob die Kulturdichte auch in der

exponentiellen Wachstumsphase eine Auswirkung auf die Menge der mitochondrialen MnSOD hat. Eine vermehrte Bildung des Enzyms könnte dann auf eine erhöhte Konzentration des Superoxidanions zurückzuführen sein, das durch Autoregulationsmechanismen durch den Pilz selbst ausgeschüttet wurde. Alle fünf zum Animpfen verwendeten Sporenkonzentrationen führten zur Bildung vergleichbarer Mengen der mitochondrialen MnSOD. Die Menge der gebildeten mitochondrialen MnSOD hängt somit nicht von der Kulturdichte ab.

Die Atmungskette in den Mitochondrien stellt die Hauptquelle endogen produzierter Superoxid-anionen dar (Droge, 2002). Obwohl dieses Radikal auch spontan zerfallen kann, spielt die mitochondriale MnSOD bei der schnellen Katalyse des Superoxidanions zu Wassertoffperoxid und Wasser eine essentielle Rolle und ist somit wichtigster Bestandteil der oxidativen Abwehrstrategie der Mitochondrien. Deswegen wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Superoxidanionen eine Auswirkung auf die Bildung von Aspf6 oder der mitochondrialen MnSOD haben. Die dazu verwendete Chemikalie Menadion führt *in vivo* zur Bildung von Superoxidanionen (Powis, 1989). Die Wichtigkeit der mitochondrialen MnSOD zur Entgiftung der durch Menadion produzierten Superoxidanionen konnte bereits in verschiedenen Pilzen gezeigt werden. Deletionsmutanten der mitochondrialen MnSOD reagierten sowohl in *Candida albicans* (Hwang *et al.*, 2003) als auch in *C. neoformans* (Narasipura *et al.*, 2005) sehr sensitiv gegenüber geringen Mengen Menadion (3 µg/ml; 50 µM). In *Penicillium chrysogenum* genügten 0,5 mM Menadion, um die spezifische Aktivität der MnSOD und Cu,ZnSOD zu erhöhen (Emri *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Menadion-Konzentrationen (2,5 mM, 10 mM, 40 mM) orientierten sich an einer Studie mit *S. cerevisiae* (Cabiscol *et al.*, 2000). Die höchste verwendete Menadion-Konzentration (40 mM) sollte bereits zu oxidativen Schäden innerhalb der Zelle führen und den Pilz unter enormen oxidativen Stress setzen. Aspf6 wurde in Anwesenheit aller Menadion-Konzentrationen in vergleichbaren Mengen gebildet. Die mitochondriale MnSOD dagegen zeigte einen leichten Anstieg in Anwesenheit von 40 mM Menadion. Diese nur leichte Reaktion auf hohe Menadion-Konzentrationen könnte damit zusammenhängen, dass *A. fumigatus* vier verschiedene SODs besitzt, auf die sich die Entgiftung des Superoxidanions verteilt. Zumindest für *C. neoformans* konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Deletionsmutante der Cu,ZnSOD (SOD1) sehr sensibel auf geringe Mengen Menadion reagiert (Narasipura *et al.*, 2003). Damit spielen in diesem Organismus sowohl die SOD1 als auch die SOD2 eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des durch Menadion verursachten Stress. Zudem ist bekannt, dass in *A. fumigatus* schon geringe Mengen Menadion (0,5 mM) die Expression der mitochondrialen alternativen Oxidase (AOX) induzieren (Magnani *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um eine Ubiquinol-Oxidase, die in den Mitochondrien von Pflanzen, einigen Pilzen und Protisten vorkommt. Sie katalysiert eine Cyanid-resistente Reduktion von Sauerstoff zu

Wasser. Der Elektronenfluss zweigt dabei vom klassischen Weg auf der Ebene des Ubiquinon-Pools ab und es kommt zu einer direkten Reduktion von Sauerstoff ohne eine Translokation von Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Somit arbeitet die AOX nicht energiekonserzierend (Vanlerberghe *et al.*, 1997; Berthold *et al.*, 2000). Unter bestimmten Stressbedingungen, wie etwa oxidativem Stress, kann *A. fumigatus* die AOX-Expression induzieren und sowohl die Cytochrom C Oxidase als auch die alternative Oxidase nutzen (Tudella *et al.*, 2004). Durch die AOX kann eine zusätzliche Bildung von ROS verhindert werden, da sie den Ubiquinon-Pool oxidiert hält und somit eine Autooxidation der Quinone verhindert. Dies ist zum einen wichtig, wenn der Elektronen-Transport über den Cytochrom C Weg limitierend wird (Wagner und Moore, 1997), und zum anderen als Antwort auf einen oxidativen *Burst* während der Abwehr von Säugerzellen gegen Eindringlinge (Helmerhorst *et al.*, 2005). Die mitochondriale MnSOD von *A. fumigatus* scheint also durchaus bei der Eliminierung von Superoxidanionen eine wichtige Rolle zu spielen. Insgesamt aber ist sie in Antwort auf eine solche Stresssituation nur ein Teil der Abwehrstrategie des Pilzes.

Die Entgiftung des Superoxidanions durch die SODs führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Auch dieses Stoffwechselprodukt ist für die Zelle in zu hohen Konzentrationen toxisch und muss durch Katalasen unschädlich gemacht werden. In einem weiteren Versuch wurde die Stabilität der beiden MnSODs von *A. fumigatus* in Antwort auf hohe Wasserstoffperoxidkonzentrationen getestet. Die verwendeten Konzentrationen (30 mM, 125 mM, 500 mM) wurden dabei so gewählt, dass man von einer oxidativen Schädigung der Zelle ausgehen kann. Bereits die mit Coomassie gefärbten SDS-Gele zeigen eine deutliche Abnahme der Proteinmenge in Antwort auf die steigenden Wasserstoffperoxidkonzentrationen. Der Pilz scheint also durch den erheblichen oxidativen Stress bereits so stark beeinträchtigt zu werden, dass es zu einer Proteinzersetzung und zu einer Zerstörung des Myzels kommt. Western-Blot-Analysen zeigten, dass Asp6 in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid sehr stabil ist. Das Protein konnte auch in Anwesenheit der höchsten Wasserstoffperoxidkonzentrationen, wenn auch etwas schwächer, nachgewiesen werden. Die mitochondriale MnSOD dagegen war nur bei Verwendung der niedrigsten Wasserstoffperoxidkonzentration in abgeschwächter Form detektierbar. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Studie, in der die Proteinschädigung von *S. cerevisiae* in Antwort auf oxidativen Stress untersucht wurde (Cabiscol *et al.*, 2000). Oxidativer Stress, der durch H₂O₂ verursacht worden war, führte hier hauptsächlich zur Schädigung mitochondrialer Proteine. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass durch eine Inaktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels nicht noch zusätzliche ROS produziert werden.

Aus Zeitgründen konnten viele interessante, die mitochondriale MnSOD betreffende Fragestellungen nicht mehr bearbeitet werden. So zeigen etwa verschiedene Mutantenstudien in *C. albi-*

cans (Hwang *et al.*, 2003), dass der mitochondrialen MnSOD unter verschiedensten Stressbedingungen wie erhöhter Temperatur, 6% Ethanol oder hyperoxische Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle zukommt. Außerdem moduliert das Enzym die Aktivität der AOX-Expression. Auch in *C. neoformans* (Narasipura *et al.*, 2005) spielt die mitochondriale MnSOD eine wichtige Rolle beim Wachstum in Anwesenheit erhöhter Temperaturen oder unter Nährstofflimitierung. Eine Deletionsmutante der mitochondrialen MnSOD zeigte sich im Virulenzmodell aufgrund des erschwerten Wachstums bei 37° C avirulent (Giles *et al.*, 2005). In einer neueren Studie mit *A. fumigatus* wurde nach Transkripten gesucht, die in Sporen oder Hyphen in Anwesenheit von humanen Neutrophilen verstärkt abgelesen werden. Dabei zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die cytosolische MnSOD (Aspf6) induziert wurde (Sugui *et al.*, 2008). Dieses Enzym scheint also bei der Abwehr des oxidativen Bursts beteiligt zu sein und spielt damit möglicherweise eine wichtige Rolle in der Virulenz des Pilzes. Neuste Untersuchungen aus *A. fumigatus* sprechen aber gegen eine Beteiligung der beiden MnSODs und der Cu/ZnSOD bei der Abwehr des oxidativen Bursts. Eine hergestellte Tripelmutante zeigte in dieser Studie kein verändertes Virulenzverhalten (Lambou *et al.*, 2010). Insgesamt stellen die hier durchgeführten Versuche eine Grundlage für weiterführende Arbeiten dar.

