

**Protein-Extraktion aus Konidien und Myzel von
innenraumrelevanten Schimmelpilzen und
Schlussfolgerung für die Allergiediagnostik**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Nadine Hollbach

aus Lichtenstein

Berichter: Professor als Juniorprofessor Dr. rer. nat. Guido Fischer
Universitätsprofessor Dr. med. Thomas Kraus

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2010

Akademische Edition Umweltforschung

Publikationsreihe des interdisziplinären
Umwelt-Forums der RWTH Aachen

Band 48/2011

Nadine Hollbach

**Protein-Extraktion aus Konidien und Myzel von
innenraumrelevanten Schimmelpilzen und
Schlussfolgerung für die Allergiediagnostik**

Herausgeber:
Prof. Dr. rer. nat. G. Fischer
Institut für Hygiene und Umweltmedizin

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2010)

Copyright Shaker Verlag 2011

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0196-9

ISSN 1437-532X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet. Ihre Liebe, Motivation, ihr Verständnis und nichts zuletzt ihre finanzielle Unterstützung haben mein Studium und diese Dissertation möglich gemacht.

1. Einleitung	1
1.1. Systematik der Schimmelpilze	1
1.1.1. Taxonomie	1
1.1.2. Morphologie der untersuchten Arten	2
1.1.3. Zytologie	4
1.1.3.1. Kern	4
1.1.3.2. Zytoplasma	5
1.1.3.3. Zytoplasmatische Membran	5
1.1.3.4. Zellwand	6
1.1.3.5. Myzel	7
1.1.3.6. Konidien	7
1.2. Vorkommen von Schimmelpilzen	7
1.2.1. Außenluft	8
1.2.2. Innenraum	9
1.2.3. Belastungssituation am Arbeitsplatz	10
1.2.3.1. Abfallwirtschaft	10
1.2.3.2. Lebensmittel	10
1.2.3.3. Landwirtschaft	10
1.3. Risikoeinstufung	11
1.4. Allergien durch Schimmelpilze	12
1.4.1. Sensibilisierung – Allergie	12
1.4.2. Allergene Pilze und Pilzbestandteile	13
1.4.3. Immunologische Effekte	15
1.4.4. Formen der Allergie	16
1.4.4.1. Typ I-Reaktion	16
1.4.4.2. Typ II-Reaktion	16
1.4.4.3. Typ III-Reaktion	16
1.4.4.4. Typ IV-Reaktion	17
1.4.5. Klinische Äußerungen von Inhalationsantigenen	17
1.4.5.1. Allergische bronchopulmonale Aspergillose	18
1.4.5.2. Exogen allergische Alveolitis	19
1.4.6. Diagnostik	21
1.4.6.1. In vivo-Diagnostik	22
1.4.6.2. In vitro-Diagnostik	23
1.5. Allergie-Testextrakte	28
1.5.1. Standardisierung von Testextrakten	28
1.5.2. Anzucht von Pilzkulturen	28
1.5.3. Extraktion	29
1.5.4. Major- und Minorallergene	29
1.6. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit	30
1.7. Aufbau der Arbeit	31
2. Material und Methoden	34
2.1. Medien, Schimmelpilzisolat und kommerzielle Allergietestextrakte	34
2.1.1. Schräg-Agar	34
2.1.2. Flüssigmedium	34
2.1.3. Auswahl der Pilzisolat	35
2.1.4. Allergie-Testextrakte	36
2.2. Kultivierung der Schimmelpilzisolat	37
2.2.1. Konidien	37
2.2.2. Myzel	37
2.3. Extraktion der Proteine	37
2.3.1. Konidien	38

2.3.1.1. Dialyse	38
2.3.1.2. Zellyse mit Lysispuffer	39
2.3.1.3. Schockgefrieren und Mörsern	40
2.3.1.4. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen	40
2.3.1.5. Kugelmühle	41
2.3.1.6. Erfolgskontrolle der Extraktionsmethoden	41
2.3.2. Myzel	42
2.3.2.1. Gefriertrocknung	42
2.3.2.2. Dialyse	42
2.3.2.3. Kugelmühle	43
2.3.3. Pricktestextrakte	44
2.4.1. Auftrennung der Proteine	44
2.4.2. Färbung	45
2.4.2.1 Silberfärbung	45
2.4.2.2. Coomassie-Färbung	46
2.4.2.3. Sypro-Orange-Färbung	46
2.4.3. Auswertung	47
2.5. Gel Trocknung	47
2.6. Blotten	47
2.6.1. Antrag Ethikkommission	47
2.6.2. Patientenserum	48
2.6.3. Membranen	48
2.6.4. Blotting-Methoden	49
2.6.4.1. Semi-Dry-Blot	49
2.6.4.2. Tank Blot	50
2.6.5. Membranfärbung	51
2.6.5.1. Coomassie Blue Färbung	51
2.6.5.2. Amido Schwarz Färbung	51
2.6.5.3. Ponceau Rot Färbung	51
2.6.5.4. Pelikan® Ink Färbung	52
2.6.6. Immunodetektion	52
2.6.7. Auswertung	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Optimierung der Extraktionsmethoden für Proteine	54
3.1.1. Extraktion von Konidien	54
3.1.1.1. Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	54
3.1.1.2. Abschwemmen der Konidien	58
3.1.1.3. Vergleich von Pellet und Überstand	62
3.1.1.4. Protease-Inhibitoren	63
3.1.2. Extraktion von Myzel	64
3.1.2.1. Dialyse	64
3.1.2.2. Kugelmühle	64
3.1.3. Vergleich aufgetauter und frischer Extrakte	64
3.1.4. Färbungen der Gele	65
3.2. Analyse der Proteinspektren	66
3.2.1. Proteinspektren verschiedener Stämme gleicher Art	66
3.2.1.1. Konidien	66
3.2.1.2. Myzel	70
3.2.2. Gegenüberstellung von Myzel und Konidien einer Art	73
3.2.2.1. Penicillium chrysogenum	73
3.2.2.2. Aspergillus fumigatus	74
3.2.2.3. Cladosporium cladosporioides	75

