
**Die Bedeutung der
Protein-*O*-Mannosyltransferasen
für die Virulenz von
*Cryptococcus neoformans***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sven Daniel Willger

aus Duisburg

Duisburg, Juni 2007

Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. R. Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DER HUMANPATHOGENE PILZ CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS	1
1.2. TAXONOMIE VON C. NEOFORMANS	2
1.3. DER LEBENSZYKLUS VON C. NEOFORMANS	3
1.4. DIE VIRULENZFAKTOREN VON C. NEOFORMANS	5
1.4.1. Die Kapsel.....	5
1.4.2. Melanin.....	7
1.4.3. Paarungstyp.....	8
1.4.4. Extrazelluläre Enzyme.....	8
1.5. GLYKOSYLIERUNG	9
1.6. PROTEIN-O-MANNOSYLTRANSFERASEN	11
1.7. ZIELSETZUNG	14
2. MATERIALIEN	15
2.1. CHEMIKALIEN	15
2.2. ENZYME:	17
2.2.1. Restriktionsendonukleasen:	17
2.2.2. Polymerasen und DNA/RNA modifizierende Enzyme:	17
2.2.3. Andere Enzyme	18
2.3. SONSTIGE MATERIALIEN:	18
2.4. GERÄTE UND MASCHINEN.....	18
2.5. KITS	19
2.6. STÄMME UND ZELLINIEN.....	20
2.6.1. Bakterienstämme:	20
2.6.2. Hefestämme:	20
2.6.3. Zelllinien.....	21
2.7. MEDIEN.....	22
2.7.1. Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	22
2.7.2. Medien zur Anzucht von Hefen.....	23
2.7.3. Medien zur Anzucht von Zelllinien	25
2.8. PLASMIDE	26
2.9. OLIGONUKLEOTIDE	29
3. METHODEN.....	31
3.1. METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND ANALYSE VON DNA	31

3.1.1.	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	31
3.1.1.1.	Plasmidminipräparation	31
3.1.1.2.	Plasmidmidipräparation:	31
3.1.2.	<i>Genomische DNA-Isolation aus C. neoformans</i>	32
3.1.2.1.	„Smash und Grab“-Methode	32
3.1.2.2.	Genomische DNA-Präparation.....	33
3.1.3.	<i>Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese</i>	34
3.1.4.	<i>Größenstandard für DNA</i>	34
3.1.5.	<i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	34
3.1.6.	<i>Ethanol-fällung</i>	35
3.1.7.	<i>Restriktionsanalyse von DNA</i>	35
3.1.8.	<i>5'-Dephosphorylierung von Vektoren</i>	35
3.1.9.	<i>Ligation</i>	36
3.1.10.	<i>Photometrische Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration</i>	36
3.1.11.	<i>Butanol-fällung von DNA</i>	36
3.2.	SOUTHERN-ANALYSE (DIG)	37
3.2.1.	<i>Sondenmarkierung</i>	37
3.2.2.	<i>Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot</i>	37
3.2.3.	<i>Hybridisierung und Detektion</i>	37
3.3.	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION („POLYMERASE CHAIN REACTION“)	38
3.3.1.	<i>Kolonie-PCR</i>	40
3.4.	TRANSFORMATIONEN.....	40
3.4.1.	<i>Transformation von E. coli</i>	40
3.4.1.1.	Herstellung elektrokompenter E. coli Zellen.....	40
3.4.1.2.	Elektroporation von E. coli	41
3.4.1.3.	Herstellung DMSO kompetenter E. coli Zellen	41
3.4.1.4.	„One-Minute“ Transforamtion von E. coli.....	42
3.4.2.	<i>Transformation von C. neoformans</i>	42
3.4.2.1.	Elektroporation von C. neoformans	42
3.4.2.2.	Transformation von C. neoformans durch Mikropartikel-beschuss („Biolistic transformation“)	44
3.5.	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	45
3.6.	UREASE TEST	46
3.7.	KAPSELINDUKTION	46
3.8.	MELANINTESTS	46
3.8.1.	<i>Melanintest auf Agarplatte</i>	46
3.8.2.	<i>Melanintest in Flüssigmedium</i>	46
3.9.	START UND PASSAGE VON MAKROPHAGEN IN ZELLKULTURFLASCHEN	47
3.10.	MAKROPHAGEN-PHAGOZYTOSE/TÖTUNGSTEST.....	47
3.11.	VIRULENZTESTS IN DEM MODELLORGANISMUS MAUS.....	48
4.	ERGEBNISSE	50
4.1.	DATENBANKANALYSE UND SEQUENZVERGLEICH DER PMT-PROTEINFAMILIE.....	50

4.2.	KONSTRUKTION VON PMT-INSERTIONSMUTANTEN	57
4.3.	REKONSTITUIERUNG DER PMT-MUTANTEN	62
4.4.	DIE PMT2-MUTANTE UND DIE PMT1 PMT4-DOPPELMUTANTE SIND LETAL.....	64
4.5.	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PMT-MUTANTEN.....	67
4.5.1.	<i>Temperaturabhängiges Wachstum der pmt-Mutanten</i>	68
4.5.2.	<i>Morphologie der pmt-Mutanten</i>	70
4.5.3.	<i>Untersuchungen zur Sensitivität der pmt-Mutanten</i>	75
4.5.3.1.	Sensitivität gegen Aminoglykoside und Zellwand-destabilisierende Substanzen	76
4.5.3.2.	Sensitivität gegen verschiedene Substanzen	79
4.5.4.	<i>Analyse der Virulenzfaktoren</i>	83
4.5.4.1.	Die Kapsel der pmt-Mutanten ist geringfügig dünner	83
4.5.4.2.	Extrazelluläre Enzyme sind in den pmt-Mutanten unverändert	84
4.5.4.3.	Paarung	86
4.5.4.4.	Die Melaninproduktion der pmt4-Mutanten ist gestört	88
4.6.	MAKROPHAGEN TEST.....	89
4.7.	DIE PMT-MUTANTEN IM MURINEN INHALATIONS-MODEL.....	90
5.	DISKUSSION.....	93
5.1.	SEQUENZANALYSE DER PMT-PROTEINE	93
5.2.	DIE PROTEIN-O-MANNOSYLIERUNG IST ESSENTIELL FÜR C. NEOFORMANS	95
5.3.	MUTATIONEN IN DEN PMT-GENEN BEEINFLUSSEN DIE ZELLWAND	96
5.4.	PMT-MUTANTEN HABEN EINE STARK VERRINGERTE VIRULENZ.....	99
6.	ZUSAMMENFASSUNG	104
7.	SUMMARY	105
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
9.	ANHANG.....	114
9.1.	DATEN ZU WACHSTUMSANALYSEN.....	114
9.2.	DATEN ZUR PMT1 PMT4-DOPPELDISRUPTION	114
9.3.	DATEN ZUM MELANINTEST	115
9.4.	DATEN ZUM MAKROPHAGEN-PHAGOZYTOSE/TÖTUNGSTEST.....	115
9.5.	DATEN ZUM MAUS EXPERIMENT.....	115
9.6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
9.7.	TABELLENVERZEICHNIS	117
DANKSAGUNG.....		118
ERKLÄRUNG.....		120

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dol- <i>P</i> -Man	Dolichol-Phospho-Mannose
DOPA	3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (Dopamin)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FKS	Fötales Kälberserum
FOA	5-Fluor Orotsäure
G418	Geneticin 418
GalXM	Galaktoxylomannan
GXM	Glukuronoxylomannan
h	Stunde/Stunden
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Vollmedium L-Broth

l.....	Liter
mA	Milliampere
Mb.....	Megabasenpaare
Man.....	Mannose
mM.....	millimolar
M.....	molar
MEM.....	Modified Eagle Medium
mg	Milligramm
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
μ l.....	Mikroliter
μ M	mikromolar
Nr.....	Nummer
OD	optische Dichte
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pmt/POMT.....	Protein- <i>O</i> -Mannosyltransferase
RNA.....	Ribonukleinsäure
RT.....	Reverse Transkription
SD.....	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SSC	Kochsalz-Natriumcitrat (Saline-Sodium Citrate)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris.....	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Units (Einheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute

üN	über Nacht
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YNB.....	Yeast nitrogen base
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose
%.....	Prozent
Ø	Durchmesser

1. Einleitung

1.1. *Der humanpathogene Pilz Cryptococcus neoformans*

Neben den Ascomyzeten *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* hat sich der Basidiomyzet *Cryptococcus neoformans* in den letzten Jahren zu einem der bedeutendsten Erreger menschlicher Mykosen entwickelt. *C. neoformans* wurde zuerst von Sanfelice vor mehr als einem Jahrhundert beschrieben und bereits wenige Jahre später von Busse und Buschke als opportunistischer humanpathogener Pilz mit einer menschlichen Krankheit, der Kryptokokkose, in Verbindung gebracht (Knoke und Schwesinger, 1994). Heute gilt *C. neoformans* als der Haupterreger der durch Pilze hervorgerufenen Meningitis (Casadevall und Perfect, 1998).

Kryptokokkosen treten überwiegend bei immunsupprimierten Patienten mit T-Zell-Defekten auf und gehören daher unter anderem zu den AIDS-definierenden Erkrankungen: etwa 6-10 % aller AIDS Patienten entwickeln eine Kryptokokkose (Nielsen *et al.*, 2005). Nur in seltenen Fällen können auch immunkompetente Patienten von *C. neoformans* infiziert werden (s. u.). Eine Infektion mit *C. neoformans* erfolgt primär über die Inhalation von Sporen, die aufgrund ihrer geringen Größe (1-3 μm) bis in die Alveolen der Lunge vordringen können (Hull und Heitman, 2002). Die Sporen entwickeln sich dort zu Hefen, die ausgehend von der Lunge hämatogen disseminieren, und sekundär zu systemischen Infektionen führen können. In den befallenen Organen, insbesondere Leber, Nieren und das zentrale Nervensystem, bilden sich typischerweise kleine Knötchen, so genannte Granulome, die i. d. R. mit *C. neoformans*-Zellen gefüllt sind. Bleibt eine Infektion mit *C. neoformans* unbehandelt, so verläuft sie zumeist tödlich (Casadevall und Perfect, 1998).

Die Behandlung von Mykosen ist generell problematisch, da die grundlegenden zellulären Prozesse von Wirt und Erreger nahezu identisch sind, da Pilze ebenfalls eukaryotisch sind. Einer der wenigen selektiven Angriffspunkte für Antimykotika ist das für die Zellmembranen von Pilzen spezifische Ergosterol. Aus diesem Grund wirken viele der aktuell eingesetzten Antimykotika, wie z. B. die Triazol- oder Polyen-Antimykotika, auf die Biosynthese des Ergosterols oder interagieren direkt mit diesem Zellmembranbestandteil. Zusätzlich wird speziell die Behandlung einer Kryptokokkose dadurch erschwert, dass *C. neoformans* die Fähigkeit besitzt, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können.

Aufgrund der stetig steigenden Zahl immunsupprimierter Patienten und der damit verbunden steigenden Infektionen mit humanpathogenen Pilzen, sowie der sich ausbreitenden Resistenzbildung der Erreger, ist die Entwicklung neuer Therapeutika dringend notwendig. Die diesbezügliche Forschung konzentriert sich daher stark auf die Untersuchung der Virulenzeigenschaften dieser pathogenen Organismen und deren zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, mit dem Ziel neue, Erreger-spezifische Eigenschaften oder Prozesse als mögliche Angriffsziele für Therapeutika identifizieren zu können.

1.2. Taxonomie von *C. neoformans*

Die Art *C. neoformans* wird i.d.R. in drei Varietäten unterteilt, und zwar die Varietäten *grubii* (Serotyp A), *neoformans* (Serotyp D) sowie *gattii* (Serotypen B und C). Die Serotypen A und D, sowie ein hybrider AD Serotyp sind weltweit verbreitet, wohingegen die Serotypen B und C hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen vorkommen (Mitchell und Perfect, 1995; Sorrell, 2001). Die Mehrheit der klinischen Isolate in Nordamerika sind vom Serotyp A, wohingegen Serotyp D Stämme häufiger in Europa, insbesondere in Dänemark, Frankreich und Italien auftreten (Bennett *et al.*, 1984; Dromer *et al.*, 1996; Franzot *et al.*, 1998). Aufgrund molekular-phylogenetischer Studien nimmt man an, dass die Varietäten *grubii* und *neoformans* sich evolutionär vor ca. 18 Mio Jahren getrennt haben, und beide Varietäten sich vor ca. 37 Mio Jahren von der Varietät *gattii* trennten (Xu *et al.*, 2000). Die Aufteilung der Art *C. neoformans* in die drei erwähnten Varietäten wurde zunächst aufgrund ausgeprägter biochemischer Unterschiede der einzelnen Varietäten, sowie abweichender 26S rRNA Sequenzen, „PCR fingerprints“, elektrophoretischer Enzym-Profile und Karyotypen vorgenommen (Bertout *et al.*, 1999; Boekhout und van Belkum, 1997; Brandt *et al.*, 1993; Gueho *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1993; Perfect *et al.*, 1993; Perfect *et al.*, 1989; Wickes *et al.*, 1994). Ein zusätzlicher Anhaltspunkt für das Vorliegen von Varietäten lieferte die Tatsache, dass Kreuzungen von Stämmen unterschiedlicher Serotypen zumeist keine fertilen Nachkommen lieferten. Durch die beständige Zunahme an verfügbaren Sequenzdaten konnte in den letzten Jahren durch weitere molekular-phylogenetische Analysen unter anderem für die Gene der mitochondrialen großen ribosomalen Untereinheit, die internen transkribierten Spacer-Regionen (ITS) der nukleären rRNA, oder die Gene der Orotidin-monophosphat-pyrophosphorylase (*URA5*) und Diphenoloxidase (*CnLAC*) die zurzeit aktuelle Unterteilung der Art *C. neoformans* in drei Varietäten bestätigt werden (Xu *et al.*, 2000).

1.3. Der Lebenszyklus von *C. neoformans*

Der Lebenszyklus des Homobasidiomyzeten *C. neoformans* kann in einen asexuellen und einen sexuellen Zyklus aufgeteilt werden (Abbildung 1). In der Natur und aus Patienten konnte *C. neoformans* bislang nur als haploide Hefezelle isoliert werden, die sich durch Knospung teilt. Das sexuelle Stadium (Teleomorph) *Filobasidiella neoformans* konnte dagegen bisher nur im Labor beobachtet werden, und wurde zuerst von Kwon-Chung, beschrieben (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976).

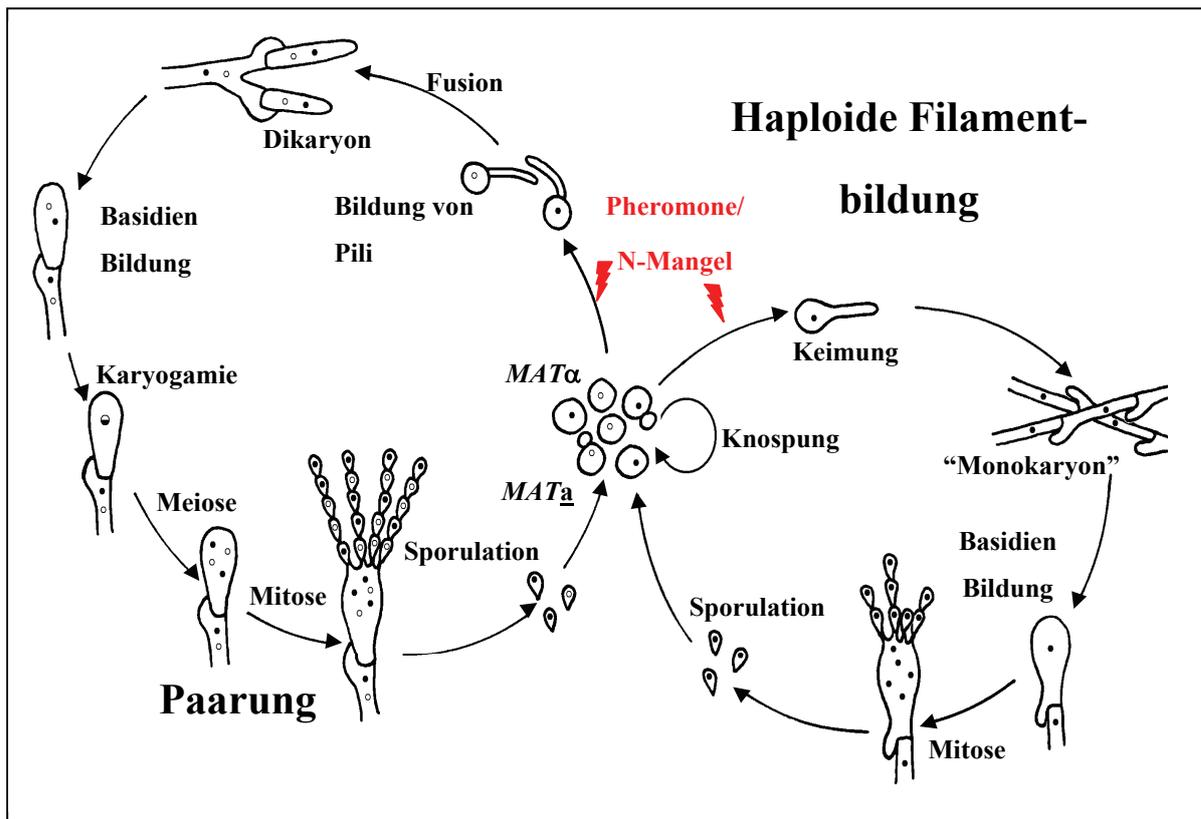


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *C. neoformans*

Unter guten Bedingungen liegt *C. neoformans* als $MATa$ bzw. $MAT\alpha$ Hefezellen vor, die sich durch Knospung teilen. Während der Paarung bilden haploide Hefezellen mit unterschiedlichem Paarungstyp typische Konjugationsschläuche, fusionieren und wachsen als dikaryotisches Myzel mit fusionierten Schnallen aus. An den Enden der Filamente differenzieren sich die Basidien, in denen anschließend Karyogamie und Meiose ablaufen. Von den Basidien schnüren sich Basidiosporen ab, aus denen wieder Hefezellen entstehen können. Bei Stickstoffmangel und Trockenheit, können haploide Zellen zu einem monokaryotischen Myzel mit nicht fusionierten Schnallen differenzieren (haploide Filamentbildung). Wie bei der Paarung, werden an den Filamentenden Basidien gebildet und Basidiosporen (hier allerdings nur von einem Paarungstyp) abgeschnürt. (Bild von Klaus Lengeler zur Verfügung gestellt)

Beim sexuellen Zyklus findet zunächst eine Paarung zwischen $MATa$ bzw. $MAT\alpha$ Hefezellen statt (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976). Bei Anwesenheit eines Paarungspartners, Trockenheit und unter Stickstoff limitierten Bedingungen bilden insbesondere *C. neoformans* $MAT\alpha$ Zellen einen dünnen, Filament-ähnlichen Konjugationsschlauch aus (Abbildung 1) (Alsbaugh *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Moore und Edman, 1993). *C. neoformans*

Zellen des Paarungstyps *MATa* bilden dagegen bei Anwesenheit von *MAT α* Zellen zumeist keinen Konjugationsschlauch aus, sondern vergrößern sich und runden sich ab. Nachdem die Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp fusioniert haben (Plasmogamie), bildet *C. neoformans* ein für Basidiomyzeten typisches, dikaryotisches Myzel aus (Abbildung 1). Dieses septierte Myzel ist charakterisiert durch das Vorhandensein zweier unverschmolzener Kerne pro Zelle, jeweils einer von den beteiligten Kreuzungspartnern (Dikaryon), sowie den so genannten Schnallen, die im Bereich der Septen zu erkennen sind. Durch die Bildung dieser Schnallen wird gewährleistet, dass bei den mitotischen Teilungen des Dikaryons beide Kerne korrekt auf Mutter- und Tochterzelle verteilt werden (Raper, 1966). Unter bestimmten Bedingungen differenzieren an den dikaryotischen Hyphen terminal Basidien, in denen anschließend die Karyogamie stattfindet, welche typischerweise sofort von der Meiose gefolgt wird (Abbildung 1). Im Gegensatz zu den meisten Basidiomyzeten teilen sich die vier haploiden Kerne der Basidie mehrfach mitotisch, und werden kontinuierlich vom terminalen Ende als Basidiosporen abgeschnürt. Dadurch bilden sich an der Basidie vier für *C. neoformans* charakteristische lange Ketten von Basidiosporen. Die Sporen einer Kette sind genetisch nicht identisch, da die haploiden Kerne zufällig zu Basidiosporen abgeschnürt werden (Kwon-Chung, 1980). Die Sporen können bei guten Wachstumsbedingungen anschließend wieder zu vegetativen Hefezellen auskeimen (Abbildung 1).