3. Die Rolle der Atmung während der Auskeimung

Die meisten Pilze sind obligat aerob oder fakultativ aerob. Generell wird davon ausgegangen, dass die Anwesenheit von Sauerstoff für die Auskeimung von Sporen essentiell ist (Carlile *et al.* 2001). So wurde eine Abhängigkeit der Auskeimung von einer funktionellen Atmungskette sowohl für *N. crassa* als auch für *Botryodiplodia theobromae* nachgewiesen (Brambl, 1975; Stade und Brambl, 1981). Auch *A. fumigatus* gilt als aerober Organismus. Allerdings wurde die Rolle von Sauerstoff bei der Auskeimung vor dieser Arbeit nicht untersucht. In seinen natürlichen Habitaten (wie zum Beispiel der Erde, aber auch im menschlichen Körper) können durchaus auch sauerstofflimitierende Bedingungen auftreten, an die sich der Pilz möglicherweise angepasst hat. Es wäre für einen solchen Organismus von großem Vorteil, auch in Umgebungen mit geringen Sauerstoffkonzentrationen oder mit Sauerstoffmangel überleben oder wachsen zu können. Solche Anpassungen sind bei filamentösen Pilzen bereits beschrieben worden. So verfügen etwa *A. nidulans* und *F. oxysporum* (Takasaki *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2002) über die Fähigkeit, in anaeroben Umgebungen Ammonium zu fermentieren. Dabei handelt es sich um einen neu identifizierten metabolischen Mechanismus, bei dem die dissimilatorische Reduktion von Nitrat zu Ammonium mit der katabolischen Oxidation des Elektronendonors Ethanol zu Acetat

verknüpft wird (Takasaki *et al.*, 2004). Somit gewinnt der Organismus durch Substratkettenphosphorylierung Energie. In derselben Studie wurde ein limitiertes anaerobes Wachstum von *A. nidulans* auch in Abwesenheit von Ammonium gezeigt, was darauf hindeutet, dass es in diesem Organismus noch weitere metabolische Varianten für anaerobes Wachstum geben muss. Schon früher war gezeigt worden, dass *A. nidulans*, der zu der Zeit noch als obligat aerob galt, längere Zeiten in einer anaeroben Umgebung durch die Fermentation von Pyruvat zu Ethanol überdauern konnte (Lockington *et al.* 1997). Inzwischen ist die früher lange vorherrschende Meinung, dass filamentöse Pilze fast ausschließlich strikt aerob leben können, wiederlegt. So wurden bis heute in filamentösen Pilzen einige andere Stoffwechsel-Anpassungen an anaerobe Umgebungen nachgewiesen, wie z. B. die Denitrifikation von Nitrat oder Nitrit, die Reduktion von Stickstoffmonooxyd oder die Fermentation von Ammonium (Takaya, 2009).

Die Auskeimung ist ein Schlüsselereignis im Lebenszyklus von *A. fumigatus* und zudem ein entscheidender Schritt während der Etablierung einer invasiven Aspergillose. Da die Gegebenheiten in der Lunge einen aeroben Stoffwechsel fördern, wird davon ausgegangen, dass *A. fumigatus* in der Lunge aerob wächst, obwohl dies bislang nicht untersucht wurde. Außerdem wäre es auch vorstellbar, dass inhalierte Konidien in Makrophagen in einer Art Ruhezustand überleben und anschließend durch die Phagozyten in andere Gewebe verbreitet werden, in denen Sauerstoff auch limitiert sein könnte.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Auskeimung von Pilzsporen stattfindet, sobald geeignete Nährstoffe, Wasser und Sauerstoff vorhanden sind (Osharov und May, 2001). Die ruhenden Sporen von *A. fumigatus* werden von einer hydrophoben Schicht, die hauptsächlich aus Proteinen besteht, ummantelt (Paris *et al.*, 2003). Diese Schicht ist auch für die typische mit Zacken versehene Oberflächenstruktur der Sporen verantwortlich. In Mutanten-Stämmen führt der Verlust dieser Schicht zu einer glatten Sporenoberfläche und die Zersetzung der hydrophoben Schicht ist ein früher Schritt der Auskeimung und Infektion (Tronchin *et al.*, 1995; Rohde *et al.*, 2002). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die daraus resultierenden Sporen mit glatter Oberfläche Kohlenhydrat-Antigene der Zellwand exponieren (Luther *et al.*, 2006). Die Verklumpung von auskeimenden Sporen scheint durch diese freiliegenden Kohlenhydrate verursacht zu werden (Tronchin *et al.*, 1995). Innerhalb der Sporen kommt es anschließend zur Mobilisierung von Trehalose. Der gleichzeitige Anstieg des osmotischen Drucks innerhalb der Spore führt vermutlich zum Wachstum der Sporen und somit zur Bildung der angeschwollenen Sporen (d'Enfert, 1997). Das Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es, grundlegende Bedürfnisse der Auskeimung von *A. fumigatus* genauer zu untersuchen. Schon zu einem früheren Zeitpunkt wurde für *A. nidulans* gezeigt, dass eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid die Auskeimung der Sporen vollständig verhindert (Osharov und May, 2001).

Durch die Verwendung verschiedener Cycloheximid-Konzentrationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch in *A. fumigatus* die Inhibierung der Proteinbiosynthese die Auskeimung verhindert. Hohe Cycloheximid-Konzentrationen verhinderten die Auskeimung vollständig, wohingegen mittlere Konzentrationen ein Anschwellen der Sporen nicht verhindern konnten. Aber auch in diesem Fall wurde die Bildung von Keimschläuchen blockiert. Daraus folgt, dass die Proteinbiosynthese auch in *A. fumigatus* für den gesamten Auskeimungsprozess notwendig ist. Die hohen Konzentrationen des Inhibitors werden wohl benötigt, um die hydrophobe Schutzschicht der ruhenden Sporen zu durchdringen.

Durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, der nur aktive Mitochondrien anfärbt, konnten in dieser Arbeit aktive Mitochondrien bereits in angeschwollenen Konidien nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Aktivierung der Atmungskette während der Auskeimung einen sehr frühen Schritt darstellt. In Übereinstimmung damit wurde ein signifikanter Verbrauch von Sauerstoff in Pilzkulturen in YGr-Medium bereits vier Stunden nach dem Animpfen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt stellen unter den gewählten Versuchsbedingungen angeschwollenen Konidien den dominanten Morphotyp dar.

In Experimenten, in denen *A. fumigatus* unter aeroben oder anaeroben Bedingungen gewachsen war, wurde der absolute Bedarf von Sauerstoff für die Auskeimung und das Hyphenwachstum noch deutlicher. Anoxische Bedingungen verhinderten die Bildung von sichtbaren Kolonien auf Agarplatten sowie das Wachstum von Hyphen. Konidien, die in flüssigem Medium für 70 Stunden unter anaeroben Bedingungen inkubiert wurden, blieben im ruhenden Zustand ohne anzuschwellen. Somit scheint also auch der Prozess des Anschwellens von Sauerstoff abhängig zu sein. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass die Sporen die Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung wahrnehmen können. Insgesamt wurde in diesen Versuchen kein Hinweis auf ein anaerobes Wachstum von *A. fumigatus* gefunden. Auch in Anwesenheit von Nitrat und Ethanol fand kein anaerobes Wachstum von *A. fumigatus* statt. Damit scheint sich *A. fumigatus* in dieser Hinsicht von *A. nidulans* zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass die Atmung für die Auskeimung von *A. fumigatus* unter den untersuchten Bedingungen notwendig ist.