3.2.2.4. <i>Alternaria alternata</i>	76
3.2.3. „Allergietest“-Extrakte.....	77
3.3. Immunoblot.....	79
3.3.1. Test verschiedener Membranen	79
3.3.2. Test verschiedener Blotting-Verfahren	80
3.3.3. Färbung Blotting-Membranen.....	82
3.3.4. Immundetektion	83
4. Diskussion.....	85
4.1. Zytologische und biochemische Aspekte.....	85
4.1.1. DNA	85
4.1.2. Zellmembran	86
4.1.3. Zellwand.....	86
4.1.4. Stoffwechsel.....	86
4.2. Präanalytik	87
4.2.1. Vorkommen von Pilzen in Innen- und Außenluft.....	87
4.2.2. Auftreten von Allergien (Innenraum/Außenluft)	87
4.2.3. Luftkeimsammlung	88
4.2.4. Auswahl und Lagerung von Pilzkulturen.....	88
4.2.5. Eindringtiefe der Allergene in die Atemwege	88
4.3. Extraktionsmethoden	89
4.3.1. Vergleich der Dialyse mit anderen Extraktionsmethoden	89
4.3.2. Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	90
4.3.3. Zellaufschluss vs. Nichtaufschluss	90
4.3.4. Vergleich des Abschwemmens mittels NaCl Tween und A.bidest	91
4.3.5. Vergleich von Pellets und Überstand.....	92
4.3.6. Protease-Inhibitoren.....	93
4.3.7. Vergleich von tiefgefrorenen und frisch gewonnenen Extrakten	94
4.3.8. Gelfärbungen.....	95
4.3.9. Extraktion von Konidien.....	96
4.3.10. Extraktion von Myzel.....	96
4.4. Analyse der Proteinspektren	97
4.4.1. Verschiedene Stämme gleicher Art.....	97
4.4.1.1. Konidien.....	97
4.4.1.2. Myzel	98
4.4.2. Vergleich von Myzel- und Konidienextrakten.....	99
4.4.3. Vergleich von Wildstämmen und Pricktestextrakten.....	99
4.5. Immunoblot.....	101
4.5.1. Membranen	101
4.5.2. Blottingverfahren	101
4.5.3. Färbung der Blottingmembranen	101
4.5.4. Immundetektion	102
4.5.5. Patientenauswahl.....	103
4.6. Allergietestung.....	104
4.6.1. Immunologie.....	104
4.6.2. Major- und Minorallergene.....	105
4.6.3. Zusammensetzung von Pricktest-Extrakten.....	105
4.6.4. Klinische Allergiediagnostik.....	107
4.6.5. Standardisierung von Allergie-Testextrakten	108
5. Schlussfolgerung.....	111
6. Zusammenfassung.....	113
7. Literaturverzeichnis	114
8. Anhang.....	120

8.1. Puffer und Lösungen	120
(1) NaCl Tween.....	120
(2) Ammoniumsulfat.....	120
(3) Extraktionspuffer	120
(4) Proteaseinhibitor-Cocktail	120
(5) Lysispuffer A.....	121
(6) Laemmli-Puffer	121
(7) Laufpuffer.....	121
(8) Development Accelerator Solution (<i>Silberfärbung</i>)	122
(9) Fixative Enhancer Solution (<i>Silberfärbung</i>)	122
(10) Staining Solution (<i>Silberfärbung</i>)	122
(11) Fixing Solution (<i>Coomassie Färbung</i>).....	122
(12) Destaining Solution (<i>Coomassie Färbung</i>).....	123
(13) Preserving Solution (<i>Coomassie Färbung</i>)	123
(14) Anode-1-Puffer.....	123
(15) Anode-2-Puffer.....	123
(16) Kathodenpuffer.....	123
(17) Blotting-Puffer.....	123
(18) modifizierter Laufpuffer	124
(19) Coomassie Färbelösung.....	124
(20) Coomassie Entfärbelösung 1	124
(21) Coomassie Entfärbelösung 2	124
(22) Amido-Schwarz-Färbelösung.....	124
(23) Amido-Schwarz-Entfärbelösung	125
(24) Ponceau S-Färbelösung	125
(25) Ponceau S-Entfärbelösung.....	125
(26) Pelikan-Färbelösung.....	125
(27) Milchpulverlösung.....	125
(28) Blocking-Puffer.....	126
(29) TBS-T	126
(30) TBS.....	126
(31) Bikarbonat-Puffer	126
(32) Probenverdünnungspuffer (PBS)	126
(33) Sabaroud-Feststoff-Agar	127
(34) DG 18-Agar	127
8.2. Chemikalienliste.....	127
8.3. Geräte- und Materialliste	129
8.4. Verzeichnis der Abkürzungen/Glossar	130
8.5. Abbildungsverzeichnis.....	133
8.6. Tabellenverzeichnis.....	135
8.7. Bilder.....	136
8.8. Antrag Ethikkommission	166
9. Publikationen	175
9.1. Poster GHU	175
9.2. Paper.....	176
9.3. sonstige Veröffentlichungen	182
10. Danksagung.....	183
11. Lebenslauf.....	185