Wie bereits erwähnt ist das diploide Stadium von *C. neoformans* normalerweise sehr kurz und auf die Basidie beschränkt. In klinischen Studien und in der Natur konnten allerdings in seltenen Fällen *C. neoformans* Stämme isoliert werden, die den ungewöhnlichen hybriden Serotyp AD aufwiesen (s.o.). Eine Analyse dieser Serotyp AD Stämme zeigte, dass es sich um aneuploide oder diploide Hybride handelt, die heterozygot in ihrem *MAT*-Lokus sind und vermutlich durch Paarung von Serotyp A und Serotyp D Stämmen entstehen. Inter-Serotyp Kreuzungen durchlaufen scheinbar die sexuelle Differentiation zunächst normal, sind aber offensichtlich, bedingt durch ihre genetische Divergenz, nicht in der Lage, eine normale Meiose zu durchlaufen (Lengeler *et al.*, 2001), was zur Bildung diploider Sporen führt.

Neben den bereits beschriebenen Differenzierungen können haploide *C. neoformans* Stämme unter Stickstoff limitierten, trockenen Bedingungen (Wickes *et al.*, 1996) oder bei Kontakt mit Paarungspheromonen (Wang *et al.*, 2000) monokaryotische Filamente bilden (Abbildung 1). Diese Filamente weisen typischerweise nicht fusionierte Schnallen auf und bilden terminale Basidien, von denen sich genetisch identische Sporen abschnüren (Abbildung 1). Während die meisten *MAT α* Zellen gut filamentieren (Tscharke *et al.*, 2003), ist bei *MATa*

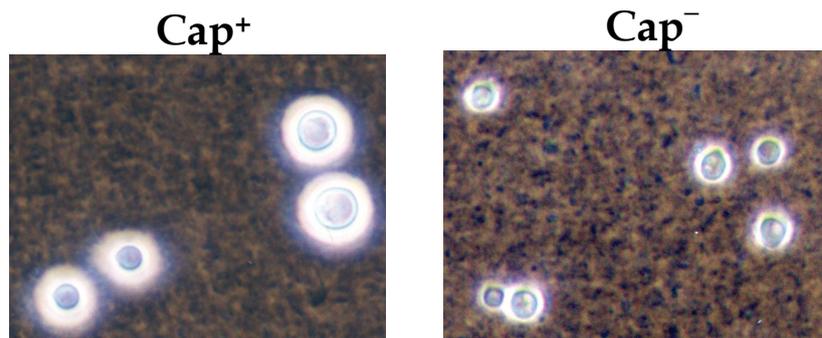
Zellen dieser morphologische Wechsel nur sehr schwach ausgeprägt. Dieser Umstand ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die aus der Natur und klinischen Studien isolierten *C. neoformans* Stämme hauptsächlich dem Paarungstyp *MAT α* angehören (Kwon-Chung und Bennett, 1978).

1.4. Die Virulenzfaktoren von *C. neoformans*

Wie bereits erwähnt infiziert *C. neoformans* das zentrale Nervensystem und kann dadurch eine schwere Meningoenzephalitis hervorrufen. Die Virulenz von *C. neoformans* wird mit vielen besonderen Eigenschaften verbunden, wie z. B. der Fähigkeit bei 37 °C zu wachsen (Cruz *et al.*, 2000), eine Polysaccharidkapsel zu bilden (Doering, 2000), Melanin zu produzieren (Polacheck, 1991) sowie bestimmte Enzyme in die Umgebung zu sekretieren (Chen *et al.*, 1997). Im Folgenden werden die wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. neoformans* näher vorgestellt.

1.4.1. Die Kapsel

Das auffälligste Merkmal von *C. neoformans* ist eine große Polysaccharidkapsel, die den gesamten Organismus umgibt und ihn von anderen pathogenen Hefen unterscheidet (Abbildung 2) (Doering, 2000). Die Kapselgröße kann zwischen 1 bis 50 μm liegen und hängt vom Stamm und von den gegebenen Umweltbedingungen ab.



Die Kapsel besteht zu 90 % aus Glukuronoxylomannan (GXM), linearen Ketten aus α -1,3-verknüpften Mannosen, die *O*-acetyliert

Abbildung 2: Kapsel

Kapselpolysaccharide sind ein wichtiger Virulenzfaktor bei *C. neoformans*. Stämme, die keine Kapsel mehr bilden können, sind vollständig avirulent. Wildtyp *C. neoformans* (Cap^+) und hypokapsuläre Mutanten (Cap^-) wurden unter Kapsel induzierenden Bedingungen angezogen und die Zellen mit Tusche gefärbt. Beim Wildtyp Stamm (Cap^+) ist die Kapsel als nicht gefärbter Hof um die Zellen herum, gut zu erkennen, während hypokapsuläre Mutantenstämme (Cap^-) nur von sehr schmalen Höfen umgeben sind. Vergrößerung: 200x. (Lengeler und Heitman, 2002)

oder mit einzelnen Xylose- oder β -Glukuronyl-Seitengruppen substituiert sein können (Bhattacharjee *et al.*, 1984; Cherniak und Sundstrom, 1994). Die Anzahl und

Zusammensetzung der Seitengruppen, und der Grad der Acetylierung definieren zum größten Teil die Serotypen von *C. neoformans*. Neben GXM gibt es kleinere Mengen an Galaktoxylomannan (GalXM) und Mannoproteinen. GalXM macht ca. 7 % der Kapsel aus und ist ein Polymer, das aus α -1,6-verknüpften Galaktosen mit [β -1,3-Galaktose- α -1,2-Mannose- α -1,2-Mannose] Verzweigungen und einer variablen Anzahl von β -1,4-Xylosyl-Resten besteht. Die Polysaccharide bilden ein komplexes, fibrilläres Netzwerk, das die Zelle umgibt, aber anscheinend nicht kovalent mit der Zellwand verbunden ist (Reiss *et al.*, 1986). Die Kapsel ist eine dynamische Struktur, die sich mit dem Wachstum der Zelle konstant verändert, wobei große Mengen des Kapselmaterials in die Umwelt abgegeben werden.

Eine Repression der Kapselproduktion ist bei hohen Salzkonzentrationen (~ 1 M) zu beobachten (Jacobson *et al.*, 1989), während bei niedriger Glukosekonzentration (Littman, 1958), Eisenmangel oder physiologischer Kohlendioxid-Konzentration eine starke Induktion der Kapselproduktion erfolgt (Vartivarian *et al.*, 1993). Interessanterweise entsprechen diese Bedingungen denen, denen *C. neoformans* im Wirt ausgesetzt ist. Während über die Biosynthese der Kapselpolysaccharide selber noch wenig bekannt ist (Doering, 2000), konnten zumindest einige Gene identifiziert werden, die für die Kapselbildung notwendig sind. So führen beispielsweise Mutationen in den Genen *CAP59*, *CAP60*, *CAP64* und *CAP10* dazu, dass die Zellen keine Kapsel mehr bilden können (Chang *et al.*, 1997; Chang und Kwon-Chung, 1994; Chang und Kwon-Chung, 1998; Chang und Kwon-Chung, 1999; Chang *et al.*, 1996).

Die biologische Bedeutung der Kapsel von *C. neoformans* ist immer noch unklar, liegt aber vermutlich in dem Schutz der Zelle vor Austrocknung (Neilson *et al.*, 1978) sowie vor der Phagozytose durch natürliche Fressfeinde (z. B. Amöben). Hinsichtlich der Pathogenität von *C. neoformans* ist die Kapsel essentiell für die Virulenz des Pathogens. Mutanten, die keine Kapsel mehr bilden können (*Cap⁻*), sind avirulent (Hull und Heitman, 2002). Die Polysaccharidkapsel inhibiert vermutlich die Phagozytose der Hefezellen durch aktivierte Immunzellen der zellvermittelten Immunität (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen), der wichtigste Verteidigungsmechanismus des Wirts gegen *C. neoformans* (Kozel und Gotschlich, 1982; Kozel *et al.*, 1988), und fördert das intrazelluläre Überleben durch Inhibierung der Verdauung in den Phagolysosomen (Goldman *et al.*, 2000). Zusätzlich liefert die Kapsel eventuell einen passiven Schutz vor Komponenten des Komplementsystems.

1.4.2. Melanin

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von *C. neoformans*, die eng mit seiner Virulenz verknüpft ist, ist die Fähigkeit den Farbstoff Melanin zu produzieren (Abbildung 3) (Polacheck, 1991; Williamson, 1997). Melanin ist ein sehr heterogenes Molekül, das aus

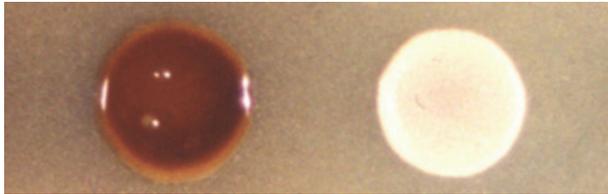


Abbildung 3: Melaninproduktion

C. neoformans Zellen produzieren das dunkelbraune Pigment Melanin (links: Mel⁺). Stämme, die einen Defekt in der Melaninproduktion haben, zeigen einen Albino-ähnlichen Phänotyp (rechts: mel⁻). (Lengeler und Heitman, 2002)

verschiedenen Di-Phenol-Vorläufern, wie L-Dopamin (L-DOPA) synthetisiert wird (Salas *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu anderen Melanin produzierenden Organismen ist *C. neoformans* allerdings nicht in der Lage Melanin *de novo* aus L-Tyrosin herzustellen, und ist daher auf entsprechende Vorläufermoleküle

angewiesen, die in der Umwelt bereitgestellt werden. Diese Tatsache wird in diagnostischen Tests ausgenutzt, um *C. neoformans* zu identifizieren.

Durch genetische Analysen von Melanin Mutanten (mel⁻) konnten über die Jahre sieben Komplementationsgruppen identifiziert werden, die in die Pigmentproduktion involviert sind (Torres-Guererro und Edman, 1994). Eine dieser Komplementationsgruppen konnte dem Enzyme Laccase zugeordnet werden, einer Phenoloxidase, die den limitierenden Schritt bei der Biosynthese des Melanins katalysiert. Die Synthese von Melanin ist ähnlich der Kapsel komplex reguliert, und interessanterweise liegen im Gehirn optimalen Bedingungen für die Melaninproduktion vor: niedriger Glukoselevel aber hohe L-Dopamin-Konzentrationen (Polacheck und Kwon-Chung, 1988).

Ähnlich der Kapsel-Mutanten sind Stämme, die nicht in der Lage sind Melanin zu produzieren, deutlich weniger virulent. Der Schutz, den Melanin den Zellen verleiht, beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten Toleranz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, da Stämme ohne Melanin deutlich anfälliger gegenüber Sauerstoff- oder Stickstoffoxidantien sind (Salas *et al.*, 1996). Diese erhöhte Toleranz schützt die *C. neoformans* Zellen vermutlich vor dem „oxidative burst“ der Makrophagen und Neutrophilen (s.o.). Die biologische Bedeutung der Melanin-Produktion liegt vermutlich im Schutz vor negativen Umwelteinflüssen, wie z. B. Schutz vor UV-Licht und extremen Temperaturen (Rosas und Casadevall, 1997; Wang und Casadevall, 1994). Zudem wird Melanin in die innere Schicht der Zellwand eingelagert und könnte so eine Rolle bei der Zellwandintegrität spielen.

1.4.3. Paarungstyp

Im Gegensatz zu den meisten Basidiomyzeten, die ein tetrapolares Paarungstypsystem aufweisen, hat *C. neoformans* ein bipolares Paarungstypsystem mit nur zwei Paarungstypen: *MATa* und *MAT α* . Die Mehrheit der Stämme, die bisher aus der Natur isoliert wurden, und nahezu alle klinischen Isolate besitzen den Paarungstyp *MAT α* (40:1) (Kwon-Chung und Bennett, 1978). Die Tatsache, dass *MAT α* Stämme deutlich besser haploide Filamente bilden können als *MATa* Stämme, lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass es eine Verbindung zwischen Paarungstyp und Virulenz geben könnte (Wickes *et al.*, 1996). Die bei der Bildung haploider Filamente entstehenden Basidiosporen sind klein genug, um durch Inhalation bis in die Lungenalveolen zu gelangen und eine Infektion auszulösen (s.o.). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Tiermodellen *MAT α* Stämme im Schnitt virulenter sind als *MATa* Stämme (Kwon-Chung *et al.*, 1992). In neueren Studien konnte außerdem festgestellt werden, dass bei einer Koinfektion von *MATa* und *MAT α* Stämmen der Varietät *grubii* in einem Maus-Modell beide Stämme in peripherem Gewebe (Lunge, Milz) in gleicher Zahl zu finden sind, wohingegen die *MAT α* Zellen aber vermehrt in das zentrale Nervensystem eindringen (Nielsen *et al.*, 2005). Die *MAT α* Zellen verhindern scheinbar auf eine bisher ungeklärte Weise, dass die *MATa* Zellen ebenfalls in das zentrale Nervensystem eindringen können.

Der Paarungstyplokus in *C. neoformans* wurde inzwischen charakterisiert und umfasst eine Region von mehr als 100 kb. Er kodiert dabei für mindestens 20 Proteine, unter anderem für Paarungspheromone, Pheromonrezeptoren, verschiedene Komponenten einer MAP-Kinase-Kaskade, sowie einer Reihe von Proteinen mit keiner offensichtlichen Funktion für die sexuelle Differenzierung (Lengeler *et al.*, 2002) (Fraser *et al.*, 2004). Eine Erklärung für die Unterschiede bezüglich der Virulenz von *MATa* und *MAT α* Stämmen konnte bislang allerdings nicht gefunden werden.

1.4.4. Extrazelluläre Enzyme

Neben der Kapselproduktion, Melaninsynthese und der Fähigkeit bei 37 °C wachsen zu können, wurden weitere Faktoren identifiziert, die die Virulenz von *C. neoformans* beeinflussen. So konnten unter anderem einige sekretierte Enzyme (Proteasen, Esterasen und Lipasen) identifiziert werden (Chen *et al.*, 1996), von denen in anderen Organismen entsprechende Orthologe identifiziert werden konnten, die dort mit der Virulenz assoziiert

sind. So konnten extrazelluläre Proteaseaktivitäten identifiziert werden (Aoki *et al.*, 1994; Brueske, 1986; Chen *et al.*, 1996), die möglicherweise die Virulenz von *C. neoformans* unterstützen, indem bei einer Infektion durch sie Gewebe des Wirts oder wichtige immunologische Proteine zerstört werden. Ein weiteres Beispiel für die Verbindung eines sekretierten Enzyms mit der Virulenz ist das Harnstoff-abbauende Enzym Urease. *C. neoformans* Stämme mit einem Defekt in der Urease sind weniger virulent (Cox *et al.*, 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *C. neoformans* eine extrazelluläre Phospholipaseaktivität existiert, die ebenso wie bei *C. albicans* (Leidich *et al.*, 1998), für die Virulenz von *C. neoformans* von Bedeutung ist (Cox *et al.*, 2001). Wie aus den vorherigen Abschnitten ersichtlich wurde, wird die Virulenz des opportunistisch pathogenen Pilzes *C. neoformans* hauptsächlich durch extrazelluläre Faktoren bestimmt, wie z. B. der Polysaccharid-Kapsel, verschiedenen extrazellulären Enzymen, Oberflächenantigenen oder dem Pigment Melanin. Wie die meisten Proteine, so wird auch die Biosynthese, Lokalisierung und Funktion der extrazellulären Proteine sehr stark durch post-translationale Modifizierungen beeinflusst. Eine der wichtigsten post-translationalen Protein-Modifikationen, die hauptsächlich sekretierte und zellmembranassoziierte Proteine betrifft, ist die Glykosylierung, das Anhängen von „Zucker“-Resten an Proteine.

1.5. Glykosylierung

Die Glykosylierung von Proteinen stellt, wie gerade erwähnt, eine der wichtigsten, und auch essentiellen Formen der post-translationalen Proteinmodifikationen dar, und ist hoch konserviert. Die beiden Hauptformen der Protein-Glykosylierung sind die *N*- bzw. die *O*-Glykosylierung, wobei aber zusätzlich seltenere Formen wie beispielsweise die *C*- oder die *P*-Glykosylierung existieren (Spiro, 2002). Sowohl die *N*- als auch die *O*-Glykosylierung erfolgen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) während die entsprechenden Zielproteine den sekretorischen Syntheseweg durchlaufen.

Bei der *N*-Glykosylierung wird zunächst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch eine Familie von spezifischen Mannosyltransferasen (ALG-Familie; Asparagine Linked Glycosylation) an dem Isoprenederivat Dolicholphosphat eine Zuckergrundstruktur aus insgesamt 14 Zuckerresten (Glc3-Man9-GlcNAc2) synthetisiert. Die Synthese der Zuckergrundstruktur an dem membranständigen Dolicholphosphat wird unter Verwendung von aktivierten Zuckerdonoren (Derivate von UDP, GDP und Dolicholpyrophosphat)

zunächst im Zytoplasma begonnen, wohingegen die Reifung der Struktur nach einem komplexen „flip-flop“-Mechanismus im ER-Lumen erfolgt. Die so entstandene verzweigte Zuckerstruktur wird anschließend ko-translational an Asparaginreste des Zielproteins in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr angeheftet. Die Anheftung der Zuckergrundstruktur wird von einem Enzymkomplex, dem Oligo-Saccharyl-Transferase- (OST) Komplex durchgeführt (Tanner und Lehle, 1987). Die weitere Prozessierung der N-Glykane erfolgt im Golgi-Apparat und ist, im Gegensatz zur Anheftung der Grundstruktur im ER, in Säugern und Hefen unterschiedlich (Tanner und Lehle, 1987).