Es besteht die Möglichkeit, dass der Pilz während der Virulenz hypoxischen Bedingungen ausgesetzt ist. Bisher wurden noch keine Messungen des O₂-Gehalts in Geweben mit einer *A. fumigatus*-Infektion durchgeführt. Bei der Kolonisierung der Lunge durch *A. fumigatus* im immungeschwächten Patienten kommt es zur Zerstörung des Gewebes und zu erheblichen Entzündungsreaktionen (Inflammation). In anderen Zusammenhängen konnte vor längerem gezeigt werden, dass an Stellen, an denen eine Inflammation auftritt, ein niedriger Sauerstoffgehalt (Hypoxia)

vorherrschte. Außerdem wurde ein niedriger Sauerstoffgehalt in vielen Kompartimenten von entzündetem aber auch normalem Gewebe gefunden (Matherne *et al.*, 1990; Van Belle *et al.*, 1987; Dewhirst 1998). Die Beobachtung, dass Sporen von *A. fumigatus*, die unter ein Deckgläschen gefallen waren, in flüssigem Medium unter anaeroben Bedingungen auskeimten, blieb auch bei Verwendung unterschiedlicher Medien (RPMI, YG₇) unverändert. Allerdings sind in diesem Versuchsansatz die Bedingungen unter dem Deckgläschen weitgehend undefiniert. So ist nicht klar, ob die Flüssigkeitsschicht unter dem Deckglas im „anaeroben Topf“ vollständig anaerob wird oder ob sie geringe Mengen an Sauerstoff enthält. Nachdem in den zuvor durchgeführten Versuchen ein anaerobes Wachstum ausgeschlossen werden konnte, ist davon auszugehen, dass sich in der Flüssigkeitsschicht unter dem Deckgläschen geringe Mengen Sauerstoff befinden, die dem Pilz zum Wachstum genügen. Diese These wird von einer Studie, die während dieser Arbeit veröffentlicht wurde, gestützt. Dabei konnte eine Arbeitsgruppe *A. fumigatus* unter hypoxischen Bedingungen mit einem Sauerstoffanteil von nur 1% problemlos anziehen (Willger *et al.*, 2008). Somit muss *A. fumigatus* in der Lage sein, den Sauerstoffgehalt der Umgebung zu sensieren und sich anschließend an diese Bedingungen anzupassen. Wie inzwischen bekannt ist, ist ein *Sterol-Regulatory Element Binding Protein* (SREBP), nämlich SrbA, für die Anpassung von *A. fumigatus* an einen niedrigen Sauerstoffgehalt (Hypoxia) notwendig (Willger *et al.*, 2008). SREBPs sind eine konservierte Familie von membrangebundenen Transkriptionsfaktoren, die zuerst als Regulatoren des Lipid- und Cholesterin-Stoffwechsels in Säugerzellen identifiziert wurden (Briggs *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Rawson, 2003; Espenshade, 2006). Vor nicht allzu langer Zeit wurde ein SREBP in *Schizosaccharomyces pombe* als Regulator eines neuen Anpassungswegs an Hypoxia gefunden. Die Autoren schlugen vor, dass SREBP und ein *Sterol Cleavage Activating Protein* (SCAP) die sauerstoffabhängige Sterol-Biosynthese als Indikator für den Sauerstoffgehalt kontrollieren (Hughes *et al.*, 2005). Ein zu SREBP orthologes Protein wurde auch in *C. neoformans* nachgewiesen. In diesem Organismus ist der SREBP-Stoffwechselweg unabdingbar für die Anpassung an hypoxische Bedingungen und die Sterol-Biosynthese. Mutanten zeigten sich sehr sensitiv gegenüber den antifungalen Azolen und waren nicht in der Lage, Meningoencephalitis zu verursachen (Chang *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2007). Durch Mutantenstudien in *A. fumigatus* konnte die wichtige Rolle von SREBP auch in filamentösen Pilzen bestätigt werden (Williger *et al.*, 2008). Auch in diesem Organismus ist der Transkriptionsregulator für die Biosynthese der Sterole und die Resistenz gegenüber der antifungalen Stoffklasse der Azole notwendig. Daneben ist SrbA in *A. fumigatus* auch für die Zellpolarität und die Morphogenese der Hyphen notwendig. Eine *srbA*-Deletionsmutante zeigte unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) im Gegensatz zum Wildtyp kein Wachstum. Das zeigt, dass SrbA auch in *A. fumigatus* für hypoxisches Wachstum notwendig ist. Die Avirulenz der Mutante in zwei verschiedenen Maus-Infektionsmodellen erklären die Autoren durch die Unfähigkeit der Mutante, unter hypoxischen Bedingungen zu

wachsen. Damit wäre zum ersten Mal gezeigt, dass die Anpassung an hypoxische Bedingungen eine wichtige Virulenzanpassung für pathogene, filamentöse Pilze darstellt. Ein Transkriptionsprofil identifizierte 87 Gene, die durch den Verlust der SrbA-Funktion betroffen sind. Im Gegensatz zu *S. pombe* und *C. neoformans* wurden in dieser Studie keine Gene mit Annotation entdeckt, die den Grund der Anpassung an die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in *A. fumigatus* erklären. Somit scheinen sich die Anpassungsstrategien an Hypoxia von filamentösen Pilzen und Hefen deutlich zu unterscheiden. Das Gen mit der höchsten Veränderung der Expression im Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante war eine Nicht-Ribosomale Peptid-Synthetase (NRPS1 oder *pes1*). Möglicherweise sind also die nicht identifizierten Peptide, die durch NRPS1 produziert werden, für die Anpassung an Hypoxia zuständig. Schon früher war gezeigt worden, dass NRPS1 in *A. fumigatus* für die Anpassung an oxidativen Stress nötig ist (Reeves *et al.*, 2006). Die SrbA-Nullmutante zeigte allerdings keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress (Williger *et al.*, 2008). Auch die genaue Regulation und Aktivierung von SrbA ist bisher noch unbekannt. Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung des hypoxischen Wachstums wurde also durch andere Studien bestätigt.

Zusammenfassung

Vor Beginn dieser Arbeit war ein *A. fumigatus*-Protein (Chp: CipC homologes Protein) mit unbekannter Funktion und hoher Homologie zum CipC-Protein aus *A. nidulans* als prominentes hyphenspezifisches Protein identifiziert worden (Schwienbacher, 2005). Weiterhin gab es zu diesem Zeitpunkt Hinweise, dass ein zu CipC homologes Protein in *C. neoformans* eine wichtige Rolle während der Virulenz spielt (Steen *et al.*, 2003). In dieser Arbeit sollte die biologische Funktion des pilzspezifischen Proteins genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper gegen Chp, mehrere Reporterstämme sowie eine Deletionsmutante hergestellt.

Die erhobenen Daten zeigen, dass Chp als Monomer im Cytosol der Hyphen vorliegt. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung eines GFP-Fusionsproteins innerhalb der Hyphen; nur die Vakuolen schienen ausgespart. Die Identifikation des Proteins auf der Sporenoberfläche von *A. fumigatus* (Asif *et al.*, 2006) wurde wiederlegt und die differentielle Expression des Proteins bestätigt. Anders als in *A. nidulans* (Melin *et al.*, 2002) wirkt das Antibiotikum Concanamycin A auf die Bildung von Chp in *A. fumigatus* nicht induzierend. Da diese Tatsache sowohl für die Namensgebung von CipC, als auch für die Namensgebung von Chp verantwortlich war, sollte das *A. fumigatus*-Protein umbenannt werden. Die Wahl des Namens fiel auf NrpA (*Nitrogen regulated protein A*), da die Bildung des Proteins von der N-Quelle abhängig ist. Die N-abhängige Regulation war für ein homologes *F. fujikuroi* Gen auf RNA-Ebene bereits bekannt (Teichert *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte sie in *A. fumigatus* und erstmals auf Proteinebene bestätigt werden. Desweiteren wurden auch neue N-Quellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass NrpA in Anwesenheit der N-Quellen Glutamat, Nitrat oder Harnstoff nicht gebildet wird, wohingegen Komplexmedien sowie die N-Quellen Ammonium, Glutamin, Asparaginsäure, Asparagin, Valin und Tryptophan zur Bildung des Proteins führen. In Kombination einer induzierenden und einer unterdrückenden N-Quelle dominiert stets die induzierende. In Reporterstämmen (*gfp*; *lacZ*) fand diese negative Regulation der Bildung von NrpA nicht statt. Das Protein wurde sowohl in Anwesenheit einer normalerweise unterdrückenden N-Quelle, als auch in den Sporen gebildet. Weiterhin nimmt die gebildete Menge von NrpA sowohl bei längeren Inkubationszeiten, als auch bei Verwendung höherer Animpfdichten zu. Wird der Pilz zunächst mit einer die NrpA-Bildung unterdrückenden N-Quelle angezogen und dann in Medium mit einer induzierenden N-Quelle umgesetzt, dauert es 6 h bis eine Bildung von NrpA verzeichnet werden kann. Diese Zeitspanne blieb auch in einem inversen Experiment gleich. Als nächstes wurde untersucht, ob NrpA in *A. fumigatus* unter Stressbedingungen von Bedeutung ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl osmotischer Stress, als auch oxidativer Stress, der durch Menadion verursacht wird, kei-