Ähnlich der N-Glykosylierung verläuft die initiale Reaktion der O-Glykosylierung in Hefen wahrscheinlich ko-translational während des Transports der Zielproteine durch die Sekretionspore in das ER-Lumen (Haselbeck und Tanner, 1983; Tanner und Lehle, 1987). In höheren Eukaryoten erfolgt dagegen die Masse der O-Glykosylierung typischerweise post-translational im Golgi-Apparat (Abeijon und Hirschberg, 1987). Zudem bestehen die Glykosylketten in höheren Eukaryoten häufig aus Sialinsäure und Galaktose (Hanisch, 2001), aber auch aus Zuckern wie Xylose und Fucose (Nishimura *et al.*, 1992), wohingegen in den Pilzen ausschließlich Mannosen O-glykosidisch an die Zielproteine angehängt werden. Bei dem zuerst angehefteten Zucker der Glykosylketten höherer Eukaryoten handelt es sich um N-Acetylgalaktosamin (GalNAc).

Bei der O-Glykosylierung werden Zucker O-glykosidisch an Serin- oder Threonin-Reste des entsprechenden Akzeptorproteins gebunden. Dabei ergeben sich bei den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae* im Gegensatz zur N-Glykosylierung ausschließlich unverzweigte, α -1,2-verknüpfte O-Mannosylketten (Herscovics und Orlean, 1993).

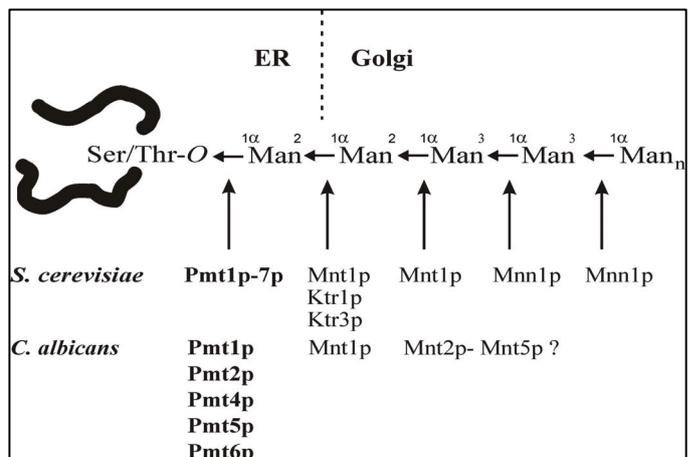


Abbildung 4: Protein-O-Glykosylierung in *S. cerevisiae* und *C. albicans*

Die Initialreaktion wird im ER durch Protein-O-mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert. Die Kettenelementation findet im Golgi statt. Die Mannosylketten können eine Länge von bis zu 5 Mannosen in *S. cerevisiae* und bis zu 7 in *C. albicans* haben. Der am häufigsten zu findende Typ besteht aus zwei Mannosen. (Ernst und Prill, 2001)

Der erste Reaktionsschritt der O-Glykosylierung findet im ER-Lumen statt und wird durch die so genannten Protein-O-mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert (siehe Kapitel 1.6). Dabei wird von dem aktivierten Zucker Dol-P- β -D-Mannose der Mannosyl-Rest auf das Zielprotein übertragen. Der aktivierte Zucker wird vorher im Cytoplasma von der in der ER-Membran

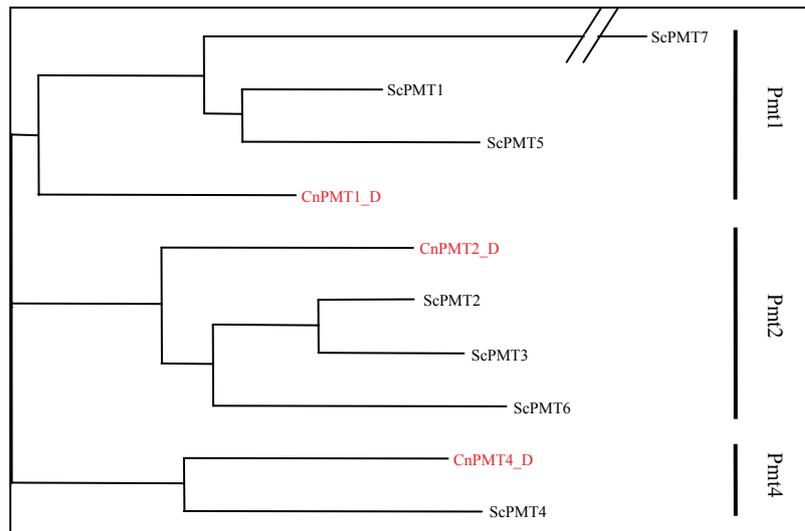
verankerten Dolichol-P-Mannose-Synthase (Dpm1) durch den Transfer einer Mannose von GDP-Mannose auf Dolichol-Phosphat synthetisiert (Orlean, 1990; Orlean *et al.*, 1988). Die Reifung der *O*-Glykosylierung erfolgt abschließend im Golgi-Apparat und wird durch weitere lösliche Mannosyltransferasen (Ktr-, Mnt-, bzw. Mnn-Proteinfamilie) katalysiert (Abbildung 4). Es konnte gezeigt werden, dass die Mannosylketten bei *S. cerevisiae* aus bis zu fünf- bzw. bei *C. albicans* aus bis zu sieben Mannosen bestehen können (Hayette *et al.*, 1992), wobei allerdings der Großteil der *O*-Glykosylierungen aus nur zwei Mannosyl-Resten besteht (Buurman *et al.*, 1998).

Eine eindeutige Konsensussequenz für die *O*-Glykosylierung konnte im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung bei Zielproteinen bisher nicht identifiziert werden, obwohl Serine und Threonine bevorzugt werden, die von Prolinen an der -1 und/oder +3 Position flankiert werden (Wilson *et al.*, 1991). Des Weiteren weisen die Zielproteine i.d.R. Serin/Threoninreiche Bereiche auf, in denen zumeist auch die Glykosylierung der Proteine erfolgt. Möglicherweise gibt es allerdings mehrere Konsensussequenzen für die *O*-Glykosylierung, da gezeigt wurde, dass ScPmt-Proteine zum Teil eine gewisse Substratspezifität aufweisen (Gentzsch und Tanner, 1997).

1.6. Protein-*O*-mannosyltransferasen

Der erste Schritt der Protein-*O*-Glykosylierung in Pilzen wird durch Protein-*O*-Mannosyltransferasen katalysiert. Diese Protein-Familie ist hoch konserviert und ist entgegen der bisherigen Annahme nicht ausschließlich auf das Reich der Pilze beschränkt. So konnten diese Enzyme vor kurzem auch in bestimmten Prokaryonten (Mahne *et al.*, 2006) und Tieren identifiziert werden (Willer *et al.*, 2003). Allerdings wurden die Pmt-Proteine bislang am ausführlichsten in den Hefen *S. cerevisiae* bzw. *C. albicans* charakterisiert. In *S. cerevisiae* konnten insgesamt sieben Pmt-Proteine, in *C. albicans* fünf (Ernst und Prill, 2001; Gentzsch und Tanner, 1997), in *Drosophila* und Säugern aber nur jeweils zwei Pmt-Proteine (Jurado *et al.*, 1999; Lyalin *et al.*, 2006; Manyá *et al.*, 2006; Willer *et al.*, 2004) identifiziert werden. Die Pmt-Proteine können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in drei Subfamilien, Pmt1, Pmt2 und Pmt4, eingeteilt werden (Abbildung 5).

Die Pmt Proteine sind hoch konservierte Enzyme, und obwohl die Pmt-Proteine eines einzelnen Organismus beträchtlich in ihrer Länge variieren können, weisen sie alle die gleiche Struktur auf. Die Proteine besitzen sieben Transmembrandomänen, wobei das aminoternale



Ende des Proteins in das Zytoplasma und das carboxyterminale Ende in das

Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum der Pmt-Proteine

Die Protein-O-Mannosyltransferasen werden in die drei Subfamilien, Pmt1, Pmt2 und Pmt4, eingeteilt. Die Einteilung beruht auf der Proteingleichartigkeit. Die Proteinsequenzen der Pmt-Proteine von *S. cerevisiae* und *C. neoformans* wurden mit Hilfe von VektorNTI erstellt.

ER-Lumen ragen (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion liegt eine große Schleife, die im ER-Lumen liegt und für die Enzymaktivität der Pmt-Proteine unabdingbar ist (Girrbach *et al.*, 2000).

Die Pmt-Proteine sind vermutlich in Form von Dimeren, entweder als Homo- oder Heterodimere, aktiv. So konnte in Hefe die maximale Enzymaktivität der Pmt-Proteine nur bei Bildung von spezifischen Dimeren beobachtet werden (Gentzsch *et al.*, 1995; Girrbach und Strahl, 2003). Dabei bilden Mitglieder der Pmt1-Subfamilie bevorzugt Heterodimere mit Proteinen der Pmt2-Subfamilie, wohingegen Pmt4p ausschließlich Homodimere zu bilden scheint (Girrbach und Strahl, 2003). Für humane Zelllinien und *Drosophila* konnte nur bei einer Koexpression der beiden entsprechenden Proteinmannosyltransferasen POMT1 und POMT2, bzw. *rotated abdomen* und *twisted*, eine Enzymaktivität nachgewiesen werden (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006; Ichimiya *et al.*, 2004; Manyá *et al.*, 2006; Manyá *et al.*, 2004)

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine essentielle Proteinmodifikation. In *S. cerevisiae* sind vermutlich aufgrund der großen Zahl von Protein-Mannosyltransferasen und entsprechender redundanter Funktionen die *pmt*-Einzelmutanten alle lebensfähig. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bestimmte Dreifachmutanten sowie einige Doppelmutanten letal oder nur bei osmotischer Stabilisierung lebensfähig sind (Gentzsch und Tanner, 1996). Andere Mutanten zeigen wiederum auffallende Phänotypen unter spezifischen Bedingungen, wie z. B. Resistenz gegenüber Killertoxin oder Sensitivität gegenüber Zellwanddestabilisierenden Substanzen, Koffein oder einer erhöhten Wachstumstemperatur (Gentzsch

und Tanner, 1996; Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). In ähnlicher Weise sind auch in *S. pombe* und *C. albicans* bestimmte Mutationen synthetisch letal (Ernst und Prill, 2001; Willer *et al.*, 2005) oder zeigen Wachstumsdefekte unter spezifischen Bedingungen. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist aber in diesen Organismen bereits eine Einzeldelation des *PMT2*-Gens letal (Prill *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte bei *C. albicans* für alle *pmt*-Mutationen auch ein negativer Einfluss auf die Virulenz nachgewiesen werden (Prill *et al.*, 2005) (Rouabhia *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu den pilzlichen Pmt-Proteinen ist über die Pmt-Proteine der höheren Eukaryoten bisher nur recht wenig bekannt. Wie bereits erwähnt gibt es in Säugern bzw. in *Drosophila* nur zwei Protein-O-Mannosyltransferasen, die zum einen zur Subfamilie Pmt2 (POMT2p) und zum anderen zur Subfamilie Pmt4 (POMT1p) (Jurado *et al.*, 1999; Lyalin *et al.*, 2006; Willer *et al.*, 2002) gehören, und nur bei einer Koexpression Pmt-Aktivität zeigen (Ichimiya *et al.*, 2004) (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006; Manyá *et al.*, 2006; Manyá *et al.*, 2004). Mutationen in den *Drosophila* POMT-Genloci „rotated abdomen“ (*rt*, *POMT1*) bzw. „twisted abdomen“ (*tw*, *POMT2*) führen zu einer Verdrehung von abdominalen Segmenten während der Larvalentwicklung, und zu einer gestörten Muskelentwicklung im Embryo, aber auch im adulten Organismus (Lyalin *et al.*, 2006). In ähnlicher Weise spielen auch die POMTs bei Säugetieren vermutlich in der Muskel- und Nervenentwicklung eine herausragende Rolle (Endo, 2004) und werden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht (Walker-Warburg-Syndrom (WWS), Muscle-Eye-Brain Erkrankung (MEBD)).

Mit Ausnahme der drei oben genannten Hefen sind die Protein-Mannosyltransferasen in anderen Pilzen bislang kaum charakterisiert worden. Einzig für die filamentösen Ascomyzeten *Trichoderma reesei*, sowie *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus awamori* konnte jeweils ein Pmt2-Homolog identifiziert werden. Mutationen in den entsprechenden Genen führten zu Defekten in der Glykosylierung spezifischer Proteine, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen Zellwand-destabilisierenden Substanzen, wie z. B. Calcofluor White oder Kongo Rot, sowie zu einer zum Teil veränderten Hyphenmorphologie (Oka *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2005; Zakrzewska *et al.*, 2003).

Vor kurzem konnte durch eine Genomanalyse im Basidiomyceten *C. neoformans* ein Mitglied der Pmt4-Subfamilie in der *C. neoformans* Varietät *grubii* identifiziert werden. Eine erste Untersuchung des *PMT4* Gens hat ergeben, dass dessen Disruption zu einer anormalen Zellmorphologie führt, sowie Probleme bei der Zellteilung auslöst. Des Weiteren konnte

gezeigt werden, dass die Pmt4 Aktivität für das Wachstum, die Zellwandintegrität und eine vollständige Virulenz benötigt wird (Olson *et al.*, 2007).

1.7. Zielsetzung

Aufgrund der stetig steigenden Zahl an immunsupprimierten Patienten sowie der zunehmenden Resistenzbildung bei pathogenen Mikroorganismen bekommt die Suche nach neuen Angriffspunkten für die Entwicklung zusätzlicher Antibiotika eine immer größere Bedeutung. In diesem Zusammenhang spielt das Verständnis von spezifischen Virulenzfaktoren sowie deren Zusammenwirken in einem pathogenen Organismus eine große Rolle. Wie für viele pathogene Organismen, so konnte auch für *C. neoformans* gezeigt werden, dass seine Virulenz im Wesentlichen von extrazellulären Faktoren bzw. Proteinen bestimmt wird. Typischerweise werden sekretierte und zellmembranassoziierte Proteine oftmals durch Glykosylierungen, das Anhängen von „Zucker“-Resten, post-translational modifiziert. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass Defekte in der Protein-Glykosylierung negative Auswirkungen auf die Virulenz pathogener Organismen haben. Eine insbesondere für Pilze typische Form der Glykosylierung ist die durch Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) katalysierte *O*-Glykosylierung bzw. *O*-Mannosylierung von Proteinen. Interessanterweise konnte für die pathogene Hefe *C. albicans* bereits gezeigt werden, dass die Protein-*O*-Glykosylierung einen bedeutenden Effekt auf die Virulenz der Hefe hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Protein-*O*-Glykosylierung auf die Lebensfähigkeit, die spezifischen Virulenzfaktoren sowie die Pathogenität des humanpathogenen Basidiomyzeten *C. neoformans* zu untersuchen. Dieses sollte durch eine Charakterisierung der Protein-*O*-Mannosyltransferase (PMT) Genfamilie erfolgen. Zu diesem Zweck sollten durch Insertionsmutagenese für *C. neoformans* var. *grubii* bzw. var. *neoformans* Mutanten der drei Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferasen hergestellt werden, die im Anschluss phänotypisch charakterisiert werden sollten. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auf die verschiedenen Virulenzfaktoren von *C. neoformans* gelegt werden, aber auch veränderte Zellmorphologie oder veränderten Sensitivitäten gegenüber Antimykotika oder Stress-auslösenden Substanzen sollte untersucht werden. Außerdem sollten Virulenztests mit Makrophagen-Zelllinien, sowie mit dem Modell-Organismus Maus durchgeführt werden, um etwaige Veränderungen in der Pathogenität der verschiedenen *pmt*-Mutanten zu untersuchen.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.

Chemikalie	Hersteller
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin (DOPA)	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)	Fermentas
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (X-phosphat)	Roche
Adenin	Serva
Agarose	peQLab
Ampicillin	Roth
Bacto Agar	BD
Bacto Pepton	BD
Bacto Trypton	BD
Bacto Yeast Extract	BD
Bromphenolblau	Serva
Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1)	J.T.Baker/Riedel-deHaën
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Eppendorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	BD
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	VWR
Dithiothreitol (DTT)	MP Biomedicals
DMEM (Minimal essential medium)	Invitrogen
Essigsäure	Riedel-deHaën
Ethanol (96 %)	Riedel-deHaën
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Merck AG

Chemikalie	Hersteller
Glukose Monohydrat	Caesar & Loretz GmbH
Glyzerin	Roth
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma
Isopropanol	VWR
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	J.T.Baker
Kaliumchlorid (KCl)	VWR
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck AG
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Serva
Kanamycin	Serva
L-Asparagin	Fluka BioChemika
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka Chemika
Maleinsäure	Merck AG
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck AG
Natriumacetat (NaOAc)	Merck AG
Natriumchlorid (NaCl)	J.T.Baker
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	J.T.Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	J.T.Baker
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck AG
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
n-Butanol	Acros Organics
NCTC 109 (Zellkulturmedium)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Phenol / Chloroform	Merck/J.T.Baker
Salzsäure (HCl)	Riedel-deHaën
Sorbitol	Sigma
Triton-X 100	Merck AG
Trizma base (Tris)	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Invitrogen
Tween 20	Merck AG

Chemikalie	Hersteller
Uracil	Sigma

2.2. Enzyme:

2.2.1. Restriktionsendonukleasen:

Tabelle 1: Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	Roche
<i>Bg</i> II	A↓GATCTC	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	Roche
<i>Eco</i> RV	GAT↓ATC	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	Roche
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	New England Biolabs
<i>Nsi</i> I	ATGCA↓T	New England Biolabs
<i>Pst</i> I	CTGCA↓G	Roche
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	New England Biolabs
<i>Xma</i> I	C↓CCGGG	New England Biolabs
<i>Xmn</i> I	GAAN ₂ ↓N ₂ TTC	New England Biolabs

Der Pfeil gibt die Schnittstelle innerhalb der Erkennungssequenz an.

2.2.2. Polymerasen und DNA/RNA modifizierende Enzyme:

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	selbst hergestellt
Takara EX- <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Takara
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas

RNase A	Qiagen
---------	--------

2.2.3. Andere Enzyme

Nukleasen	Hersteller
DNase I (RNase frei)	Sigma
RNase A	Qiagen
Weitere Enzyme	Hersteller
Lysing Enzymes aus <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma

2.3. *sonstige Materialien:*

Material	Firma
λ -Phagen-DNA	Fermentas
0,6 μ m Gold Microcarriers	BioRAD
1300 psi Rupture Discs	BioRAD
50 und 15 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Falcon (BD), Sarstedt, Greiner
Elektroporationsküvetten	Thermo Electron Corporation
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen)	Costar
Glasperlen (0,45-0,5 mm)	VWR
Kulturflaschen: Polystyrene-Flaschen, 80 cm ² /260 ml, steril	Nunc
Macrocarriers	BioRAD
Stopping Screens	BioRAD
Urease Scheiben	BD
Zellschaber: 23 cm	Nunc

2.4. *Geräte und Maschinen*

Gerät	Hersteller
Biofuge pico (mit Heraeus Sepatech-Rotor #37557)	Heraeus
Megafuge 1.0 (mit Tragringrotor #3360 und Schwenkbecherrotor #3471)	Heraeus

Thermal Cycler	Biometra
Photometer DU-800 Spectrophotometer	Beckmann
Schüttler Polymax 2040	Heidolph
Speed-Vac Vakuum-Konzentrator	Thermo
Elektrophorese Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech
Elektrophorese Power Pack 35/60	Phase
Biolistic PDS-1000/He	BioRAD

2.5. Kits

Kit	Hersteller
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
pCR [®] II-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit	Amersham biosciences
PCR DIG Labeling	Roche
DIG DNA Labeling Kit	Roche
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche

2.6. Stämme und Zelllinien

2.6.1. Bakterienstämme:

Tabelle 2: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
XL1-Blue	F ⁻ [Φ80Δ(<i>lacZ</i>)M15] Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA1 relA</i>	(Hanahan, 1983) (Bullock <i>et al.</i> , 1987)
DH5αF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

2.6.2. Hefestämme:

Tabelle 3: *Cryptococcus neoformans* Serotyp A

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
H99	Wildtyp <i>MATα</i>	(Toffaletti <i>et al.</i> , 1993)
F99	<i>MATα ura5</i> (5-FOA resistentes Isolat von H99)	Ping Wang (Heitman-Labor)
SW13	<i>MATα pmt1::URA5</i>	diese Arbeit
SW14	<i>MATα pmt4::URA5</i>	diese Arbeit
SW15	<i>MATα pmt1::URA5 PMT1-Neo^R</i>	diese Arbeit
SW16	<i>MATα pmt4::URA5 PMT4-Neo^R</i>	diese Arbeit

Tabelle 4: *Cryptococcus neoformans* Serotyp D

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
JEC20	Wildtyp <i>MATα</i>	(Heitman <i>et al.</i> , 1999)
JEC21	Wildtyp <i>MATα</i>	(Heitman <i>et al.</i> , 1999)
JEC155	<i>MATα ade2-27 ura5</i>	Jeff Edman
JEC156	<i>MATα ade2-27 ura5</i>	Jeff Edman
JEC34	<i>MATα ura5</i>	Jeff Edman

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
JEC43	<i>MATα ura5</i>	Jeff Edman
JEC50	<i>MATα ade2-27</i>	Jeff Edman
SW1	<i>MATα pmt1::ADE2</i>	diese Arbeit
SW2	<i>MATα pmt1::ADE2</i>	diese Arbeit
SW4	<i>MATα pmt1::URA5 ade2-27</i>	diese Arbeit
SW5	<i>MATα pmt1::URA5</i>	diese Arbeit
SW6	<i>MATα pmt1::URA5</i>	diese Arbeit
SW7	<i>MATα pmt4::ADE2 ura5</i>	diese Arbeit
SW8	<i>MATα pmt4::ADE2</i>	diese Arbeit
SW9	<i>MATα pmt4::ADE2</i>	diese Arbeit
SW10	<i>MATα pmt4::URA5 ade2-27</i>	diese Arbeit
SW11	<i>MATα pmt4::URA5</i>	diese Arbeit
SW12	<i>MATα pmt4::URA5</i>	diese Arbeit
SW17	<i>MATα pmt1::URA5 PMT1-Neo^R</i>	diese Arbeit
SW18	<i>MATα pmt4::URA5 PMT4-Neo^R</i>	diese Arbeit
SW19	<i>MATα pmt4::ADE2 ura5</i>	diese Arbeit

2.6.3. Zelllinien

Für den Makrophagen Phagozytose/Tötungstest wird die Makrophagen Zelllinie J774A.1 (ECACC Nr.: 91051511; ATCC Nr.: TIB 67), eine murine (BALB/c) Makrophagen –Zelllinie verwendet.

2.7. Medien

2.7.1. Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB (Vollmedium):

10 g Trypton (1 %)
5 g Hefeextrakt (0,5 %)
5 g NaCl (0,5 %)

auf 1 l mit H₂O (pH 7.0) auffüllen, lösen und autoklavieren.

Bei der Herstellung von festen Nährböden wurden 20 g Agar (2 %) zugesetzt. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenzen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin bzw. Kanamycin in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

Für eine Blau/Weiß-Selektion wurden 20 µl IPTG (100 mM) und 35 µl X-Gal (50 mg/ml) vor dem Ausplattieren der Zellen auf die Platten gestrichen und 20 min getrocknet.

IPTG: 0,1 g in 5 ml ddH₂O lösen, bei -20 °C lagern
X-Gal: 0,25 g in 5 ml DMF lösen, bei -20 °C lagern

SOB-Medium:

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
0,186 g KCl

auf 1 l mit dH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

2.7.2. Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium):

10 g Hefeextrakt (1 %)

20 g Peptone (2 %)

20 g Glukose (2 %)

auf 1 l mit dH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Festes Medium wurde durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt.

SD „Synthetic dextrose“ Medium (Minimalmedium):

6,7 g YNB (0,67 %)

20 g Glukose (2 %)

auf 900 ml mit H₂O auffüllen, pH 6,9 mit NaOH einstellen,

lösen und autoklavieren.

Nach Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren entsprechende Aminosäuren zugegeben (SC „Synthetic complex“ + AS-Mix). Dazu wurde eine Stocklösung der benötigten Aminosäuren hergestellt, in der Aminosäuren je nach Bedarf weggelassen wurden.

Festes Medium wurde durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt.

Aminosäuremix (Zimmermann, 1975) (10x):

pro 1 l destilliertem Wasser

Adenin	0,28 g	Leucin	1,44 g	Tyrosin	0,72 g
--------	--------	--------	--------	---------	--------

Arginin	0,48 g	Methionin	0,48 g	Urazil	0,48 g
---------	--------	-----------	--------	--------	--------

Histidin	0,48 g	Phenylalanin	1,2 g	Valin	0,72 g
----------	--------	--------------	-------	-------	--------

Isoleucin	1,44 g	Threonin	0,72 g		
-----------	--------	----------	--------	--	--

Lysin	0,72 g	Tryptophan	0,48 g		
-------	--------	------------	--------	--	--

Von diesem 10x Aminosäuremix wurden 50 ml pro 1 l Medium zugesetzt. Zur Herstellung fester Medien wurden 20 g/l Agar (2 %) zugegeben. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30 °C.

Medien mit verschiedenen Substanzen:

Zur phänotypischen Charakterisierung der verschiedenen *C. neoformans* Stämme wurde deren Sensitivität gegenüber verschiedene Chemikalien getestet. Dazu wurden SD- oder YPD-Platten angefertigt, denen nach dem Autoklavieren die entsprechenden Chemikalien in den angegebenen Konzentrationen (Tabelle 5) zugesetzt wurden. Der Agar wurde vor Zugabe der zu testenden Substanzen auf mindestens 50 °C abgekühlt.

Tabelle 5: Testsubstanzen und ihre Konzentrationen

Testsubstanz	Firma	Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Calcofluor White	Sigma	25 mg/ml	dH ₂ O	10 µg/ml
Kongo Rot	Sigma	20 mg/ml	dH ₂ O	400 µg/ml
G418	Calbiochem	50 mg/ml	dH ₂ O	1-2 mg/ml
H ₂ O ₂	Merck	30 %	dH ₂ O	5 µl/25ml
Hygromycin B	Calbiochem	398 mg/ml	dH ₂ O	10-40 µg/ml
Koffein	Sigma	100 mM	dH ₂ O	10-20 mM
NaCl	Roth	-	-	0,7 – 1 M
SDS	Serva	10 %	dH ₂ O	0,01 – 0,02 %

V8 Platten (Kreuzungsmedium):

50 ml V8 Multivitaminsaft (CSC Brands, L.P.)

0,5 g KH₂PO₄

40 g Agar

950 ml dH₂O

pH-Wert auf 7,0 – 7,2 mit 5 M KOH Lösung einstellen. Mindestens 40 min autoklavieren und Platten sofort gießen.

Egg Yolk agar:

6,7 g YNB (0,67 %)

20 g Glukose (2 %)

58,44 g NaCl (1M)

0,56 g CaCl₂

20 g Agar

auf 1 l mit dH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Wenn das Medium auf unter 60 °C abgekühlt ist, aber der Agar noch flüssig ist, werden 100 ml Eigelb-Lösung (10 % Lösung zuvor 2 min bei 500x g abzentrifugieren) in das Medium gegeben. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden können noch 25 µg/ml Ampicillin zugegeben werden.

Eagles Medium:

13,5 g DMEM Pulver (mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin und Natrium-Pyruvat, ohne Natrium-Bicarbonat)

22 mM NaHCO₃

25 mM MOPS

auf 1 l mit dH₂O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Niger Seed Platten (Melanin-Medium):

70 g Niger Seed (Samen der Aster *Guizotia abyssinica*) wurden in einer Kaffeemühle gemahlen, 350 ml dH₂O zu dem Mehl geben und die Suspension in einer 500 ml Flasche für ca. 15 min autoklaviert. Der Extrakt wird anschließend durch Leinentücher gefiltert und auf 1 l mit dH₂O aufgefüllt. Anschließend wurden 1 g Glukose und 20 g Agar hinzugefügt, für ca. 40 min autoklaviert und die Platten sofort gegessen.

Glukosefreies Asparagin-Medium (Melanin-Medium):

1 g L-Asparagin

0,5 g MgSO₄x7H₂O

3 g KH₂PO₄

1 mg Thiamin

in 1 l dH₂O lösen und autoklavieren. Unmittelbar vor dem Gebrauch 1 mM L-DOPA zugeben.

2.7.3. Medien zur Anzucht von Zelllinien**Makrophagen Medium:**

390 ml DMEM Medium

50 ml NCTC 109
 50 ml FKS
 5 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren
 5 ml Penicillin-Streptomycin
 Lösung steril filtrieren.

2.8. Plasmide

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCnTel1	Amp ^R , Kan ^R , <i>URA5</i> , ColE1 origin, zwei Telomersequenzen in invertierter Orientierung, die die Kanamycinkassette flankieren	(Edman, 1992)
pRCD27	Amp ^R , Kan ^R , <i>ADE2</i> , ColE1 origin	Robert C. Davidson (Heitman-Labor)
pMOS <i>Blue</i>	Amp ^R , <i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Amersham Biosciences
pBluescript	Amp ^R , <i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Stratagen
pCR [®] II TOPO	Kan ^R , Zeo ^R , PCR-Klonierungsvektor	Invitrogen
pJAF1	Amp ^R , Neo ^R , <i>E. coli</i> Klonierungsvektor	(Fraser <i>et al.</i> , 2003)
pPMT1A	Klonierung des <i>PMT1A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pMOS	diese Arbeit
pPMT2A	Klonierung des <i>PMT2A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pMOS	diese Arbeit
pPMT4A	Klonierung des <i>PMT4A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pMOS	diese Arbeit
pPMT1D	Klonierung des <i>PMT1D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pBluescript	diese Arbeit
pPMT2D	Klonierung des <i>PMT2D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pBluescript	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pPMT4D	Klonierung des <i>PMT4D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pBluescript	diese Arbeit
pPMT2A_BglII	<i>In vitro</i> Mutagenese von pPMT2A zur Generierung einer <i>BglII</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pPMT4A_BglII	<i>In vitro</i> Mutagenese von pPMT4A zur Generierung einer <i>BglII</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pPMT1D_BglII	<i>In vitro</i> Mutagenese von pPMT1D zur Generierung einer <i>BglII</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pPMT2D_BglII	<i>In vitro</i> Mutagenese von pPMT2D zur Generierung einer <i>BglII</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pPMT4D_BglII	<i>In vitro</i> Mutagenese von pPMT4D zur Generierung einer <i>BglII</i> Schnittstelle	diese Arbeit
pAct1	Klonierung des <i>Act1</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in pCR [®] II TOPO	diese Arbeit
pPMT1A_Ade	Insertion von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT1A	diese Arbeit
pPMT1A_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT1A	diese Arbeit
pPMT2A_Ade	Insertions von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT2A_BglII	diese Arbeit
pPMT2A_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT2A_BglII	diese Arbeit
pPMT4A_Ade	Insertion von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT4A_BglII	diese Arbeit
pPMT4A_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT4A_BglII	diese Arbeit
pPMT1D_Ade	Insertion von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT1D_BglII	diese Arbeit
pPMT1D_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT1D_BglII	diese Arbeit
pPMT2D_Ade	Insertion von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>BglII</i> von pPMT2D_BglII	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pPMT2D_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>Bgl</i> III von pPMT2D_ <i>Bgl</i> III	diese Arbeit
pPMT4D_Ade	Insertion von <i>ADE2</i> aus pRCD27 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>Bgl</i> III von pPMT4D_ <i>Bgl</i> III	diese Arbeit
pPMT4D_Ura	Insertion von <i>URA5</i> aus pCnTel1 (<i>Bam</i> HI Verdau) in <i>Bgl</i> III von pPMT4D_ <i>Bgl</i> III	diese Arbeit
pCntel-PMT1A	Klonierung des <i>PMT1A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pCntel-PMT2A	Klonierung des <i>PMT2A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pCntel-PMT4A	Klonierung des <i>PMT4A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pCntel-PMT1D	Klonierung des <i>PMT1D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pCntel-PMT2D	Klonierung des <i>PMT2D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pCntel-PMT4D	Klonierung des <i>PMT4D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pCnTel1	Diplomarbeit Nora Grahl
pPMT1A-NeoR	Klonierung des <i>PMT1A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pJAF1	diese Arbeit
pPMT4A-NeoR	Klonierung des <i>PMT4A</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pJAF1	diese Arbeit
pPMT1D-NeoR	Klonierung des <i>PMT1D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pJAF1	diese Arbeit
pPMT4D-NeoR	Klonierung des <i>PMT4D</i> -Gens von <i>C. neoformans</i> in <i>Bam</i> HI von pJAF1	diese Arbeit

2.9. Oligonukleotide

Tabelle 7: Oligonukleotide zur Herstellung und Überprüfung von Plasmiden sowie Southern Blot Sonden

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Oligonukleotidnr.
PMT_1_D fw	CCAGATCTGCTGACAACATTA	C-1
PMT_1_D rev	TGTAGTGGTGGCTGAGTCGG	C-2
PMT_2_D fw	GCCGCCTAGACAGAGAATACC	C-3
PMT_2_D rev	CCGTCTCCCTCTCGGTGTGTG	C-4
PMT_4_D fw	CTACCATCCCAATTCCATCTCT	C-5
PMT_4_D rev	CAGCTCAAACGTCACATCATCA	C-6
PMT1	GCTCTTGAAGAGCACCAACAC	C-7
PMT1R	TGGGAGTTGTACATGCTAGTG	C-8
PMT2	GTCGCCTAGACAGAGAATACC	C-9
PMT2R	TCGTCTTCCTCTTGGTGTGTG	C-10
PMT4	CTATCATCCCAACTCCATCTT	C-11
PMT4R	CAGCTCAAATGTCATGTCATCG	C-12
PMT1D_Bgl2_fw	CATTTCTAGATCTTGAACGA	C-24
PMT1D_Bgl2_rev	TCGTTCAAGATCTAGAAATG	C-25
PMT2D_Bgl2_fw	AATCCAAAGATCTTTCTCGT	C-26
PMT2D_Bgl2_rev	ACGAGAAAGATCTTTGGATT	C-27
PMT4D_Bgl2_fw	ACACGCAGATCTTGTTGCTT	C-28
PMT4D_Bgl2_rev	AAGCAACAAGATCTGCGTGT	C-29
CnTel1_Bam_fw	AAAGGGGGATCCGCTGCAAG	C-30
CnTel1_Bam_rev	CTTGCAGCGGATCCCCCTTT	C-31
PMT2A_BglIII_fw	GTCAGATCTCGTCGCCGTCT	C-64
PMT2A_BglIII_rev	AGACGGCGACGAGATCTGAC	C-65
PMT4A_BglIII_fw	GTGCCCCGACAAGATCTTCC	C-66
PMT4A_BglIII_rev	GGAAGATCTTGTCCGGGCAC	C-67
PMT4D_RT_rev_1	GCRCCCAGAAGAAAGACAGG	C-72

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Oligonukleotidnr.
Ade_veri_vorne	ATAAGGCTTCCACTTGGTCC	C-73
Ade_veri_hinten	AGTCGACATTTTGGAGGAGG	C-74
Ura_veri_vorne	ATGGTTAGCAGGAAACTCCC	C-75
Ura_veri_hinten	ATATCACCCATGCCTATCCG	C-76

3. Methoden

3.1. Methoden zur Isolierung und Analyse von DNA

3.1.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.1.1.1. *Plasmidminipräparation*

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden die Puffer P1, P2 und P3 der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Es wurden 2 ml einer Übernachtskultur in Selektivmedium durch Zentrifugation für 30 sec bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml) resuspendiert. Es wurden 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und die Probe vorsichtig gemischt (invertieren). Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 300 µl Puffer P3 (2,55 M KOAc, pH 4,8) zugegeben und gut gemischt (invertieren). Die Suspension wurde nun 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst ohne feste Bestandteile (genomische DNA, Zellreste, denaturierte Proteine) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und 450 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde gut gemischt, und im Anschluss die DNA durch 30-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, und das DNA-Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco). Der Überstand wurde verworfen, und das DNA-Pellet getrocknet. Die gefällte DNA wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert.

3.1.1.2. *Plasmidmidipräparation:*

Für die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus bis zu 50 ml *E. coli*-Kultur wurde ein Plasmid-Kit der Firma Qiagen (Qiagen Plasmid Midi Kit; Hilden) verwendet. Die Methode beruht auf einer Reinigung der DNA über eine Anionenaustauscher-Säule. Die DNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.2. Genomische DNA-Isolation aus *C. neoformans*

3.1.2.1. „Smash und Grab“-Methode

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde in YPD angeimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Hefesuspension wurde in ein 15 ml Schraubverschlussröhrchen überführt und die Zellen für 5 min bei 3500 Upm (Hettich, Rotina 38R) abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 5 ml ddH₂O gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1,5 ml SCE Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss überführt. Es folgte die Zugabe von 15 µl „Lysing Enzymes“ (100 mg/ml) aus *Trichoderma harzianum* (Sigma) und eine 1-stündige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 6000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu den Zellen wurden 0,2 ml Glasperlen (Ø ~ 0,4 mm), 0,5 ml Phenol/ Chloroform (Verhältnis 1:1) und 0,5 ml TENTS Puffer gegeben und ca. 1 min auf einem Vortex geschüttelt. Zum Zellaufschluss wurde die Zellsuspension für 20 min bei 4 °C auf einem Vibrax-Schüttler (Janke und Kunkel, VX 2E) bei höchster Stufe geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Zelltrümmer und der Glasperlen durch Zentrifugation für 4 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 50 µl 3 M NaOAc und 1 ml 96 %igem Ethanol gut gemischt. Die Suspension wurde nun 20 min bei 4 °C mit 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 100 µl TE Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Wenn die DNA für eine PCR eingesetzt werden sollte, ist eine weitere Bearbeitung nicht notwendig, für andere Anwendungen wurde eine weitere Phenol / Chloroform Extraktion durchgeführt.