ne Auswirkung auf die gebildete NrpA-Menge hat. Dagegen führt durch H₂O₂ verursachter Stress zu einem veränderten Laufverhalten von NrpA in SDS-Gelen. Das Protein scheint unter diesen Umständen ein höheres Molekulargewicht zu haben. Mithilfe eines *A. fumigatus*-Reporterstammes, der ein NrpA-GFP-Fusionsprotein bildet, konnte gezeigt werden, dass H₂O₂ auch zu einer veränderten Lokalisation von NrpA führt. Das sonst gleichmäßig in den Hyphen verteilte Protein formierte sich in punktförmigen Strukturen. Auch unter Mangelbedingungen spielt NrpA keine wichtige Rolle, denn weder ein C- noch ein N-Mangel verändert die gebildete Menge des Proteins. Dient die normalerweise die NrpA-Bildung induzierende N-Quelle Glutamin als C- und N-Quelle wird NrpA nicht gebildet. Ebenso wie in *F. fujikuroi* (Teichert *et al.*, 2002) wird die Bildung des NrpA-Proteins durch MSX, einem Inhibitor der Glutaminsynthetase, fast vollständig inhibiert. Anders als in *F. fujikuroi* (Teichert *et al.*, 2006) verursachte die Inhibierung der TOR-Kinase durch Rapamycin keinen Effekt auf die Bildung von NrpA. Auch durch eine hergestellte Deletionsmutante konnte die biologische Funktion von NrpA nicht geklärt werden. In zahlreichen vergleichenden Untersuchungen verhielt sich die Mutante ebenso wie der Wildtyp. Der einzige dokumentierte Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp ist eine verstärkte Bildung der Katalase 1 in der Deletionsmutante. Anders als angenommen spielt NrpA während der Virulenz von *A. fumigatus* keine Rolle. In einem Virulenzmodell in embryonierten Hühnereiern verhielten sich Deletionsmutante und Wildtyp gleich. Auch in murinen Makrophagen führten die Deletionsmutante und der Wildtyp etwa zu vergleichbaren Mengen an ausgeschüttetem IL-10 und TNF α . Ein potentieller Nutzen von NrpA bei der Diagnose der allergischen bronchoalveolaren Aspergillose (ABPA) konnte ebenso ausgeschlossen werden.

Neben NrpA waren im Vergleich der Proteinmuster der verschiedenen *A. fumigatus*-Morphotypen auch weitere differentiell exprimierte Proteine aufgefallen. Eines davon war eine MnSOD (Aspf6), die bis dahin auch als mitochondriale MnSOD bezeichnet wurde (Rementeria *et al.*, 2007). Da im Genom von *A. fumigatus* aber eine weitere MnSOD kodiert ist, die über eine putative Mitochondriensignalsequenz verfügt, sollte in einem zweiten Teil der Arbeit die tatsächliche Lokalisation dieses Proteins gezeigt werden. Dafür wurden zunächst monoklonale Antikörper gegen das Protein hergestellt. Eine mitochondriale Lokalisation der MnSOD mit putativer Signalsequenz konnte gezeigt werden. Dabei wurden sowohl Western-Blots als auch ein *A. fumigatus*-GFP-Reporterstamm verwendet. Weiterhin konnte das Protein genauer charakterisiert werden. Im Gegensatz zu Aspf6, das nur in den Hyphen des Pilzes zu finden ist, wurde die mitochondriale MnSOD sowohl in den Sporen, als auch in den Hyphen nachgewiesen. Die gebildete Menge des Proteins verändert sich im Zeitverlauf nicht. Lediglich zu sehr späten Wachstumszeitpunkten in der späten stationären Phase war ein leichter Anstieg zu beobachten. Die gebildete Menge des Proteins hing auch nicht von der Animpfdichte der Kultur ab. Anders als

Aspf6, das bekannterweise ein Homotetramer bildet (Flückiger *et al.*, 2002), scheint die mitochondriale MnSOD als Dimer vorzuliegen. Auch in Antwort auf oxidativen Stress verhielten sich die beiden MnSODs unterschiedlich. Menadion, das innerhalb der Zelle die Bildung von Superoxidanionen bewirkt, führte zu einem leichten Anstieg der Proteinmenge der mitochondrialen MnSOD, während Aspf6 unverändert blieb. Als Folge von oxidativem Stress, der durch H₂O₂ verursacht wird, zeigte Aspf6 eine leichte Verringerung, während die mitochondriale MnSOD schnell abgebaut wird.

In einem dritten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der Atmung während der Auskeimung von *A. fumigatus* genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proteinbiosynthese für den Auskeimungsprozess unbedingt notwendig ist. Desweiteren wurde mit Hilfe unterschiedlicher Methoden eine sehr frühe Aktivierung der Atmungskette während des Auskeimungsprozesses nachgewiesen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Sauerstoff für das Wachstum von *A. fumigatus* unbedingt erforderlich ist. Im anaeroben Milieu konnten die Konidien weder anschwellen noch auskeimen. Auch bereits vorhandene Hyphen konnten unter Abwesenheit von Sauerstoff nicht weiterwachsen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *A. fumigatus* anders als *A. nidulans* (Takasaki *et al.*, 2004) nicht über die Fähigkeit verfügt, im Anaeroben durch eine Fermentation von Ammonium zu überleben. In dieser Arbeit wurde ebenso wie in anderen aktuellen Arbeiten (Williger *et al.*, 2008) die Fähigkeit von *A. fumigatus*, in hypoxischen Umgebungen zu wachsen, nachgewiesen.

Literaturverzeichnis

- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. (2005).** Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13(3): 111-118.
- Ames, B. N., Shigenaga M. K., Hagen, T. M. (1995).** Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271(1): 165-170.
- Amitani, R., Taylor, G., Elezis, E.N., Llewellyn-Jones, C., Mitchell, J., Kuze, F., Cole, P. J., Wilson, R. (1995).** Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect. Immun.* 63, 3266-3271
- Asif, A. R., Oellerich, M., Armstrong, V. W., Riemenschneider, B., Monod, M., Reichard U. (2006).** Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J. Proteome Res.* 5(4): 954-962.
- Banki, K., Hutter, E., Colombo, E., Gonchoroff, N. J., Perl, A. (1996).** Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in Transaldolase expression. *J. Biol. Chem.* 271(51): 32994-33001.
- Bauer, B., Schwienbacher M., Broniszewska M., Israel L., Heesemann, J., Ebel F. (2010).** Characterisation of the CipC-like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 53(4): 296-304.
- Beck, T., Hall, M. N. (1999).** The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402(6762): 689-692.
- Bereiter-Hahn, J., Vöth, M. (1994).** Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27: 198-219.
- Bernard, M., Latge, J.-P. (2001).** *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* 39(1): 9-17.
- Berthold, D. A., Anderson, M. E., Nordlund, P. (2000).** New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1460: 241-245.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* (7): 1513-1522.
- Böhmer, M., Colby, T., Böhmer, C., Bräutigam, A., Schmidt, J., Bölker, M. (2007).** Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* 7: 675-685.
- Borgstahl, G. E., Parge, H. E., Hickey, M. J., Beyer, W. F. J., Hallewell, R. A., Tainer, J. A. (1992).** The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71: 107.
- Bowman, E. J., O'Neil, F. J., Bowman, B. J. (1997).** Mutations of *pma-1*, the gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*, suppress inhibition of growth by concanamycin A, a specific inhibitor of vacuolar ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 14776-14786.
- Bozza, S., Gaziano, R., Spreca, A., Bacci, A., Montagnoli, C., di Francesco, P., Romani, L. (2002).** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.* 168: 1362-1371.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (72): 248-254.
- Brakhage, A. A., Langfelder, K. (2002).** Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 433-455.