SCE-Puffer: 1 M Sorbitol
100 mM Natriumcitrat
10 mM EDTA (pH 7,0)

TENTS-Puffer: 10 mM TrisHcl (pH 7,5)
1 mM EDTA (pH 8,0)
100 mM NaCl
2 % Triton x-100
1 % SDS

3.1.2.2. Genomische DNA-Präparation

Eine 50 ml Übernachtskultur wurde in YPD angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Schraubverschlussröhrchen überführt und 5 min bei 3500 Upm (Hettich, Rotina 38R) abzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet durch Zugabe von ca. einem Volumen Glasperlen ($\varnothing \sim 3\text{-}4$ mm) und Schütteln aufgelockert. Danach wurden die Zellen für mindestens 30 min bei -80 °C eingefroren. Es folgte eine Lyophilisierung der Zellen über Nacht. Das getrocknete Pellet wurde solange auf einem Vortex geschüttelt bis ein feines Pulver entstand. Zu dem Pulver wurden 10 ml CTAB Extraktionspuffer gegeben, und die Suspension wurde für 30 min bei 65 °C inkubiert. Das 50 ml Schraubverschlussröhrchen wurde unter fließend kaltem Wasser abgekühlt, anschließend etwa ein Volumen Chloroform dazugegeben, und die Suspension für ca. 1 min vorsichtig durch invertieren geschüttelt. Die Suspension wurde nun 10 min bei 3500-4000 Upm (Hettich, Rotina 38R) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und es wurde ca. ein Volumen Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde gut gemischt, und im Anschluss die DNA durch 20-minütige Zentrifugation bei 6000 Upm (Heraeus Megafuge 1.0) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm (Heraeus Megafuge 1.0). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet getrocknet. Die gefällte DNA wurde in 500 μl TE Puffer mit 10 $\mu\text{g/ml}$ RNase A resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

CTAB Extraktionspuffer:	50 ml	1 M TrisHcl (pH 7,5)
	70 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	10 ml	5 M NaCl
	5 g	CTAB
	365 ml	H ₂ O

Den Puffer in 50 ml Schraubverschlussröhrchen aliquotieren und direkt vor Gebrauch 500 μl β -Mercaptoethanol in das Röhrchen pipettieren.

3.1.3. Auftrennung von DNA durch Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

Je nach Größe der Fragmente wurde die DNA in 0,7-2 %igen Agarosegelen bei 75-90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Agaroselösung wurde Ultra-Pure-Agarosepulver (Invitrogen) in 0,5 x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) kurz in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Agaroselösung hinzugegeben. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agarose in die Gelapparatur gegossen, und ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde die Elektrophoresekammer mit 0,5 x TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die mit 1/10 Volumen Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) OrangeG, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) gemischten DNA-Proben in die Taschen pipettiert.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele unter UV-Licht (254 nm) photographiert.

3.1.4. Größenstandard für DNA

Als Größenstandards für die Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen wurde DNA des Phagen Lambda genutzt, die entweder mit dem Restriktionsenzym *Pst*I oder mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Hind*III geschnitten wurde. Dadurch entstanden für den *Pst*I Verdau DNA-Fragmente der folgenden Größe (bp): 11501, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247.

Für den *Eco*RI / *Hind*III Verdau entstanden DNA-Fragmente folgender Größe (kb): 23,1, 21,2, 9,42, 6,56, 5,15, 5,0, 4,37, 4,25, 3,54, 2,9, 2,32, 2,03, 1,91, 1,58, 1,38, 0,95, 0,83 und 0,56.

3.1.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAEX II-Gel Extraction-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.1.6. Ethanolfällung

Zur Reinigung und Konzentrierung von DNA wurde die DNA mit 2,5 bis 3 Volumen Ethanol über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 15000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sedimentiert, mit eiskaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 - 50 μl Wasser gelöst. Zur Unterstützung der Fällung wurde der DNA-Lösung in manchen Fällen vor der Zugabe des Ethanols 1/10 Volumen NaAc (3 M, pH 5,9) zugegeben.

3.1.7. Restriktionsanalyse von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann DNA an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch gespalten werden. Die Analysen wurden gemäß den Herstellerangaben mit den enzym-spezifischen Puffern für $\frac{1}{2}$ - 16 Stunden bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen durchgeführt.

Eine Enzymeinheit (U) schneidet unter optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen in einer Stunde 1 μg λ -DNA. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20 μl .

Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) OrangeG, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

3.1.8. 5'-Dephosphorylierung von Vektoren

Um die Rezirkularisierung von linearisierten Vektoren in Ligationsreaktionen zu vermindern, wurden diese vor dem weiteren Einsatz an den überstehenden 5'-Enden dephosphoryliert. Nach der Restriktion wurden die Vektoren hierzu nach Zugabe von alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase [CIAP]; Fermentas) 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min. Anschließend wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente über ein Agarosegel gereinigt.

3.1.9. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 20 µl. Dabei wurden verschiedene molare Verhältnisse von Vektor zu Insert von 1:2 bis zu 1:100 eingesetzt. Nach Zugabe von 1 U T4 DNA Ligase wurden die Ligationsansätze mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.1.10. Photometrische Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt, bei der DNA und RNA aufgrund der aromatischen Basen ein Absorptionsmaximum aufweisen. Dabei wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook *et al.*, 1989):

Doppelsträngige DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml

RNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml

Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen liegt der Wert unter 1,8.

3.1.11. Butanolfällung von DNA

Bei vielen experimentellen Ansätzen (Restriktionsverdau, Sequenzierungen, Ligationen) muss die DNA in ausreichenden Mengen vorhanden sein. Aus diesem Grund wurde die DNA aus Proben mit zu geringer DNA-Menge durch Butanolfällung präzipitiert.

Die DNA-haltige Lösung wurde zunächst in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Für die Fällung wurde das zehnfache Volumen an n-Butanol hinzugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde 20 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig entnommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen und 5 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet getrocknet. Das DNA-Pellet wurde anschließend in einem geringeren Volumen ddH₂O als zuvor (meist 20 µl) aufgenommen.

3.2. Southern-Analyse (DIG)

3.2.1. Sondenmarkierung

Zur DIG-Markierung von DNA-Fragmenten wurde das Prinzip des „random priming“ verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die nicht-radioaktive Markierung von DNA erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit non radioactive“ der Firma Roche. In einem Reaktionsansatz wurden 100-500 ng DNA über Nacht nach Angaben des Herstellers markiert. Zusätzlich wurde auch das „PCR DIG Labeling Kit“ der Firma Roche eingesetzt. Dabei wurden die Sonden durch PCR generiert und die nicht-radioaktive Markierung der DNA erfolgte während der PCR durch Einbau von DIG-dUTP. Die Konzentration der Sonde wurde jeweils vor der Hybridisierung im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe mit markierter Kontroll-DNA abgeschätzt.

3.2.2. Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot

1,5 bis 2 µg der zu untersuchenden DNA wurde in 100 µl Volumen über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (jeweils 10 U) geschnitten und dann in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, um anschließend in einer Vakuumblokkammer (LKB 2016 VacuGene von Pharmacia) auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham/Braunschweig) transferiert zu werden. Nach dem Anlegen eines konstanten Vakuums erfolgte eine dreiminütige Denaturierung der DNA (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), eine ebenfalls dreiminütige Neutralisierung des Gels (3 M NaAc, pH 5,5), und der Transfer der DNA für 45 min mit 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7).

Zur Fixierung der DNA wurde die Membran für 3 min unter UV-Licht inkubiert oder bei 80 °C für 2 h gebacken.

3.2.3. Hybridisierung und Detektion

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit Prähybridisierungslösung (5x SSC, 0,02 % SDS, 0,1 % D-Laurylsarcosin, 10 % NRB2 (10 g Blockierungsreagenz in 100 ml NRB1 [100 mM Maleinsäure, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5] gelöst)) in einer Tüte eingeschweißt und für mindestens 1 h im Wasserbad bei 68 °C inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei gleicher Temperatur. Nach der Hybridisierung wurde die Membran wie folgt gewaschen: 2 x 5min in 2x SSC mit 0,1 % SDS bei Raumtemperatur, 2 x 15min in 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS bei 68 °C.

Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 45 min in 1 % Blockierungslösung (NRB2) bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation für 45 min mit Antikörperkonjugat (polyklonale Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente konjugiert mit alkalischer Phosphatase) ebenfalls bei Raumtemperatur. Darauf folgten mindestens zwei Waschschrte in Maleinsäurepuffer NRB1 für mindestens je 15 min. Nach einer Äquilibrierung der Membran in Puffer NRB3 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂) für 2 min folgte die Detektion in Puffer NRB3 mittels des durch die alkalische Phosphatase katalysierten Umsatzes von NBT (0,338 mg/ml) und X-Phospat (0,175 mg/ml) zu einem blauen Farbstoff. Alternativ wurde auch das DIG Wash and Block Buffer Set inklusive der CDP-STAR Lösung von Roche für die Detektion benutzt. Diese Detektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“)

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis und Faloona, 1987) können spezifische DNA-Fragmente gezielt amplifiziert werden. Immer gleich ist der dreigliedrige PCR-Zyklus: (1) Denaturieren der Matrizen-DNA zur ssDNA. (2) Hybridisieren der Gen-spezifischen Oligonukleotide an die einzelsträngige Matrizen-DNA. (3) DNA-Synthese durch die Polymerase. In folgenden Tabellen sind die Ansätze inklusive der Endkonzentrationen der PCR Komponenten der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs aufgelistet:

Komponente	Endkonzentration
Matrizen-DNA	1 – 10 ng
Oligonukleotide	50 µM
dNTP Mix	pro Nukleotid 200 µM
MgCl ₂	1,5 mM
10x Puffer	1x
Taq Polymerase	1-2 U/50 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 8: Standard PCR-Ansatz für die Taq Polymerase

Komponente	Endkonzentration
Matrizen-DNA	1 – 10 ng
Oligonukleotide	50 µM

dNTP Mix	pro Nukleotid 200 µM
5x Phusion HF Puffer	1x
Phusion DNA Polymerase	1 U/ 50 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 9: Standard PCR-Ansatz für die Phusion DNA Polymerase

Die PCR wurde in einem Tpersonal Thermo-Cycler (Biometra) durchgeführt. Als Hybridisierungstemperatur wurde die Temperatur gewählt, die 4 °C unter dem niedrigsten T_m-Wert der verwendeten Oligonukleotide lag. Der T_m-Wert wurde durch die Nukleotid-Zusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt ($T_m = 4x (G + C) + 2x (A + T)$). Die Hybridisierungsdauer richtet sich genauso wie die Temperatur nach der gewünschten Spezifität der Reaktion. Verlängerung der Zeit bzw. eine niedrigere Temperatur bewirkt eine geringere Spezifität der Hybridisierungsreaktion. Die DNA-Synthese-Temperatur lag i.d.R. bei 72 °C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der verwendeten Polymerase.

Diese Bedingungen stellen nur Richtwerte dar und sind von der Natur der Matrizen-DNA, den Oligonukleotiden und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches abhängig. In folgenden Tabellen sind die Bedingungen, der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen aufgelistet:

Erste Denaturierung	3 min 94 °C
Denaturierung	1 min 94 °C
Annealing	30 sec 45 – 72 °C
Elongation	1 min/ 1 kb 72 °C
Letzte Elongation	10 min 72 °C
Zyklen	35 - 45

Tabelle 10: PCR-Bedingungen für die Taq Polymerase

Erste Denaturierung	30 sec 98 °C
Denaturierung	15 sec 98 °C
Annealing	30 sec 45 – 72 °C
Elongation	30 sec/ 1 kb

	72 °C
Letzte Elongation	10 min 72 °C
Zyklen	25 - 35

Tabelle 11: PCR-Bedingungen für die Phusion DNA Polymerase

3.3.1. Kolonie-PCR

Nach einer Transformation von *C. neoformans* wurde zur Verifizierung der DNA-Integration eine PCR-Reaktion mit ganzen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde etwas Zellmaterial einer frischen Kolonie in 40 µl 0,02 M NaOH-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung für mind. 1 Stunde bei -20 °C. In der anschließenden Kolonie-PCR-Reaktion mit der *Taq* Polymerase (50 µl) wurden 4 µl dieser Suspension als „DNA“-Matritze eingesetzt.

3.4. Transformationen

3.4.1. Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte zum einen durch Elektroporation (Chu *et al.*, 1987; Neumann *et al.*, 1982) und zum anderen nach der so genannten „One minute“-Methode (Golub, 1988).

3.4.1.1. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Damit die Plasmid-DNA mit hoher Effizienz durch Elektroporation in die *E. coli*-Zellen gelangen kann, ist es notwendig elektrokompetente Zellen herzustellen. Hierzu wurden 100 ml LB mit *E. coli* (XL1-blue bzw. DH5α) von der Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit der Vorkultur wurde 1 l LB Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 15 min bei 4000 Upm (Beckmann, J2-21, Rotor: JA-14) und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal in 1 l eiskaltem, sterilen ddH₂O gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml eiskaltem, sterilen 10%igem Glycerin resuspendiert, in ein steriles 50 ml Schraubverschlussröhrchen überführt und dann 10 min bei 4000 Upm (Hettich, Rotina R38)

und 4 °C zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 2–3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert wurde, wurde die Zellsuspension in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.4.1.2. *Elektroporation von E. coli*

Zur eigentlichen Elektroporation von *E. coli* Zellen wurden die elektrokompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und zu je 40 µl in vor gekühlte Eppendorfggefäße aliquotiert. Zu den Zellen wurde 1 µl DNA-Probe hinzugegeben und gemischt. Die Proben wurden in vor gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 1 mm) überführt und 10 bis 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Küvetten wurden von außen gut abgetrocknet, und es folgte die Elektroporation. Die Zellen wurden bei einer Spannung von 1,3 kV, einem Widerstand von 200 Ohm und 25 µF Kapazität, bei einer resultierenden Pulszeit von $\geq 8,7$ ms transformiert (BioRAD Gene PulserTM).

Direkt nach der Transformation wurden 900 µl LB Medium auf die Zellen in der Küvette gegeben, und die Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß überführt. Es folgte eine Inkubation der transformierten Zellen für 60 min bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivplatten (LB + Amp bzw. LB + Kan) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sollte das Blau/Weiß-Selektionssystem verwendet werden, mussten auf die Platten zuvor 20 µl IPTG (100 mM) und 35 µl X-Gal (50 mg/ml) ausgestrichen werden. (siehe Kapitel 2.7.1.).

3.4.1.3. *Herstellung DMSO kompetenter E. coli Zellen*

Zur Aufnahme von rekombinanten Plasmiden muss die Zellwand der meisten Bakterien durchlässig, d.h. die Bakterien kompetent gemacht werden. Für die so genannte „One-minute“-Transformation wird dies durch die Behandlung der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) erreicht (Hanahan, 1985).

Ein 15 ml Schraubverschlussröhrchen wurde mit 5 ml SOB-Medium und 2 µl *E. coli*-Zellen eines Glycerin-Stocks XL1-blue-Zellen über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 100 ml SOB-Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben wurden dann mit 100 µl aus der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 (entspricht einer Zellkonzentration von 5 bis 8 x 10⁷/ml) unter schütteln inkubiert (ca. 2 bis 3 h). Alle weiteren Arbeiten wurden

auf Eis und mit vor gekühlten Materialien (4 °C) und Lösungen durchgeführt: Die Zellen wurden 15 min auf Eis gekühlt, dann in zwei 50 ml Schraubverschlussröhrchen überführt und bei 4 °C für 10 min mit 1600 g zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes, wurde das Sediment in 20 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, die Suspension für 15 min auf Eis gestellt, wieder wie oben beschrieben zentrifugiert, und der Überstand erneut verworfen. Das Zell-Pellet wurde in 4 ml FSB-Puffer resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 140 µl DMSO dazugegeben, gleich darauf gut geschüttelt, und der Ansatz für weitere 5 bis 10 min auf Eis gestellt. Es erfolgte die erneute Zugabe von 140 µl DMSO und die Durchmischung der Suspension, die dann in Portionen von je 20 µl aliquotiert wurde. Die Aliquots sind anschließend über mehrere Monate bei -70 °C lagerungsfähig.

FSB-Puffer: 10 mM KAc (pH 7,5)
 45 mM MnCl₂ x 4H₂O
 10 mM CaCl₂ x 2H₂O
 100 mM KCl
 3 mM Hexaminokobaltchlorid
 10 % Glyzerin

3.4.1.4. „One-Minute“ *Transforamtion von E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* nach der „One-minute“-Methode wurden zu 7 µl DMSO kompetenten Zellen auf Eis 1 µl Plasmid-DNA zugegeben und die Zellen sofort für 1 min bei 44 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl LB Medium hinzugegeben und der ganze Ansatz wurde direkt auf entsprechende Selektiv-Platten ausgestrichen.

3.4.2. *Transformation von C. neoformans*

3.4.2.1. *Elektroporation von C. neoformans*

Zwei Transformations-Methoden sind für die pathogene Hefe *C. neoformans* in den letzten Jahren etabliert worden. Mit Hilfe der Elektroporation (Wickes *et al.*, 1997) können spezielle Plasmide (pPM8, pCntel) in *C. neoformans* transformiert werden, ohne dass diese in die chromosomale DNA integrieren. Diese Plasmide enthalten Telomerasequenzen, die vor der Transformation durch Linearisierung der Plasmide freigesetzt werden und für die Etablierung

der DNA in der Zelle unabdingbar sind. Unter selektiven Bedingungen liegen die episomalen Elemente in etwa 5-7facher Kopienzahl pro Zelle vor.

Zunächst wurden 30 ml YPD mit *C. neoformans* angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Vorkultur wurde mit 100 – 200 ml frischem Medium auf ca. 2×10^6 Zellen/ml verdünnt (Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht in etwa 1×10^7 Zellen/ml vom Stamm JEC21) und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden bei einem Zelltitert von 6×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml (nicht mehr als 2×10^7 Zellen/ml) durch Zentrifugation bei 3000 g, 4 °C für 5 min geerntet (Hettich, Rotina R38). Die Zellen wurden zweimal mit eisgekühltem ddH₂O gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Alle für die Transformation verwendeten Lösungen, sowie die Zentrifugenbecher sollten dabei immer kalt gehalten werden. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 50 ml EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl₂; 270 mM Saccharose [9,24 g/ 100 ml]; in ddH₂O; steril filtriert) resuspendiert und 200 µl 1 M DTT hinzugefügt. Die Suspension wurde 5 – 15 min auf Eis inkubiert, und die Zellen dann wie zuvor pelletiert. Die Zellen wurden in 50 ml EB-Puffer (ohne DTT) gewaschen, der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen, und das Pellet im verbleibenden EB-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Transformation so aufgeteilt, dass jedes Eppendorfreaktionsgefäß etwa 3×10^8 Zellen enthält (z. B. 100 ml Kultur mit 1×10^7 Zellen/ml ergeben eine Gesamtzellzahl von 1×10^9 Zellen. Diese Zellmenge reicht für 3,3 Elektroporationen.). Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 5000 Upm, 4 °C, Heraeus Biofuge fresco), der Überstand bis auf 40 µl abgenommen, und die Zellen in diesem Rest resuspendiert.

Zur eigentlichen DNA-Transformation wurde zu den Zellen etwa 1 – 5 µg DNA gegeben, und der Transformations-Ansatz in vor gekühlte Küvetten überführt (2 mm Spalt BioRAD Elektroporationsküvetten). Die Elektroporation erfolgte mit den folgenden Einstellungen: 0,5 kV, 25 µF, sowie 1000 oder ∞ Ohm Widerstand. Die Zeitkonstante sollte zwischen 15 – 25 sec liegen. Direkt nach der Transformation wurden zu dem Ansatz 900 µl Selektivmedium hinzu gegeben, und die Zellen wurden direkt auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 2 – 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend nochmals auf Selektivplatten vereinzelt und die Kolonien mittels Kolonie-PCR auf eine Aufnahme der DNA kontrolliert.

3.4.2.2. Transformation von *C. neoformans* durch Mikropartikel- beschuss („Biolistic transformation“)

Eine weitere Methode zur Transformation von *C. neoformans* ist der Beschuss von Zellen mit kleinen Goldkügelchen, an die die zu transformierende DNA gebunden ist. (Toffaletti und Perfect, 1994). Bei dieser Methode wird die DNA im Gegensatz zur Elektroporation in die chromosomale DNA integriert, eine Insertion an der richtigen Stelle findet jedoch nur in durchschnittlich 10-15 % der Fälle statt.

Zunächst wurden 10 ml YPD mit dem zu transformierenden *C. neoformans* Stamm angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurde in ein 15 ml Schraubverschlussröhrchen überführt und für 5 min bei 3500 Upm (Hettich, Rotina 38R) abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit 5 ml ddH₂O gewaschen, in 1,5 ml ddH₂O resuspendiert, und anschließend zu je 200 µl auf entsprechende Selektivplatten ausplattiert. Für eine gute Transformationseffizienz sollten die Platten vor dem Beschuss ausreichend getrocknet werden.

Für die Transformation wurden pro Ansatz in einem Eppendorfreaktionsgefäß zunächst 10 µl Goldkügelchen („Microcarrier“), 10 µl 2,5 M CaCl₂, 2 µl Spermidin und 1-5 µl DNA gut gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 96 %igem Ethanol resuspendiert und nochmals für 1 min bei 13000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Das DNA/Gold-Pellet wurde anschließend in 10-15 µl 96 %igem Ethanol aufgenommen, in die Mitte eines „Macrocarriers“ (BioRAD) pipettiert und gut getrocknet.

Anschließend wurde die Apparatur wie in Abbildung 6 gezeigt assembliert. Dabei wird das untere Ende der Helium Kanone durch eine „Rupture Disc“ (BioRAD) verschlossen, die bei einem Druck von 1300 psi bricht. In einer darunter gelegenen Halterung sind der mit den „Microcarrier“ beladene „Macrocarrier“ und ein Drahtnetz, der sogenannte „Stopping Screen“ montiert. Wenn die „Rupture Disc“ bricht wird der „Macrocarrier“ mit 1300 psi beschleunigt und trifft dann auf den „Stopping Screen“. Der „Macrocarrier“ wird dadurch abrupt abgebremst und aufgefangen, die „Microcarrier“ schießen jedoch ungebremst durch den „Stopping Screen“ und treffen auf die Agar Platte mit dem zu transformierenden *C. neoformans* Stamm. Die so beschossenen Agarplatten wurden anschließend für mehrere Tage bei 30 °C inkubiert, und etwaige Transformanten nochmals auf Selektivplatten vereinzelt.

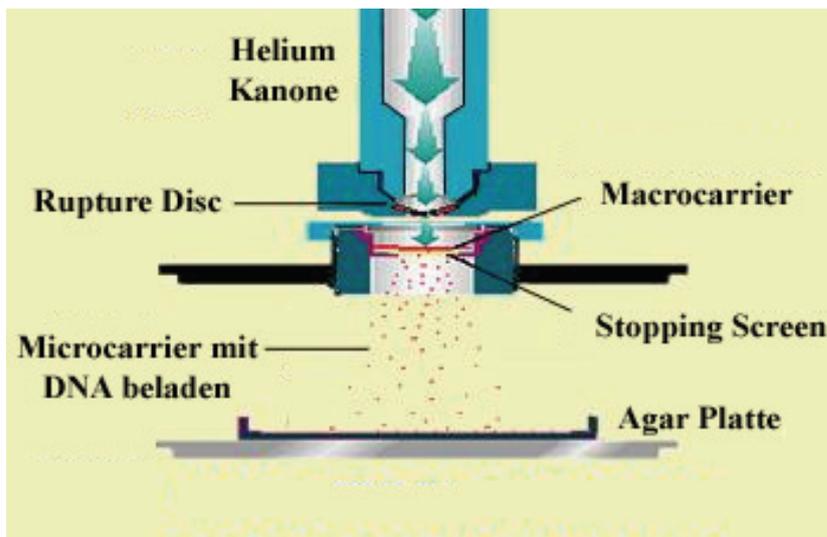


Abbildung 6: Aufbau der Mikropartikelkanone

3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Hellfeld-, Differential-Interferenzkontrast- (DIC) und Fluoreszenzbilder wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Plus Fluoreszenz Mikroskop mit Hilfe einer AxioCam MRM Digitalkamera aufgenommen. Zusätzliche Hellfeldbilder wurden mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop in Verbindung mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera aufgenommen. Um die Zellwand bzw. DNA sichtbar zu machen, wurden Hefezellen zunächst mit Formaldehyd (10 % Endkonzentration) für 30 min fixiert und anschließend mit Calcofluor White bzw. DAPI gefärbt. Die Zellen wurden dazu dreimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 % Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden nochmals dreimal mit PBS gewaschen und anschließend entsprechend gefärbt. Für die Calcofluor White Färbung wurde zu 200 μ l fixierte Zellen 1 μ l Calcofluor White (20 mg/ml Fluorescent brightener; Sigma) gegeben. Zur Färbung chromosomaler DNA wurden 8 μ g/ml 4,6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes) zu den fixierten Zellen hinzugefügt.

Die Färbung der Vakuolen mit dem Farbstoff FM4-64 (Molecular Probes) erfolgte wie bereits anderweitig beschrieben (Vida und Emr, 1995; Wang *et al.*, 1996). Kurz zusammengefasst, wurden Zellen der zu färbenden Stämme in YPD auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ eingestellt, 1 ml Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 100 μ l YPD resuspendiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 (Endkonzentration 40 μ M) hinzugegeben und rotierend für 45 min bei 30 °C inkubiert. Die so gefärbten Zellen wurden mit YPD gewaschen und direkt mikroskopiert.

3.6. Urease Test

Zur Bestimmung, ob Urease von den *C. neoformans* Stämmen ins Medium sekretiert wird, wurden „BBL™ Taxo™ Differentiation Discs Urea“ der Firma BD verwendet. Der Test beruht auf einer Rotfärbung des Mediums bei Anwesenheit von Urease im Medium. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Herstellerangaben.

3.7. Kapselinduktion

Um einen Effekt von Gen-Mutationen auf die Kapseldicke von *C. neoformans* beobachten zu können, musste die Kapselproduktion entweder durch niedrige Glukosekonzentration, Eisenmangel oder physiologische Kohlendioxid-Konzentration induziert werden. Für die Untersuchung der Kapselproduktion wurden die *C. neoformans* Stämme in 5 ml Eagles Medium über Nacht bei 30 °C inkubiert. 5 µl der Zellsuspension wurde mit 5 µl Tusche auf einem Objektträger gemischt und mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop in Verbindung mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera aufgenommen.

3.8. Melanintests

3.8.1. Melanintest auf Agarplatte

Zur Bestimmung, ob *C. neoformans* Stämme Melanin produzieren wurden 10 µl von ca. 1×10^6 Zellen/ml auf Niger Seed-Platten (s.o.) getropft, und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Bei Stämmen, die Melanin produzieren, konnte nach der Inkubation eine starke Braunfärbung der Kolonien beobachtet werden. Kolonien von Stämmen, die kein Melanin produzieren blieben dagegen weiß.

3.8.2. Melanintest in Flüssigmedium

Neben der Kolonieverfärbung auf „Niger-Seed“-Platten wurde zur Bestimmung, ob *C. neoformans* Stämme Melanin produzieren ebenfalls ein Melanin-Flüssigtest durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Stämme zunächst in 25 ml YPD bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 652 g (Hettich, Rotina 38R) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 2 ml glukosefreiem Asparagin-Medium (mit

L-DOPA) resuspendiert. Die Zellen wurden für 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert und anschließend 10 min bei 652 g (Hettich, Rotina 38R) sedimentiert. Die Melanin-Produktion wurde zum einen durch das Fotografieren des Zell-Pellets, zum anderen durch die Messung des Überstandes bei einer OD₄₈₀ dokumentiert.

3.9. Start und Passage von Makrophagen in Zellkulturflaschen

Zur Herstellung von Makrophagenkulturen wurde eine aufgetaute Makrophagensuspension durch Zugabe von DMEM Kulturmedium auf ein Volumen von 20 ml pro Zellkulturflasche (80 cm²) aufgefüllt. Nach 3-5 Tagen wurde die Flasche aus dem Brutschrank entnommen. Die Zellkulturflasche wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet, das überstehende Zellkulturmedium abgezogen und die Zellkulturflasche anschließend dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml DMEM Kulturmedium wurden die Makrophagen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vom Flaschengrund gelöst, und die Zellsuspension wurde in 15 ml Schraubverschlussröhrchen überführt. In eine neue Zellkulturflasche (80 cm²) wurden 20 ml DMEM Kulturmedium pipettiert und dazu je 1 ml der Makrophagenzellsuspension gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die Makrophagen im gesamten Medium verteilt. Die Zellkulturflaschen wurden anschließend 3-4, maximal 7 Tage bei 37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Athmosphäre bebrütet.

3.10. Makrophagen-Phagozytose/Tötungstest

Als Vorbereitung für Virulenz-Experimente in der Maus ist es sinnvoll, die zu untersuchenden Mutanten bezüglich ihrer Virulenzeigenschaften in einem Makrophagen-Phagozytose/Tötungstest zu untersuchen. Dazu wurden pro Ansatz je 1×10^5 J774A.1 Makrophagenzellen in 50 µl DMEM Kulturmedium in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Um die Makrophagen zu aktivieren wurden anschließend 50 µl DMEM Kulturmedium zu der Zellsuspension gegeben, welches 100 U/ml IFN-γ (2 µl IFN-γ / 2 ml DMEM Kulturmedium) und 0,6 µg/ml LPS (1,2 µl / 2ml DMEM Kulturmedium) enthielt. Als Negativkontrollen wurden einigen Ansätzen entsprechend 50 µl DMEM Kulturmedium ohne Zusätze hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für 12-18 h bei 37 °C bei 5 % CO₂ inkubiert.

Für den Test wurden über Nacht Kulturen der zu untersuchenden *C. neoformans* Stämme für 5 min bei 3000 Upm (Hettich, Rotina 38R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen anschließend dreimal mit 10 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 ml DMEM Kulturmedium resuspendiert, und die Anzahl lebender Zellen durch Trypan Blaufärbung bestimmt. 1×10^6 lebende *Cryptococcus*-Zellen/ml wurden dann in DMEM Kulturmedium resuspendiert, welches 1 $\mu\text{g/ml}$ monoklonalen Antikörper mAb18B7 enthielt, und für 1 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden 100 μl Zellsuspension (entspricht 1×10^5 *Cryptococcus*-Zellen) zu den Makrophagen pipettiert und 1 h bei 37 °C bei 5 % CO₂ inkubiert. Nach 1 h wurden die extrazellulären *Cryptococce*n durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Anschließend wurden in jede Vertiefung vorsichtig 150 μl DMEM Kulturmedium pipettiert, ohne den Zellrasen zu beschädigen und weitere 24 h bei 37 °C bei 5 % CO₂ inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurde das DMEM Kulturmedium aus jeder Vertiefung komplett abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. In jede Vertiefung wurden dann 100 μl 0,5 %ige SDS Lösung pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen in jeder Vertiefung wurden durch auf- und abpipettieren aufgebrochen, und das Lysat wurde in die entsprechenden Eppendorf Reaktionsgefäße hinzugefügt. Die Vertiefungen wurde dann mit 200 μl sterilem PBS gewaschen, welches ebenfalls in die entsprechenden Eppendorf Reaktionsgefäße überführt wurde. Die Zellsuspension jedes Eppendorf Reaktionsgefäßes wurde 1:300 verdünnt und 100 μl jeder Verdünnung wurden auf einer YPD Platte ausgestrichen. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert und die Phagozytose Tötungsrate wurde durch Zählen der gewachsenen Kolonien bestimmt.

3.11. Virulenztests in dem Modellorganismus Maus

Zur Untersuchung der Pathogenität von *C. neoformans* in lebenden Organismen wurde das murine Inhalationsmodell systemischer Kryptokokkose verwendet (Cox *et al.*, 2000). In dem murinen Inhalationsmodell erkrankten die Mäuse an Meningoenzephalitis. Dieses Modell simuliert eine Infektion beim Menschen durch Inhalation. Kurz zusammengefasst, es wurden Gruppen von 10 weiblichen A/Jcr Mäusen (ca. 20 g) mit jeweils 10^5 *C. neoformans* Zellen der zu untersuchenden Stämme in 50 μl PBS intranasal inokuliert und zweimal täglich auf Zeichen einer Infektion untersucht. Alle Mäuse wurden aus Gründen des Tierschutzes getötet bevor sie an der Infektion starben. Dabei wurden gesetzlich vorgeschriebene und vordefinierte Kriterien zur Bestimmung des Zeitpunkts der Tötung der Mäuse befolgt. Diese

Kriterien waren >15 %iger Gewichtsverlust, starke neurologische Auffälligkeiten sowie Unfähigkeit der Mäuse Nahrung und Wasser aufzunehmen. Alle Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. James A. Alspaugh und Dr. Michael S. Price an der Duke University (Durham, NC) unter strengster Einhaltung der Institutsvorschriften bezüglich der Durchführung von Tierversuchen (Duke University Medical Center Animal Care & Use Program) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Virulenz des opportunistisch pathogenen Pilzes *C. neoformans* wird hauptsächlich durch Zelloberflächen-assoziierte und extrazelluläre Faktoren bestimmt, wie z. B. eine Polysaccharid-Kapsel, verschiedene extrazelluläre Enzyme, Oberflächenantigene oder Melanin, einem Pigment, welches in die Zellwand eingelagert wird. Da die Protein-O-Glykosylierung hauptsächlich sekretierte und zellmembranassoziierte Proteine betrifft, könnte diese Form der Glykosylierung bei *C. neoformans* möglicherweise einen merklichen Einfluss auf die Biosynthese, Lokalisierung und Funktion spezifischer Virulenzfaktoren haben. Das Projekt hatte daher das Ziel, den Einfluss der Protein-O-Glykosylierung auf diese Virulenzfaktoren zu untersuchen. Hierfür sollte die Protein-O-Mannosyltransferase-Genfamilie charakterisiert werden.

4.1. Datenbankanalyse und Sequenzvergleich der *Pmt*-Proteinfamilie

Im Rahmen der Sequenzierung und Annotierung des *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotyp D)-Genoms (<http://www-sequence.stanford.edu/group/C.neoformans/>) konnten drei Mitglieder der *PMT*-Genfamilie identifiziert werden. Aufgrund der Sequenzvergleiche zu den in *S. cerevisiae* existierenden sieben *PMT*-Genen wurde der offene Leserahmen (ORF „open reading frame“) CND06150 mit *PMT1*, der ORF CNJ01930 mit *PMT2* und der ORF CND01240 mit *PMT4* bezeichnet. *PMT1* liegt auf Chromosom 4 und erstreckt sich von der Position 1695872 bis 1699212, *PMT2* liegt auf Chromosom 10 (Pos. 562552 bis 565455) und *PMT4* wiederum auf Chromosom 4 (Pos. 352372 bis 355122). Da die Annotierung des *C. neoformans* var. *grubii* (Serotyp A)-Genoms (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/cryptococcus_neoformans/Home.html) noch nicht abgeschlossen ist, gibt es nur vorläufige ORF-Nummern und Lokalisierungen auf Supercontigs, jedoch keine Zuordnung zu spezifischen Chromosomen. *PMT1* wird als CNAG_06834.1 bezeichnet und liegt auf Supercontig 17 (Pos: 96680-99870), *PMT2* hat die Bezeichnung CNAG_04763.1 und ist auf Supercontig 10 (Pos: 595572-598365) zu finden, und *PMT4* wird als CNAG_00996.1 geführt und liegt auf Supercontig 2 (Pos: 357643-360303).

In Tabelle 12 sind die Sequenzähnlichkeiten der *C. neoformans* *PMT*-Gene, sowohl untereinander (Serotyp A gegen Serotyp D) sowie mit denen aus *S. cerevisiae* dargestellt. Die sich entsprechenden *PMT*-Gene der beiden untersuchten *Cryptococcus* Varietäten

unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz maximal um 3 %. CnPmt1p besitzt zu 40 % die gleichen Aminosäuren wie sein Homolog in *S. cerevisiae*, bei CnPmt2p liegt die Homologie bei 53 %, und CnPmt4p zeigt 52 % Homologie zu ScPmt4p. CnPmt1p zeigt jedoch zu CnPmt2p und CnPmt4p nur 30 % Homologie, und CnPmt2p besitzt zu 38 % die gleiche Aminosäuresequenz wie CnPmt4p.

Wie bereits erwähnt kann die Pmt-Proteinfamilie in drei Subfamilien, die Pmt1-, Pmt2- und Pmt4-Subfamilie, unterteilt werden (siehe Kapitel 1.6). In *S. cerevisiae* gehören Pmt1p, Pmt5p und Pmt7p der Pmt1-Subfamilie und Pmt2p, Pmt3p und Pmt6p der Pmt2-Subfamilie an, während für die Pmt4-Subfamilie nur ein Mitglied, Pmt4p, identifiziert werden konnte. Ein Vergleich der *C. neoformans* Pmt-Proteine mit denen aus *S. cerevisiae* zeigt, dass die höchsten Homologien zu den Mitgliedern der entsprechenden Proteinfamilie bestehen. CnPmt2p zeigt z. B. wie erwähnt 53 % Homologie zu ScPmt2p, aber auch 51 % Übereinstimmung mit ScPmt3p bzw. 49 % mit ScPmt6p, den weiteren Mitgliedern der Pmt2-Proteinfamilie. In ähnlicher Weise zeigen CnPmt1 und CnPmt4 mit etwa 40 % für Pmt1p bzw. 52 % für Pmt4p die höchste Ähnlichkeit zu den *S. cerevisiae*-Proteinen der entsprechenden Subfamilien, und unterstützen so die Annahme, dass *C. neoformans* jeweils nur ein Mitglied der drei Subfamilien besitzt.