- Brambl, R. (1975).** Characteristics of developing mitochondrial genetics and respiratory functions in germinating fungal spores. *Biochim. Biophys. Acta.* 396: 175-186.
- Briggs, M. R., Yokoyama C., Wang, X., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1993).** Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 268: 14490-14496.
- Cabiscol, E., Piluats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J. (2000).** Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275(35): 27393-8.
- Calera, J. A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A. J., Debeaupuis, J. P., Diaquin, M., Lopez-Medrano, R., Leal, F., Latge, J. P. (1997).** Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 65(11): 4718-4724.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001).** The fungi. 2nd Edition. Elsevier Academic Press, London, San Diego.
- Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., d'Ostiani, C. F., Mosci, P., Bachmann, M., Bistoni, F., Kopf, M., Romani, L. (1999).** Interleukin-4 causes susceptibility to invasive aspergillosis through suppression of protective type I response. *J. Infect. Dis.* 180: 1957-1968.
- Cenci, E., Perito, S., Enssle, K. H. Mosci, P., Latge, J. P. Romani, L., Bistoni, F. (1997).** Th1 and Th2 cytokine in mice with invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* 65: 564-570.
- Chang, Y. C., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, P. J., Kwon-Chung, K. J. (2007).** Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 64: 614-629.
- Chesis, P. L., Levin, D. E., Smith, M. T., Ernster, L., Ames, B. N. (1984).** Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1696-1700.
- Chun, C. D., Liu, O. W., Madhani, H. D. (2007).** A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 3: e22. Doi:10.1371/journal.ppat.0030022.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (69) 2110-2114.
- Cramer, R. A., Jr.(??), Gamcsik, M. P., Brooking, R. M., Najvar, L. K., Kirkpatrick, W. R., Patterson, T. F., Balibar, C. J., Graybill, J. R., Perfect, J. R., Abraham, S. N., Steinbach, W. J. (2006).** Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot. Cell* 5: 972-980.
- Crameri, R., Blaser, K. (1995).** Cloning allergens from *Aspergillus fumigatus*: the filamentous phage approach. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107 (1-3): 460-461.
- Crameri, R., Limacher, A., Weichel, M., Glaser, A. G., Zeller, S. Rhyner, C. (2006).** Structural aspects and clinical relevance of *Aspergillus fumigatus* antigens/allergens. *Med. Mycol.* 44(Suppl.): 261-267.
- Cutler, N. S., Heitmann, J., Cardenas, M. E. (1999).** TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Mol. Cell Endocrinol.* 155(1-2): 135-142.
- d'Enfert C. (1996).** Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Curr. Genet.* 30: 76-82.
- d'Enfert, C. (1997).** Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 163-172.
- da Silva Ferreira, M. E., Kress, M. R. V. Z., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., Härtl, A., Heinekamp, T., Brakhage, A. A., Goldman, G. H. (2006).** The *akuB*^{Ku80} Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *A. fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 5(1): 207-211.

- Denning, D. W. (1998).** Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26 (4): 781-803.
- Dewhirst, M. W. (1998).** Concepts of oxygen transport at the microcirculatory level. *Semin. Radiat. Oncol.* 8: 143-150.
- Donnelly, J. P. (2006):** Polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis: getting closer but still a ways to go. *Clin. Infect. Dis.* (42): 487-489.
- Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Droillard, M. J., Paulin, A. (1990).** Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant. Physiol.* 94(3): 1187-1192
- Dunn-Colemann, N. S., Garrett, R. (1981).** Effect of the *gln-1b* mutation on nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 145: 884-888.
- Duong, M., Ouellet, N., Simard, M., Bergeron, Y., Olivier, M., Bergeron, M. G. (1998).** Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid induced immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* 178: 1472-1482.
- Ebel, F., Schwienbacher, M., Beyer, J., Heesemann, J., Brakhage, A. A., Brock, M. (2006).** Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genet. Biol.* 43(7): 476-489.
- Emri T., Pocsi, I., Szentirmai, A. (1999).** Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadion. *Free Radical Res.* 30(2): 125-32.
- Espenshade, P. J. (2006).** SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J. Cell Sci.* 119(6): 973-976.
- Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., Butler, G. (2006).** A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* (6): 99.
- Flückiger, S., Mittl, P. R., Scapozza, L., Fijten, H., Folkers, G., Grütter, M. G., Blaser, K., Cramer, R. (2002).** Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. *J. Immunol.* 168(3): 1267-1272.
- Fogarty, W. M. (1994).** Enzymes of the Genus *Aspergillus*. In: J. E. Smith (Ed) *Aspergillus*. 177-218. Plenum Press, New York and London.
- Fravel, D. R., Roberts, D. P. (1991).** *In situ* evidence for the role of Glucose oxidase in the biocontrol of verticillium with *Talaromyces flavus*. *Biocontrol Sci. Technol.* 1: 91-99.
- Fresenius, G. W. (1863).** Beiträge zur Mykologie. Frankfurt a. M., Brönnner: 81-82.
- Fridovich I. (1995).** Superoxid radical and superoxid dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Gancedo, C., Flores, C. L. (2008).** Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 197-210.
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., Doni, A., Vago, L., Botto, M., De Santis, R., Carminati, P., Siracusa, G., Altruda, F., Vecchi, A., Romani, L., Mantovani, A. (2002).** Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in antifungal innate immune response. *Nature* 420: 182-186.
- Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., Zervoudakis, G. (2006).** Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integr. Comp. Biol.* 46(6): 691-712.
- Gersuk, G. M., Underhill, D. M., Zhu, L., Marr, A. K. (2006).** Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J. Immunol.* 176: 3717-3724.
- Gessler, N. N., Aver`yanov, A. A., Belozerskaya, T. A. (2007).** Reactive oxygen species in Regulation of fungal development. *Biochemistry (Moscow)* 72(10): 1091-1109.