Tabelle 12: Sequenzidentität in Prozent der Proteinmannosyltransferasen aus *C. neoformans* und *S. cerevisiae*

	CnPmt1p_D	CnPmt2p_D	CnPmt4p_D
CnPmt1p_D	100	30	30
CnPmt2p_D	30	100	38
CnPmt4p_D	30	38	100
CnPmt1p_A	98	30	30
CnPmt2p_A	30	97	38
CnPmt4p_A	30	38	98
ScPmt1p	40	34	37
ScPmt2p	35	53	42
ScPmt3p	34	51	41
ScPmt4p	29	38	52
ScPmt5p	36	39	42
ScPmt6p	33	49	39
ScPmt7p	21	31	30

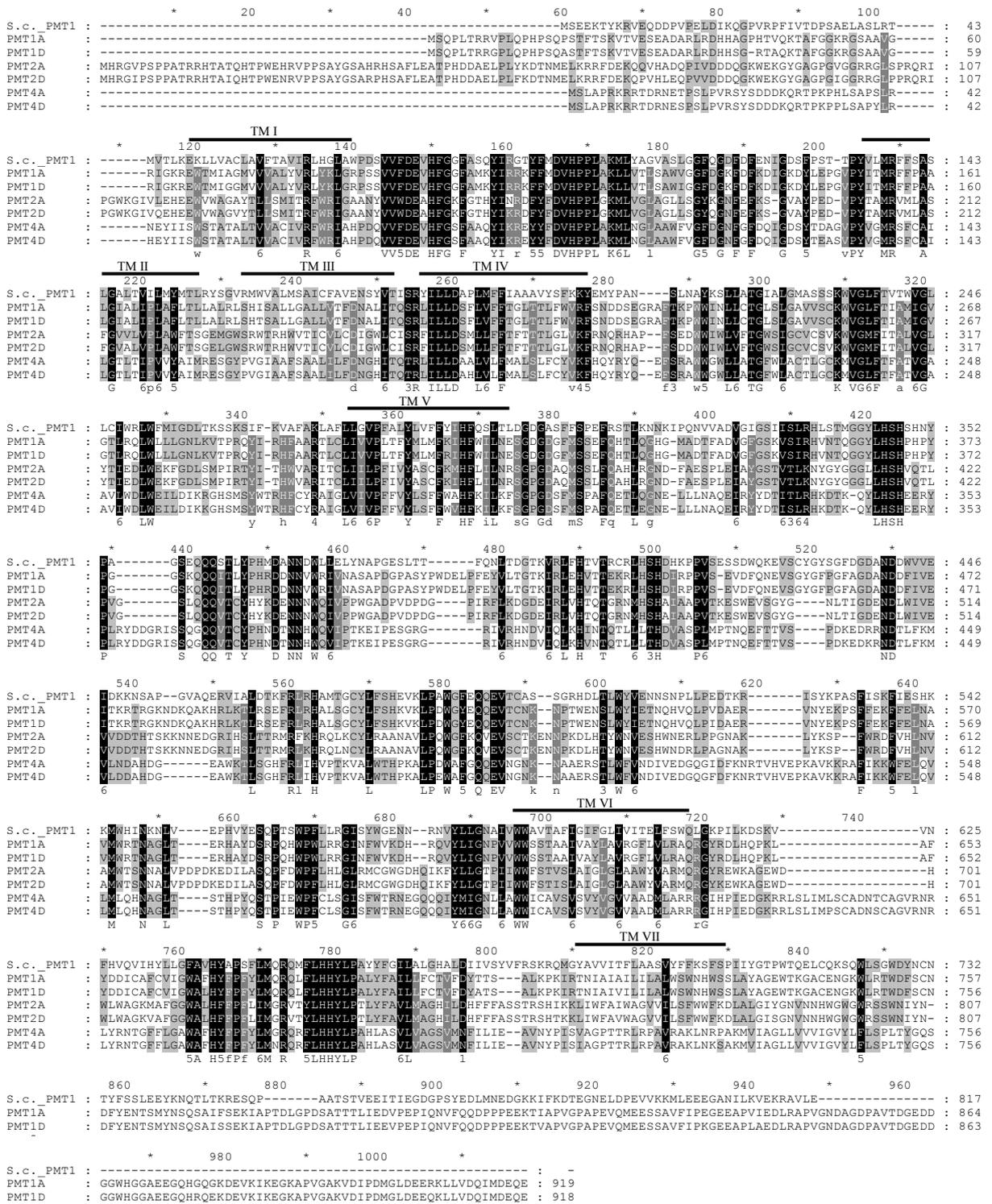
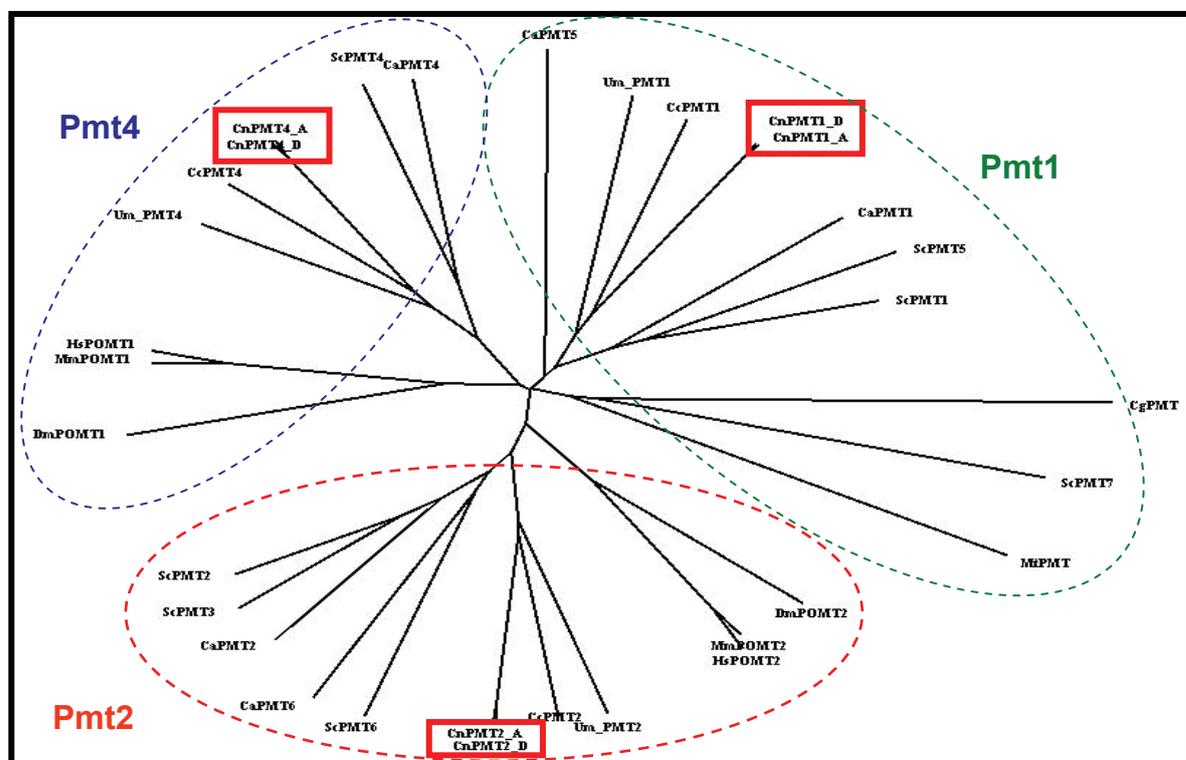


Abbildung 7: Sequenzvergleich der *C. neoformans* Pmt-Proteine und Pmt1p aus *S. cerevisiae*
 Dargestellt ist ein Sequenzvergleich der *C. neoformans* Pmt-Proteine der Serotypen A und D, verglichen mit Pmt1 aus *S. cerevisiae*. Schwarz gekennzeichnete Aminosäuren sind identisch, grau markierte Aminosäuren sind komplementäre Aminosäuren. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW angefertigt und mit Genedoc bearbeitet. Transmembrandomänen (TM) sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Zwischen TM V und TM VI befindet sich die für die katalytische Aktivität essentielle Schleife (Grahl, 2006).

Interessanterweise zeigt eine Datenbankanalyse, dass die meisten sequenzierten Pilzgenome wie z. B. *Magnaporthe grisea* oder *Ustilago maydis*, ähnlich wie *C. neoformans* ebenfalls nur

je einen Vertreter der drei *PMT*-Subfamilien aufweisen. Dieses steht im Gegensatz zu den Hefen *C. albicans* und *S. cerevisiae*, bei denen mehr als drei Proteinmannosyltransferasen (5 bzw. 7) identifiziert werden konnten. Ebenso scheinen auch einige andere Hefen wie z. B. *Kleuveromyces lactis* oder *Yarrowia lipolytica*, mehrere *Pmt*-Proteine aufzuweisen. In höheren Eukaryonten, wie *Drosophila melanogaster* und Säugetieren (Maus, Ratte, Mensch), sind dagegen nur noch zwei *PMT*-Gene, *POMT1* und *POMT2*, vorhanden. Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass das *POMT2*-Gen für ein Mitglied der *Pmt2*-Subfamilie, das *POMT1*-Gen für ein Mitglied der *Pmt4*-Subfamilie kodiert (Endo, 2004; Girrbach und Strahl, 2003; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), während ein Gen für ein Mitglied der *Pmt1*-Subfamilie nicht identifiziert werden konnte.



Ca: *C. albicans* Cc: *Coprinus cinereus* Cn: *C. neoformans* Dm: *Drosophila melanogaster*

Hs: *Homo sapiens* Mm: *Mus musculus* Sc: *S. cerevisiae* Um: *Ustilago maydis*

Cg: *Corynebacterium glutamicum* Mt: *Mycobacterium tuberculosis*

Abbildung 8: Phylogenetischer Stammbaum der *Pmt*-Proteinfamilie

Ein Sequenzvergleich der Proteine wurde mit ClustalW durchgeführt und mit SplitsTree4 dargestellt. Die Sequenzen stammen im Fall von *C. albicans* (Ca), *C. neoformans* (Cn), *S. cerevisiae* (Sc), *Coprinus cinereus* (Cc) und *Ustilago maydis* (Um) aus der Datenbank Resources for Fungal Comparative Genomics und bei *Drosophila melanogaster* (Dm), *Mus musculus* (Mm), *Homo sapiens* (Hs), *Corynebacterium glutamicum* (Cg) und *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) aus der Pubmed-Datenbank.

In Abbildung 8 ist ein phylogenetischer Stammbaum der *Pmt*-Proteine für einige ausgewählte Organismen dargestellt. Man kann zunächst die Einteilung der *Pmt*-Proteine in die drei

Subfamilien gut erkennen, wobei die Mitglieder der Subfamilien farblich eingekreist sind. Zudem erkennt man, dass die höheren Eukaryonten, in diesem Fall Säuger und Drosophila, nur Gene der Pmt2-Subfamilie (*POMT2*) und der Pmt4-Subfamilie (*POMT1*) besitzen. Betrachtet man die einzelnen Subfamilien getrennt, so kann man die zu erwartenden phylogenetischen Gruppierungen erkennen, wobei sich die Pmt-Proteine der höheren Eukaryonten, falls vorhanden, sehr früh von denen der Pilze trennen. Innerhalb der analysierten Pilze wiederum ist jeweils eine klare Trennung der Pmt-Proteine aus Ascomyzeten (*S. cerevisiae* (Sc) und *C. albicans* (Ca)) von denen der Basidiomyceten (*Coprinus cinereus* (Cc), *Ustilago maydis* (Um)), zu denen auch *C. neoformans* (Cn) gehört, zu erkennen.

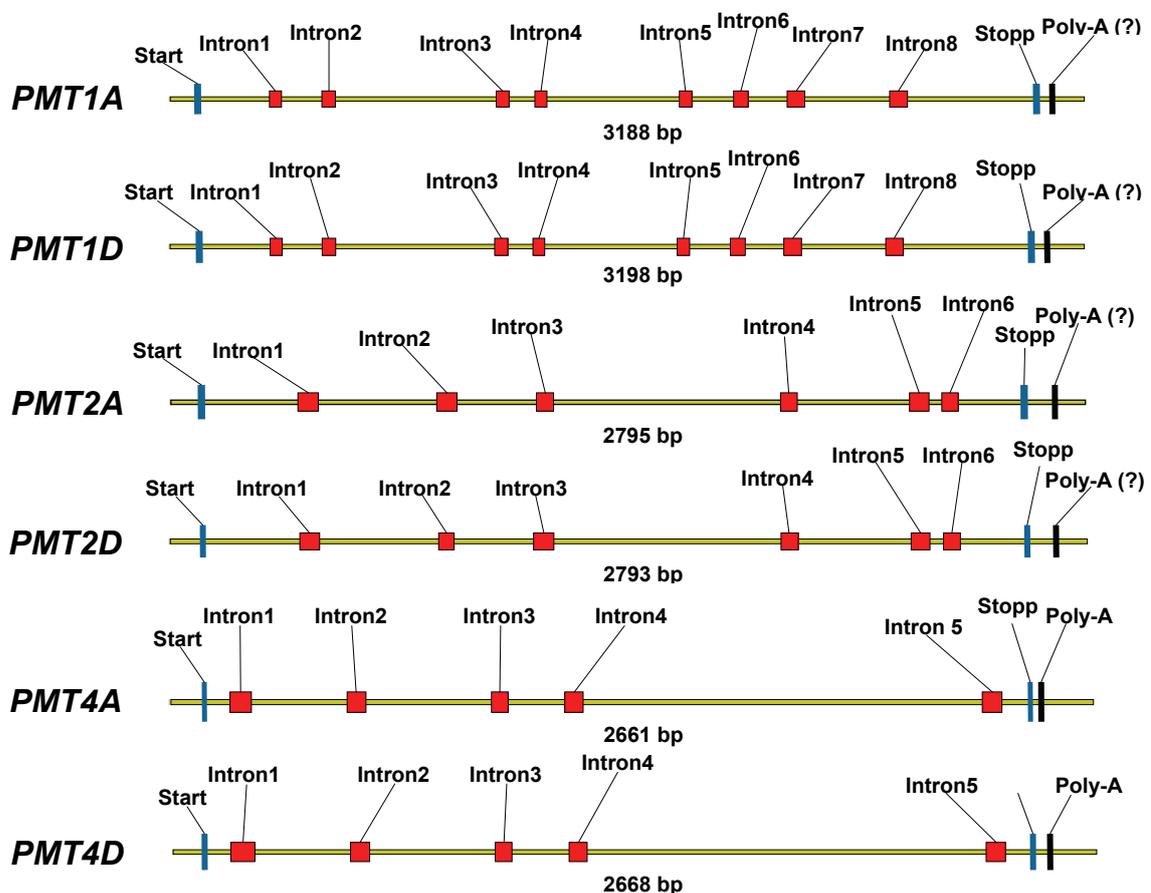


Abbildung 9: Genstruktur der *PMT*-Gene

Die aus der Datenbank Resources for Fungal Comparative Genomics (<http://fungal.genome.duke.edu/>) gewonnenen Genstrukturen der *PMT*-Gene konnten durch die generierte cDNA, bestätigt werden. Für die *PMT*-Gene konnte die Struktur von Start- bis Stoppcodon überprüft werden. Dargestellt sind jeweils der Transkriptionsstart, die Lage der Introns, die Position des Stoppcodons, die Poly-Adenylierungsstelle und die Länge der unterschiedlichen *PMT*-Gene (Grahl, 2006).

Ähnlich wie bei den höheren Eukaryonten besitzen alle Gene von *C. neoformans* eine ausgeprägte Exon/Intron-Struktur. Durch einen Vergleich der Nukleotidsequenzen der *PMT*-

Gene mit den Proteinsequenzen aus der Datenbank „Resources for Fungal Comparative Genomics“ (<http://fungal.genome.duke.edu/>) konnten die Positionen der Introns in den *PMT*-Gene für den Serotyp D ermittelt werden. In *PMT1* konnten so 8 Introns, in *PMT2* 6 Introns und in *PMT4* 5 Introns identifiziert werden. Die relative Lage der Introns innerhalb der *PMT*-Gene ist in Abbildung 9 dargestellt. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und um die Lage der Introns in den *PMT*-Gene des Serotyps A herauszufinden wurde in unserer Arbeitsgruppe die cDNA der jeweiligen Gene synthetisiert und anschließend sequenziert. Dabei konnten die bisher nur postulierten Positionen der Introns bestätigt werden (Grahl, 2006). Wie bei knapp 2-3 % Sequenzunterschied nicht anders zu erwarten befanden sich die Introns der jeweils entsprechenden *PMT*-Gene aus den beiden untersuchten Serotypen an identischen Positionen (Abbildung 9).

Proteinfamilien entstehen im Laufe der Evolution oftmals durch Duplikationen mit anschließenden Mutationen aus einem bestimmten Ur-Gen. Ein Beispiel hierfür sind vermutlich auch die sieben Mitglieder der Pmt Proteinfamilie in *S. cerevisiae*, die vermutlich zum Teil durch eine Genomduplikation während der Evolution von *S. cerevisiae* entstanden sind. Ein Hinweis darauf, ob bestimmte Gene durch Duplikationen entstanden sind, kann in eukaryotischen Organismen oftmals die Exon/Intron Struktur der betroffenen Gene liefern. Im Falle einer Genduplikation sind in der Regel die Positionen der Introns zumindest zum Teil konserviert. In ähnlicher Weise kann die konservierte Lage der Exons/Introns auch einen Hinweis auf eine mögliche Fusion von unterschiedlichen Genen während der Evolution liefern. Eine diesbezügliche Analyse der *PMT*-Gensequenzen von *C. neoformans* zeigte aber, dass sich die einzelnen Introns innerhalb der drei *PMT*-Gene nicht an konservierten Positionen befinden (Abbildung 9). Dieses lässt vermuten, dass die *PMT*-Gene *PMT1*, *PMT2* und *PMT4* in *C. neoformans* wahrscheinlich nicht durch Genduplikationen, sondern vermutlich durch parallele Entwicklung entstanden sind.

Bei den Pmt-Proteinen handelt es sich um eine hoch konservierte Proteinfamilie. Aus der hohen Ähnlichkeit der Pmt-Proteine auf der Ebene der Aminosäuresequenz ergibt sich zwangsweise auch eine hohe Ähnlichkeit der Proteine in ihrer gesamten Struktur. Die Topologie der Protein-*O*-Mannosyltransferasen wurde bei *S. cerevisiae* für Pmt1p bereits näher untersucht und ergab ein Protein mit sieben Transmembrandomänen (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Des Weiteren konnte für ScPmt1p eine große hydrophile Schleife zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion identifiziert werden, die in das Lumen des ER weist und für die Transferaseaktivität von ScPmt1p essentiell ist. Während diese Schleife in allen eukaryotischen Pmt-Proteinen hoch konserviert ist, ist diese Schleife

interessanterweise in den prokaryotischen Pmt-Proteinen weit weniger ausgeprägt (Mahne *et al.*, 2006). Eine weitere funktionelle Domäne der Pmt-Proteine konnte im Aminoende identifiziert werden. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Dimerisierung der Pmt-Proteine. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den Pmt-Proteinen von *C. neoformans* und *S. cerevisiae* (Abbildung 7) kann angenommen werden, dass die gerade erwähnten Domänen bei den Pmt-Proteinen von *C. neoformans* in den entsprechenden Proteinbereichen zu finden sind. In Abbildung 7 ist ein Aminosäurevergleich aller *C. neoformans* Pmt-Proteine mit ScPmt1p dargestellt. Der aus Abbildung 7 ersichtliche, für Proteinmannosyltransferasen typische Aufbau aus sieben Transmembrandomänen, lässt sich auch durch Hydropathieplots der Pmt-Proteine von *C. neoformans* belegen (Abbildung 10).