- Giles S. S., Batinic-Haberle, I., Perfect, J. R., Cox, G. M. (2005).** *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell*. 4(1): 46-54.
- Greene R. E., Schlamm H. T., Oestmann J. W., Stark, P., Durand, C., Lortholary, O., Wingard, J. R., Herbrecht, R., Ribaud, P., Patterson, T. F., Troke, P. F., Denning, D. W., Bennet, J. E., de Pauw, B. E., Rubin, R. H. (2007).** Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo sign. *Clin. Infect. Dis.* (44): 373-379.
- Griffin, D. H. (1994).** Fungal physiology. 2nd. Wiley-Liss, New York.
- Grosse, V., Krappmann, S. (2008).** The asexual pathogen *Aspergillus fumigatus* expresses functional determinants of *Aspergillus nidulans* sexual development. *Eukaryot Cell* 7(10):1724-1732.
- Hamilton, A. J., Holdom, M. D. (1999).** Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol.* 37: 375-389.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* (166): 557-580.
- Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J., Meisner, C., Baur, M., Loeffler, J., Monod, M., Latge, J. P., Einsele, H. (2002).** Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 100: 4521-4528.
- Helmerhorst, E. J., Stan, M., Murphy, M. P., Sherman, F., Oppenheim, F. G. (2005).** The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanid-insensitive, respiratory pathway in *Candida albicans*. *Mitochondrion* 5: 200-211.
- Hemann, S., Menz, G., Ismail, C., Blaser, K., Cramer, R. (1999).** Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in A fumigatus-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 601-607.
- Hensel, M., Holdom, D. W. (1996).** Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. *Microbiology* 142(5): 1049-1058.
- Herbrecht, R., Denning, D. W., Patterson, T. F., Bennet, J. E., Greene, R. E., Oestmann, J. W., Kern, W. V., Ribaud, P., Lortholary, O., Sylvester, R., Rubin, R. H., Wingard, J. R., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., Thiel, E., Chandrasekar, P. H., Hodges, M. R., Schlamm, H. T., Troke, P. F., de Pauw, B. (2002).** Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* (347): 408-15.
- Hill, T. W. and Kafer, E. (2001).** Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genet. News.* (48): 20-21.
- Hohl, T. M. und Feldmesser, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Eukaryotic Cell* 6(11): 1953-1963.
- Hohl, T. M., van Epps, H. L., Rivera, A., Morgan, L. A., Chen, P. L., Feldmesser, M., Pamer, E. G. (2005).** *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog.* 1: e30.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Nakai, K. (2006).** Protein Subcellular Localization Prediction with WoLF PSORT. *Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06*, Taipei, Taiwan. pp. 39-48.
- Hughes, A. L., Todd, B. L., Espenshade P. J. (2005).** SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* 120: 831-842.
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gabel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., Wiczorek, H. (2002).** Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V_o subunit c. *J. Biol. Chem.* 277(43): 40544-40548.
- Hwang, C.-S., Baek, Y.-U., Yim, H.-S., Kang, S.-O. (2003).** Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* 20: 929-941.

- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., Latge, J. P. (2003).** Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 71: 891-903.
- Imlay, J. A. (2008).** Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 755-776.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jacob, C., Courbot, M., Brun, A., Steinman, H. M., Jacquot, J. P., Botton, B., Chalot, M. (2001).** Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Eur. J. Biochem.* 268: 3223-3232.
- Jacobsen, I. D., Große, K., Slesiona, S., Hube, B., Berndt, A., Brock, M. (2010).** Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect. Immun.* Apr 26 [Epub ahead of print].
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S., Brakhage, A. A. (1997).** Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* 65: 5110-5117.
- Jeong, J. H., Kwon, E. S., Roe, J. H. (2001).** Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 908-914.
- Kamei, K., Watanabe, A. (2005).** *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Med. Mycol.* 43(1): 95-99.
- Kan, V. L. and Bennett, J. E. (1988).** Lectin-like attachment sites on murine pulmonary alveolar macrophages bind *Aspergillus fumigatus* conidia. *J. Infect. Dis.* 158: 407-414.
- Kan, V. L. and Bennett, J. E. (1991).** Beta 1,4-oligoglucosides inhibit the binding of *Aspergillus fumigatus* conidia to human monocytes. *J. Infect. Dis.* 163: 1154-1156.
- Kitayama M., Togasaki R. K. (1995).** Purification and cDNA isolation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 107: 393-400.
- Klich, M. A. (2006).** Identification of clinically relevant *Aspergilli*. *Medical Mycology.* 44: 5127-5131.
- Koolman, J; Röhm, K.-H. (2002).** Taschenatlas der Biochemie. Thieme, Stuttgart 3. Auflage.
- Kozakiewicz, Z. & Smith, D. T. (1994).** Physiology of *Aspergillus*. In: Atkins & R. F. Sherwood (Eds). *Aspergillus, Biotechnology Handbooks* 7, pp. 23-40. Plenum Press, New York and London.
- Krappmann, S., Sasse, C., Braus, G. H. (2006).** Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryotic Cell* 5(1): 212-215.
- Kumar, R., Chugh, T., Gaur, S. N. (2003).** Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis- A review. *Indian J Allergy Asthma Immunol.* 17(2): 55-66.
- Kupfahl, C., Heinekamp, T., Geginat, G., Ruppert, T., Hartl, A., Hof, H., Brakhage, A. A. (2006).** Deletion of *gliP* gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Mol. Microbiol.* 62: 292-302.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamarre C., LeMay J. D., Deslauriers N., Bourbonnais Y. (2001).** *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* 276: 43784-43791.

- Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., Latge, J.-P. (2010).** Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 75(4): 910-923.
- Latge, J.-P. (1999).** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 310-350.
- Latge, J.-P. (2007).** The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66(2): 279-290.
- Lockington, R. A., Borlace, G. N., Kelly, J. M. (1997).** Pyruvate decarboxylase and anaerobic survival in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 191: 61-67.
- Loewus, F. A. (1990).** Inositol biosynthesis. In: Moree, D. J, ed. Inositol metabolism in plants. New York: Wiley-Liss, 13-19.
- Longo, V. D., Liou, L.-L., Valentin J. S., Gralla, E. B. (1999).** Mitochondrial superoxide decreases Yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochem. and Biophys.* (365): 131-142.
- Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A. A., Heesemann, J., Ebel, F. (2006).** Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 9: 368-381.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2001).** Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Magnani, T., Soriani, F. M., Martins, V. P., Nascimento, A. M., Tudella, V. G., Curti, C., Uyemura, S. A. (2007).** Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 230-238.
- Marr, K. A. Balajee, S. A., Hawn, T. R., Ozinsky, A., Pham, U., Akira, S., Aderem, A., Liles, W. C. (2003).** Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* 43: 366-375.
- Matherne, G. P., Headrick, J. P., Coleman, S. D., Berne, R. M. (1990).** Interstitial transudate purines in normoxic and hypoxic immature and mature rabbit hearts. *Pediatr. Res.* 28: 348-353.
- McCord J. M.; Fridovich I. (1988).** Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5(5-6): 363-9.
- Meier, A., Kirschning, C. J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F. (2003).** Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* 5(8): 561-570.
- Melin, P., Schnürer, J., Wagner, E. G. H. (2002).** Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals Proteins associated with the response to the antibiotic Concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol. Genet. Genomics* 267: 695-702.
- Mennink-Kersten, M., A., Donnelly, J. P., Verweij, P. E. (2004).** Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* 4: 349-57.
- Mogenson, J., Nielsen, H. B., Hofmann, G., Nielsen, J. (2006).** Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type and *creA* mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal Genet. Biol.* 43(8): 593-603.
- Monroy, F., Sheppard, D. C. (2005).** Taf1: a class II transposon of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal. Genet. Biol.* 42(7): 638-645.
- Mühlhardt, C. (2003).** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Nakamura, M., Hayashi, T. (1994).** One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *J. Biochem.* 115: 1141-1147.

- Narasipura, S. D., Ault, J. G., Behr, M. J., Chaturvedi, V., Chaturvedi S. (2003).** Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*: role in biology and virulence. *Mol Microbiol.* 47(6): 1681-1694.
- Narasipura, S. D., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S. (2005).** Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gatti* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Mol. Microbiol.* 55(6): 1782-1800.
- Ni, M.; Yu, J. H. (2007).** A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 2(10).
- Nierman W. C, Pain A., Anderson M. J., Wortman J. R., Kim H. S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D. B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P. S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T. V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., García J. L., García J. M., Goble A., Goldman G. H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jiménez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Konzack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafton A., Latgé J.-P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W. H., May G. S., Miller B. S., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I, Mulligan S., Murphy L., O'Neil S., Paulsen I., Peñalva M. A., Perteu M., Price C., Pritchard B. L., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M.-A., Reichard U., Renauld H., Robson G. D., Rodriguez de Córdoba S., Rodríguez-Peña J. M., Ronning C. M., Rutter S., Salzberg S. L., Sanchez M., Sánchez-Ferrero J. C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekaiia F., Turner G., Vazquez de Aldana C. R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J.-H., Fraser C., Galagan J. E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B. & Denning D. W. (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438: 1151-1156.
- O'Gorman, C. M., Fuller, H. T., Dyer, P. S. (2009).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457(7228): 471-4.
- Osharov, N., May, G. S. (2001).** The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 153-160.
- Osharov, N., May, G. (2001).** Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155:647-656.
- Pahl, H. L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofski, A. P., Baeuerl, P. A. (1996).** The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J. Exp. Med.* 183: 1829-1840.
- Paris, S., Debeaupuis, R., Cramer, R., Carey, M., Charles, F., Prevost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J. P. (2003).** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1581-1588.
- Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J. P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R. D., Latgé, J. P. (2003).** Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 71: 3551-3562.
- Paris, S., Debeaupuis, J. P., Cramer, R., Carey, M., Charès, F., Prévost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J. P. (2003).** Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 69(3): 1581-8.
- Perez-Esteban, B., Orejas, M., Gomez-Pardo, E., Penalva, M. A. (1993).** Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspens* isopenicillin N synthase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol. Microbiol.* 9(4): 881-895.
- Perruccio, K., Tosti, A., Burchielli, F., Topini, F., Ruggeri, L., Carotti, A., Capanni, M., Urbani, E., Mancusi, A., Aversa, F., Martelli, M. F., Romani, L., Velardi, A. (2005).** Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantations. *Blood* 106: 4397-4406.
- Persat, F., Noirey, N., Diana, J., Gariazzo, M. J., Schmitt, D., Picot, S., Vincent, C. (2003).** Binding of live conidia of *Aspergillus fumigatus* activates in vitro-generated Langerhans cells via a lectin of Galactomannan specificity. *Clin. Exp. Immunol.* 133: 370-377.

- Philippe, B., Ibrahim-Granet, O., Prevost, M. C., Gougerot-Pocidaló, M. A., Sanchez Perez, M., van der Meeren, A., Latge, J. P. (2003).** Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect. Immun.* 71: 3034-3042.
- Pickering, J. W., Sant, H. W., Bowles, C. A., Roberts, W. L., Woods, G. L. (2005).** Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* (43): 5957-5962.
- Powis, G. (1989).** Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic. Biol. Med.* 6(1): 63-101.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H., van den Hondel, C. A. (1987).** Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56(1): 117-124.
- Raper, K., Fenell, D. (1965).** The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore
- Rawson, R. B. (2003).** The SREBP pathway – insights from Insigs and insects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 631-640.
- Reeves, E. P., Reiber, K., Neville, C., Scheibner, O., Kavanagh, K., Doyle, S. (2006).** A nonribosomal peptide synthetase (Pes1) confers protection against oxidative stress in *Aspergillus fumigatus*. *FEBS J.* 273: 3038-3053.
- Reichard, U., Buttner, S., Eiffert, H., Staib, F., Rüchel, R. (1990).** Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J. Med. Microbiol.* 33: 243-251.
- Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Ponton, J., Garaizar, J. (2005).** Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 1-23.
- Rohde, M., Schwienbacher, M., Nikolaus, T., Heesemann, J., Ebel, F. (2002).** Detection of the early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. *FEMS Microbiol. Lett.* 206(1): 99-105.
- Romani, L. (2004).** Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 1-23.
- Ruijter, G. J. G., Visser, J. (1997).** Carbon repression in aspergilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 103-114.
- Sanchez, O. and Aguirre, J. (1996).** Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet. Newsletter.* (43): 48-51.
- Santos, C., Ballesta, J. P. (2002).** Role of the ribosomal stalk components of *Aspergillus fumigatus* to the sordarin antifungals. *Mol. Microbiol.* 43 (1): 227-237.
- Sato, S., Harris, J. I. (1977).** Superoxide dismutase from *Thermus aquaticus*: isolation and characterization of manganese and apo enzymes. *Eur. J. Biochem.* 73: 373.
- Sato, S., Nakazawa, K. (1978).** Purification and properties of superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.* 83: 1165.
- Schmit, J. C., Brody, S. (1976).** Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol. Rev.* 40: 1-41.
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., Jr., Haynes, K., Haas, H. (2004).** Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* 200: 1213-1219.
- Schwienbacher, M. A. (2005).** Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden. München. Dissertation.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* (98): 503-517.

- Stade S., Brambl, R. (1981).** Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: Respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 147: 757-767.
- Stanzani, M., Orciuolo, E., Lewis, R., Kontoyiannis, D. P., Martins, S. L., St John, L. S., Komanduri, K. V. (2005).** *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. Blood 105: 2258-2265.
- Steele, C., Rapaka, R.R., Metz, A., Pop, S. M., Williams, D. L., Gordon, S., Kolls, J. K., Brown, G. D. (2005).** The beta-glucan receptor Dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog. 1:e42.
- Steen, B. R., Lian, T., Zuyderduyn, S., MacDonald, W. K., Marra, M., Jones, S. J., Kronstad, J. W. (2002).** Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genome Res. 12: 1386-1400.
- Steen, B. R.; Zuyderduyn, S.; Toffaletti, D. L.; Marra, M.; Jones, S. J.; Perfect, J. R.; Kronstad, J. (2003).** *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis. Eucaryot. Cell 2(6): 1336-1349.
- Sugui, J. A. Pardo, J. Chang, Y. C., Zarembek, K. A., Nardone, G., Galvez, E. M., Mullbacher, A., Gallin, J. I., Simon, M. M., Kwon-Chung, K.J. (2007).** Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. Eukaryot. Cell 6: 1562-1569.
- Sugui, J. A., Kim, H. S., Zarembek, K. A., Chang, Y. C., Gallin, J. I., Nierman, W. C., Kwon-Chung, K. J. (2008).** Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. PLoS One. 3(7): e2655.
- Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T., Takaya, N. (2004).** Fungal Ammonia Fermentation, a Novel Metabolic Mechanism That Couples the Dissimilatory and Assimilatory Pathways of Both Nitrate and Ethanol. J. Biol. Chem. 279(13): 12414-12420.
- Takaya, N. (2009).** Response to Hypoxia, Reduction of Electron Acceptors, and Subsequent Survival by Filamentous Fungi. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(1): 1-8.
- Taubitz A. (2005).** Untersuchungen zur „Germination“ des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*. München. Diplomarbeit.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., Ebel, F. (2007).** Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*.
- Taylor, P. R., Tsoni, S. V., Willmet, J. A., Dennehy, K. M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordan, S., Brown, G. D. (2007).** Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. Nat. Immunol. 8: 31-38.
- Teichert, S., Wottawa, M., Schönig, B., Tudzynski, B. (2002).** Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. Eucaryot. Cell 5(10): 1807-1819.
- Teichert, S., Schönig, B., Richter, S., Tudzynski, B. (2004).** Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. Mol. Microbiol. 53(6): 1661-1675.
- Tekaia, F., Latge, J. P. (2005).** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Curr. Opin. Microbiol. 8: 385-392.
- Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latge, J. P., Paris, S. (1994).** Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. 62: 4380-4388.
- Tornberg, K., Olsson, S. (2002).** Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 40(1): 13-20.

- Tronchin, G., Bouchara, J. P., Ferron, M., Larcher, G., Chabasse, D. (1995).** Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: Correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Can. J. Microbiol.* 41: 714-721.
- Tudella V. G., Curti, C., Soriani, F. M., Santos, A. C., Uyemura, S. A. (2004).** In situ evidence of alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 162-172.
- van Belle, H., Goossens, F., Wynants, J. (1987).** Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am. J. Physiol.* 252: H886-893.
- van Gorcom, R. F. M., Pouwels, P. H., Goosen, T., Visser, J., van den Broek, H. W. J., Hamer, J. E., Timberlake, W. E., van den Hondel, C. A. M. J. J. (1985).** Expression of an *Escherichia coli* β -galactosidase fusion gene in *A. nidulans*. *Gene* 40: 99-106.
- van Gorcom, R. F. M., Punt, P. J., Pouwels, P. H., van den Hondel, C. A. M. J. J. (1986).** A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene* 48: 211-217.
- Vanlerberghe, G. C., Vanlerberghe A. E., McIntosh, L. (1997).** Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant. Physiol.* 113: 657-661.
- Viscoli, C., Machetti, M., Cappellano, P., Bucci, B., Bruzzi, P., van Lint, M. T., Bacigalupo, A. (2004).** False positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin. Infect. Dis.* (38): 913-916.
- Wagner, A. M., Moore, A. L. (1997).** Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci. Rep.* 17: 319-333.
- Walsh, T. J., Anaissie, E. J., Denning, D. W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D. P., Morrison, V. A., Segal, B. H., Steinbach, W. J., Stevens, D. A., van Burik, J.-A., Wingard, J. R., Patterson, T. F. (2008).** Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* (46): 327-360.
- Wang, X., Briggs, M. R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J. L. (1993).** Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 268: 14497-14504.
- Waring, P., Eichner, R. D. Mullbacher, A., Sjaarda, A. (1988).** Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *J. Biol. Chem.* 263: 18493-18499.
- Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P., Brakhage, A. A. (1998).** Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine monophosphate decarboxylase. *Current Genet.* 33: 378-385.
- Westermann, B., Prokisch, H. (2002).** Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 36: 91-97.
- Williams, D. M., Weiner, M. H., Drutz, D. J. (1981).** Immunologic studies of disseminated infection with *Aspergillus fumigatus* in the nude mouse. *J. Infect. Dis.* 143: 726-733.
- Williger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J. B., Grahl, N., Metzler, L. J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C. B., Cramer Jr., R., A. (2008).** A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaption, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 4(11): e1000200.
- Wray, L. V., Jr, Zalieckas, J. M., Fisher, S. H. (2001).** *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* 16: 427-435.
- Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., Shoun, H. (2002).** Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J. Biol. Chem.* 277: 1892-1896.

Anhang

Phenotype Microarrays (Biolog)

PM3B MicroPlate Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valin	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D1 N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β -Phenylethylamine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Alantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L- α -Amino-N-Butyric Acid	G8 γ -Amino-N-Butyric Acid	G9 ϵ -Amino-N-Caproic Acid	G10 D,L- α -Amino-Caprylic	G11 δ -Amino-N-Valeric Acid	G12 α -Amino-N-Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

PM10 Microplate pH

A1 pH 3.5	A2 pH 4	A3 pH 4.5	A4 pH 5	A5 pH 5.5	A6 pH 6	A7 pH 7	A8 pH 8	A9 pH 8.5	A10 pH 9	A11 pH 9.5	A12 pH 10
B1 pH 4.5	B2 pH 4.5 + L-Alanine	B3 pH 4.5 + L-Arginin	B4 pH 4.5 + L-Aspara- gin	B5 pH 4.5 + L-Aspartic Acid	B6 pH 4.5 + L-Glutamic Acid	B7 pH 4.5 + L- Glutami- ne	B8 pH 4.5 + Glycine	B9 pH 4.5 + L-Histidine	B10 pH 4.5 + L- Isoleuci- ne	B11 pH 4.5 + L- Leucine	B12 pH 4.5 + L- Lysine
C1 pH 4.5 + Methion- ine	C2 pH 4.5 + L- Phenyl- alanine	C3 pH 4.5 + L- Proline	C4 pH 4.5 + L-Serine	C5 pH 4.5 + L- Threoni- ne	C6 pH 4.5 + L- Tryptoph- an	C7 pH 4.5 + L- Tyrosine	C8 pH 4.5 + L-Valine	C9 pH 4.5 + Hydroxy- L-Proline	C10 pH 4.5 + L- Ornithin- e	C11 pH 4.5 + L- Homoargi- nine	C12 pH 4.5 + L- Homoser- ine
D1 pH 4.5 + Anthrani- lic Acid	D2 pH 4.5 + L- Norleucin- e	D3 pH 4.5 + L- Norvali- ne	D4 pH 4.5 + α - Amino- N- butyric Acid	D5 pH 4.5 + α -Amino malon- ate	D6 pH 4.5 + β - Hydroxy Gluta- mate	D7 pH 4.5 + γ - Hydroxy Gluta- mate	D8 pH 4.5 + 5- Hydroxy Lysine	D9 pH 4.5 + 5- Hydroxy Tryptophan	D10 pH 4.5 + D,L- Diami- no pimelic Acid	D11 pH 4.5 + Trimethyla- mine-N- oxide	D12 pH 4.5 + Urea
E1 pH 9.5	E2 pH 9.5 + L-Alanine	E3 pH 9.5 + L- Argini- ne	E4 pH 9.5 + L- Asparagi- ne	E5 pH 9.5 + L- Aspartic Acid	E6 pH 9.5 + L- Glutamic Acid	E7 pH 9.5 + L- Glutami- ne	E8 pH 9.5 + Glycine	E9 pH 9.5 + L-Histidine	E10 pH 9.5 + L- Isoleuci- ne	E11 pH 9.5 + L- Leucine	E12 pH 9.5 + L-Lysine
F1 pH 9.5 + L- Methion- ine	F2 pH 9.5 + L- Phenyl- alanine	F3 pH 9.5 + L- Proline	F4 pH 9.5 + L-Serine	F5 pH 9.5 + L- Threoni- ne	F6 pH 9.5 + L- Tryptoph- an	F7 pH 9.5 + L- Tyrosine	F8 pH 9.5 + L-Valine	F9 pH 9.5 + Hydroxy- L-Proline	F10 pH 9.5 + L- Ornithin- e	F11 pH 9.5 + L- Homoargi- nine	F12 pH 9.5 + L- Homoser- ine
G1 pH 9.5 + Anthrani- lic Acid	G2 pH 9.5 + L- Norleucin- e	G3 pH 9.5 + L- Norvali- ne	G4 pH 9.5 + α - Amino- N- butyric Acid	G5 pH 9.5 + α -Amino malon- ate	G6 pH 9.5 + β - Hydroxy Gluta- mate	G7 pH 9.5 + γ - Hydroxy Gluta- mate	G8 pH 9.5 + 5- Hydroxy Lysine	G9 pH 9.5 + 5- Hydroxy Tryptophan	G10 pH 9.5 + D,L- Diami- no pimelic Acid	G11 pH 9.5 + Trimethyla- mine-N- oxide	G12 pH 9.5 + Urea
H1 X- Caprylat- e	H2 X- α -D- Glucoside	H3 X- β -D- Glucoside	H4 X- α -D- Galacto- side	H5 X- β -D- Galacto- side	H6 X- α -D- Glucuro- nide	H7 X- β -D- Glucuro- nide	H8 X- β -D- Glucosa- minide	H9 X- β -D- Glucosa- minide	H10 X- α -D- Mannos- ide	H11 X-PO4	H12 X-SO4

Lebenslauf

Name:	Bettina Bauer
Geburtsdatum:	9. März 1978
Geburtsort:	Starnberg
1984-1988	Besuch der Grundschule Tutzing
1988-1998	Besuch des Gymnasiums Tutzing Abschluss: Abitur
1998-1999	Studium der Neueren Deutschen Literatur an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999-2005	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Schwerpunkt Mikrobiologie Nebenfächer: Zoologie (zellbiologische Richtung), physiologische Botanik, Genetik Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Volker Müller: Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cholin und zum Transport von Cholin in <i>Halobacillus halophilus</i> Abschluss: Diplom
August 2005- Juni 2009	Experimentelle Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Ebel
November 2009-Juni 2010	Elternzeit
Juni 2010-August 2010	Fertigstellung der Dissertation

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung sehr herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens und die Bereitschaft diese Arbeit vor der biologischen Fakultät der LMU zu vertreten.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Mascher.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Ebel für die Vergabe des spannenden Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Seine Unterstützung und seine Ratschläge sorgten für das Gelingen dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich, dass ich die Möglichkeit hatte, an zahlreichen Tagungen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut durchzuführen.

Vielen Dank an Ilse Jacobsen vom HKI in Jena für die Durchführung der Infektionsversuche in embryonierten Hühnereiern.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Aspergillus für das stets kollegiale Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde. Danke Kathrin, Leonie, Marzena, Andrea, Johannes, Julia, Karl, Franziska und Allison. Auch ein Dankeschön für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung von Mitgliedern anderer Arbeitsgruppen: Xaver, Hicham, Gottfried Wilharm, Kristl und Beate.

Bei den Teilnehmerinnen unserer gemeinsamen Mittagsessensrunde möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken. Es war so schön! Vielen Dank für die Ablenkungen, für die Aufmunterungen und für die Unterstützung in schwierigen Forschungssituationen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Mann. Durch ihre immerwährende Unterstützung wurde diese Arbeit erst ermöglicht.