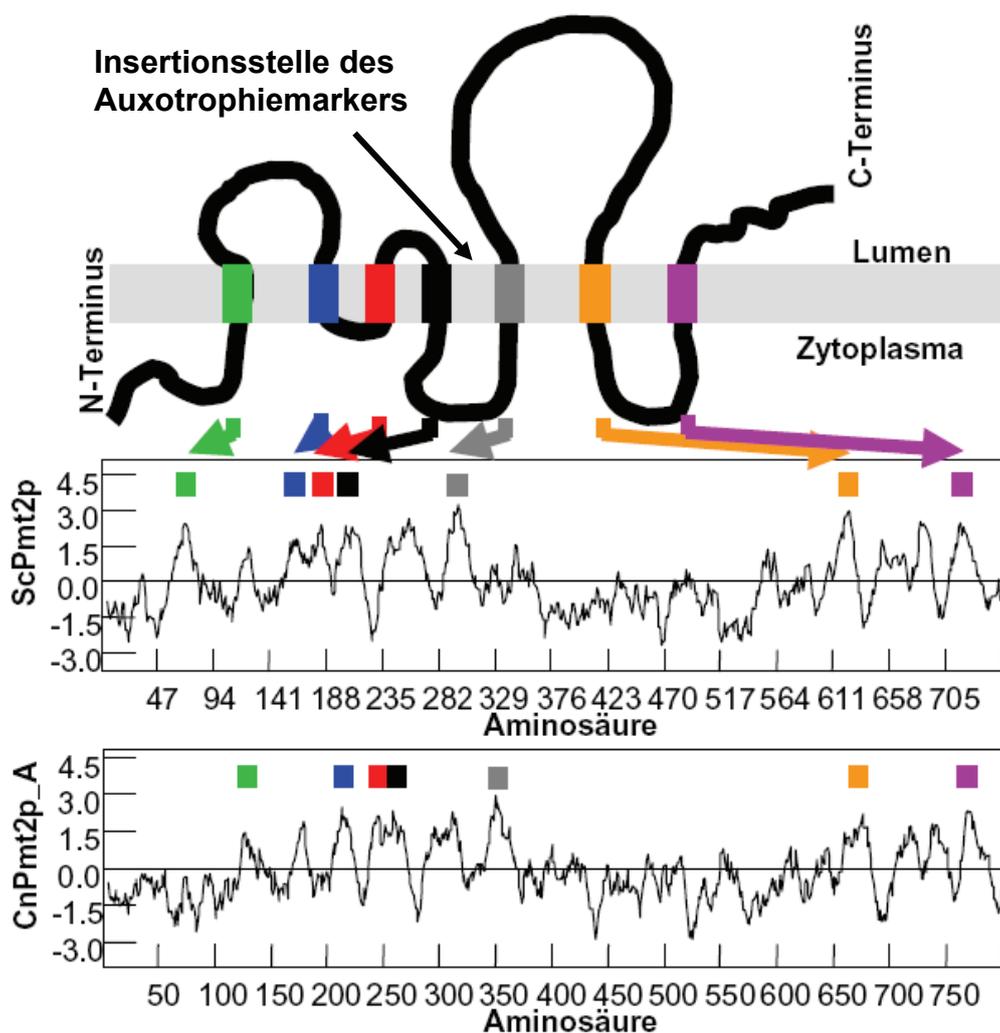


Abbildung 10: Topologie eines Pmt Proteins

Dargestellt ist die angenommene Topologie des *S. cerevisiae* ScPmt2p mit dem dazugehörigen Hydropathieplot, mit farblich markierten Transmembrandomänen. Vergleichend dazu sind die potentiellen Transmembrandomänen des *C. neoformans* CnPmt2 des Serotyps A, in den gleichen Farben markiert, dargestellt. Die Hydropathie Profile wurden nach Kyte & Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) berechnet.

4.2. Konstruktion von *PMT*-Insertionsmutanten

Zur weiteren Charakterisierung der *PMT*-Gen-Familie in *C. neoformans* sollten die Gene *PMT1*, *PMT2* und *PMT4* sowohl im Serotyp A als auch im Serotyp D durch eine gerichtete Insertionsmutagenese mutiert und anschließend phänotypisch charakterisiert werden. Für die Mutagenese der *PMT*-Gene mussten für die sechs Gene zunächst entsprechende Insertions-Kassetten hergestellt werden. Dazu wurden zuerst über PCR ausreichend große DNA-Fragmente aus den entsprechenden genomischen *PMT*-Regionen kloniert. Für eine optimale Transformation bzw. homologe Rekombination in *C. neoformans* werden normalerweise zwischen 600-1000 bp homologe Sequenzen auf jeder Seite der Integrationsstelle benötigt. Aus diesem Grund wurde eine Insertionsmutagenese einer kompletten Deletion der Gene vorgezogen, um zu verhindern, dass bei einer Deletion unmittelbar oberhalb oder unterhalb der *PMT*-Gene befindliche ORFs eventuell im Rahmen der Mutagenese durch Fehler bei den Rekombinationprozessen ebenfalls mutiert werden. Die klonierten Fragmente umfassten jeweils den gesamten ORF der verschiedenen *PMT*-Gene und waren zwischen 2.5 und 3 kb groß. Die so erhaltenen Plasmide wurden als pPMT1A, pPMT2A, pPMT4A, pPMT1D, pPMT2D und pPMT4D benannt, wobei A bzw. D den jeweiligen Serotyp des Stamms angeben, aus dem die Matrizen-DNA für die PCR gewonnen wurde. Als Selektionsmarker für die anschließende Konstruktion der Insertions-Kassette wurden die Auxotrophiemarker *ADE2* bzw. *URA5* verwendet. Die Verwendung dominanter Antibiotikamarker wurde zunächst nicht in Betracht gezogen, da die zur Selektion verwendeten Chemikalien oftmals einen negativen Einfluss auf die Zellwand der Organismen haben. In anderen Organismen konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen in *PMT*-Genen zumeist mit schweren Defekten in der Zellwand einhergehen. Aus diesem Grund war zu befürchten, dass bei einer Verwendung dominanter Marker keine Transformanten zu erhalten sein würden, da diese bereits frühzeitig absterben könnten.

Zur Integration der Auxotrophiemarker in die *PMT*-ORFs wurden in die Plasmide pPMT2A, pPMT4A, pPMT1D, pPMT2D und pPMT4D jeweils eine *Bgl*III Restriktionsschnittstelle durch *in vitro*-Mutagenese eingefügt. Die Lage der Schnittstelle wurde so gewählt, dass der Auxotrophiemarker noch vor der fünften Transmembrandomäne eingefügt werden konnte (siehe Pfeil in Abbildung 10). Dadurch sollte gewährleistet werden, dass selbst bei einer eventuellen Transkription/Translation des mutierten Gens die Synthese der für die Enzymaktivität essentiellen Schleife zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 nicht erfolgen kann. Die Plasmide wurden entsprechend als pPMT2A_*Bgl*III, pPMT4A_*Bgl*III,

pPMT1D_*Bgl*III, pPMT2D_*Bgl*III und pPMT4D_*Bgl*III bezeichnet. Das Einfügen einer *Bgl*III Restriktionsschnittstelle in pPMT1A war nicht erforderlich, da eine in dem entsprechenden Bereich vorhandene *Eco*RV Restriktionsschnittstelle benutzt werden konnte. Über die *Bgl*III Schnittstelle wurde anschließend ein 2.9kb *ADE2* Fragment aus dem Vektor pRCD27, oder ein 2.4kb großes *URA5* Fragment aus dem Plasmid pCnTel1_*Bam*HI in diese Plasmide integriert (Abbildung 11).

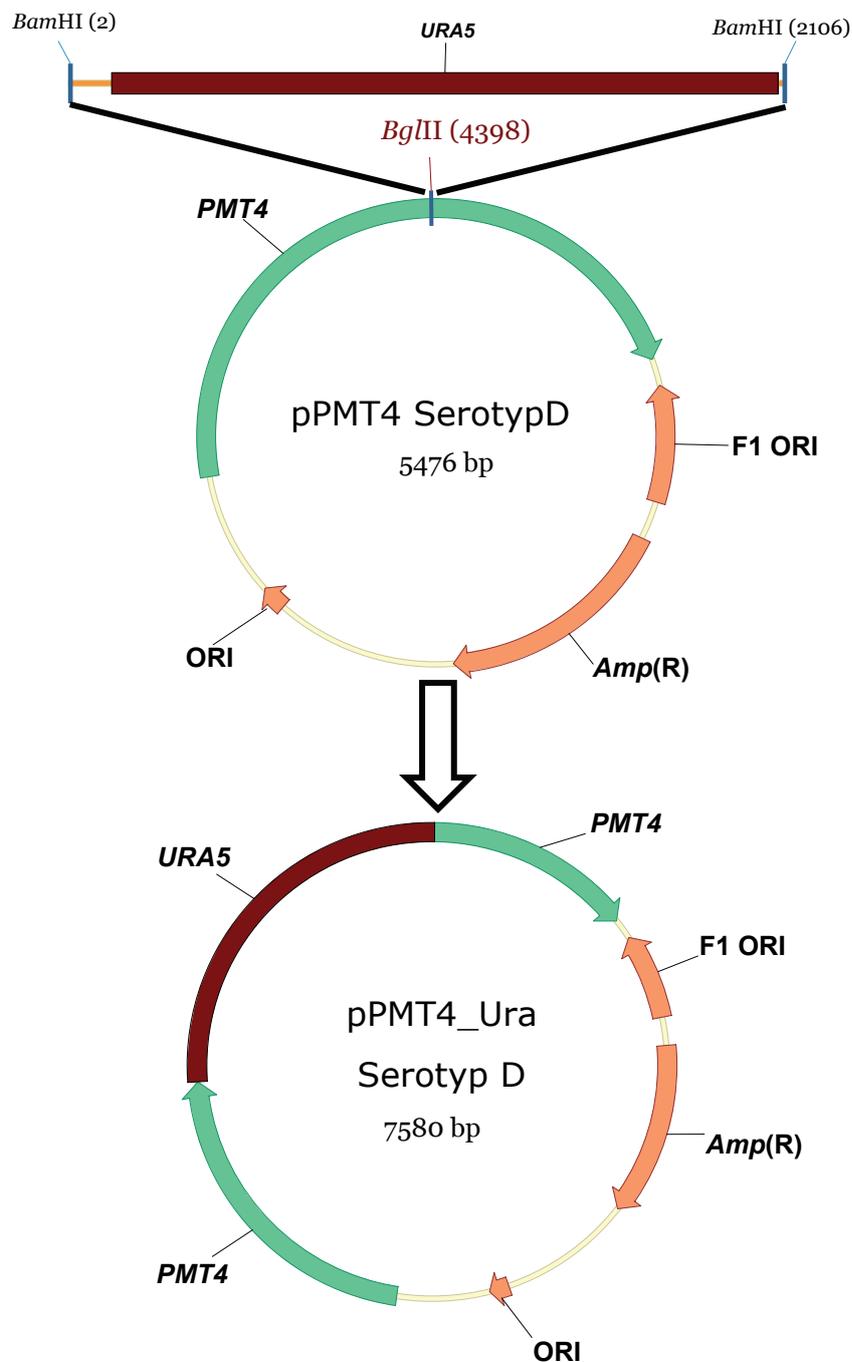


Abbildung 11: Herstellung der Insertionsmutagenese-Kassetten am Beispiel von *PMT4*

Das Plasmid pPMT4D wurde mittels der Restriktionsendonuklease *Bgl*III linearisiert. Als Insert diente das *URA5* Gen, das aus dem Plasmid pCnTel durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI freigelegt wurde. Durch Ligation der beiden Teile entsteht das Plasmid pPMT4D_Ura, das für die Disruption des *PMT4* Gens in *C. neoformans* Serotyp D eingesetzt wurde. Dieses Disruptionsschema wurde für alle *PMT* Gene, sowohl Serotyp A als auch Serotyp D, angewendet.

Die so entstandenen Plasmide wurden im Anschluss in der Insertions-Mutagenese der PMT-Gene eingesetzt. Für den Serotyp A wurden die jeweiligen *URA5*-Plasmide durch Teilchenbeschuss (siehe Kapitel 3.4.2.2) in den Stamm F99 (*MAT α ura5*) transformiert. Im Serotyp A konnten nur die auf dem Marker *URA5* basierenden Plasmide verwendet werden, da für diesen Serotyp bislang keine brauchbaren Adenin-auxotrophen Stämme existieren. Die so erhaltenen Transformanten wurden zunächst mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Oligonukleotide C-8 (für PMT1_A), C-10 (für PMT2_A), C-12 (für PMT4_A) und jeweils C-76 (*Ura_veri_hinten*) auf eine korrekte Integration des Disruptionskonstrukts getestet (Abbildung 12 B). Bei einer Integration der Insertions-Kassette am entsprechenden Genort sollten DNA-Fragmente von 1583 bp (für PMT1_A), 1468 bp (für PMT2_A) und 1176 bp (für PMT4_A) erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Verdeutlichung sind die unterschiedlichen Disruptionssituationen in Abbildung 12 schematisch und exemplarisch für den Serotyp A für die Insertion des *URA5* Gens in den *PMT1*-Locus dargestellt.

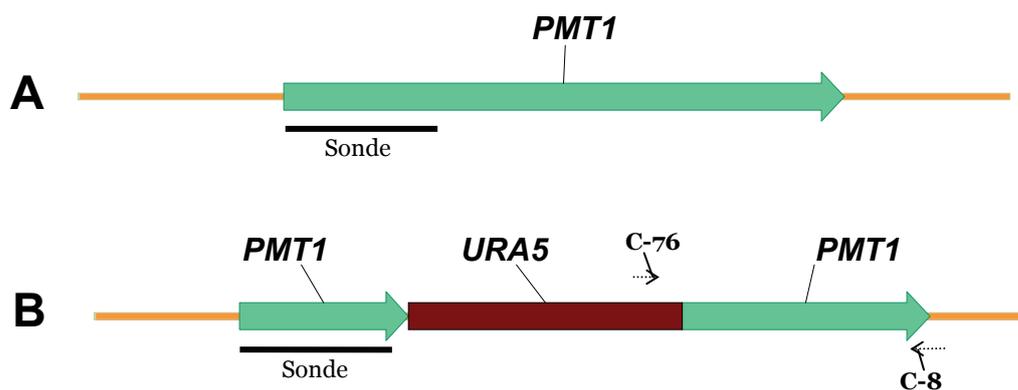


Abbildung 12: Schematische Darstellung des *PMT1* Locus auf dem Serotyp A *C. neoformans* Genom

A Wildtypsituation **B** Situation nach Insertion der Disruptionskassette. Die Bindestelle der benutzen Sonde (1104 bp) ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet (Sonde) und befindet sich im vorderen Teils des *PMT1* Gens. Die Oligonukleotide C-76 (*Ura_veri_hinten*) und C-8 (*PMT1_A*) wurden für die Kolonie-PCR eingesetzt und ergeben ein PCR-Produkt von 1583 bp. Der kodierende Bereich des *PMT1* Gens ist grün eingefärbt, während das *URA5* Gen rot dargestellt ist.

In Abbildung 12 ist exemplarisch die Lage der Southern-Sonde für PMT1A dargestellt. In Abbildung 12 A ist die Wildtypsituation abgebildet. In Abbildung 12 B erkennt man, dass im *PMT1*-Locus integrierte *URA5* Gen. Weiterhin dargestellt ist der Bindebereich der Sonde im *PMT1* Gen. Die Sonde mit einer Gesamtlänge von 1104 bp wurde mittels PCR und anschließender Markierung hergestellt (siehe Kapitel 3.3). Für die PCR wurden das Plasmid pPMT1D und die Oligonukleotide C-1 (*PMT_1_D fw*) und C-25 (*PMT1D_Bgl2_rev*) eingesetzt.

Auf diese Weise konnten sowohl für *PMT1A* als auch *PMT4A* eine potentielle Insertions-Mutante hergestellt werden (SW13; *MAT α pmt1::URA5*, bzw. SW14; *MAT α pmt4::URA5*). Im Gegensatz zu *PMT1* und *PMT4* konnte trotz mehrfacher Versuche für *PMT2* im Serotyp A keine Insertionsmutante hergestellt werden. Abschließend wurden die beiden potentiellen Insertionsmutanten SW13 und SW14 mit Hilfe einer Southern-Analyse verifiziert (Abbildung 13). Hierzu wurde für die Überprüfung der *pmt1*-Mutation die genomische DNA des Wildtyps H99 und der potentiellen Mutante SW13 mit *Bam*HI verdaut und für die *pmt4*-Mutation mit *Nsi*I. In der anschließenden Southern-Analyse lieferte dies für den Wildtyp ein *PMT1*-Fragment von 3668 bp bzw. ein *PMT4*-Fragment von 8560bp (Abbildung 13). Bei einer korrekten Integration des *URA5* Auxotrophiemarkers ergaben sich entsprechend Fragmente der Größen 5850 bp (SW13) bzw. 10664 bp (SW14).

Im Gegensatz zum Serotyp A wurden für den Serotyp D Disruptionskonstrukte mit beiden Auxotrophiemarkern (*ADE2* bzw. *URA5*) hergestellt und in entsprechende *C. neoformans* Stämme transformiert. Die Herstellung von *pmt*-Insertionsmutanten mit unterschiedlichen Selektionsmarkern sollte im Weiteren die Herstellung von Doppelmutanten durch Kreuzung ermöglichen. Aus diesem Grund wurden alle *URA5* bzw. *ADE2* Insertions-Kassetten in die Stämme JEC155 (*MAT α ade2-27 ura5*) sowie JEC156 (*MAT α ade2-27 ura5*) mittels Teilchenbeschuss transformiert. Die Selektion erfolgte entsprechend entweder auf SC-Medium ohne Uracil bzw. Adenin. Die erhaltenen Transformanten wurden wie oben beschrieben zunächst mittels Kolonie-PCR auf eine korrekte Integration des Disruptionskonstrukts getestet, wobei die Oligonukleotide C-2 (für *PMT1_D*), C-4 (für *PMT2_D*), C-6 (für *PMT4_D*) und jeweils C-76 (*Ura_veri_hinten*) bzw. C-73 (*Ade_veri_vorne*) eingesetzt wurden. Bei einer positiven Integration der Kassetten wurden Produkte von 1738 bp (für *PMT1_D_Ura*) und 1319 bp (für *PMT4_D_Ura*), bzw. 1981 bp (für *PMT1_D_Ade*) und 1302 bp (für *PMT4_D_Ade*) erhalten (Daten nicht gezeigt). In einem ersten Schritt wurde zunächst nur darauf geachtet, dass von jedem zu untersuchenden Gen sowohl eine Transformante mit *ADE2* und *URA5* als Selektionsmarker möglichst in unterschiedlichen Paarungstyp-Hintergründen identifiziert werden konnte. Fehlende auxotrophe bzw. prototrophe mutante Stämme wurden in einem zweiten Schritt durch Kreuzung untereinander, oder durch Kreuzung mit den Stämmen JEC34 (*MAT α ura5*), JEC43 (*MAT α ura5*) bzw. JEC50 (*MAT α ade2-27*) hergestellt. Die Sporen dieser Kreuzungen wurden auf entsprechenden SC-Minimalmedien ausplattiert und zur Feststellung des Paarungstyps anschließend mit den Wildtyp Stämmen JEC20 (*MAT α*) und JEC21 (*MAT α*) rückgekreuzt. Auf diese Weise wurden folgende Stämme hergestellt: SW1 (*MAT α*

pmt1::ADE2), SW2 (*MATa pmt1::ADE2*), SW4 (*MATa pmt1::URA5 ade2-27*), SW5 (*MATa pmt1::URA5*), SW6 (*MAT α pmt1::URA5*), SW7 (*MATa pmt4::ADE2 ura5*), SW8 (*MATa pmt4::ADE2*), SW9 (*MAT α pmt4::ADE2*), SW10 (*MAT α pmt4::URA5 ade2-27*), SW11 (*MATa pmt4::URA5*), sowie SW12 (*MAT α pmt4::URA5*). Alle so hergestellten Mutanten wurden abschließend in Analogie zum Serotyp A zusätzlich mit Hilfe einer Southern-Analyse bestätigt (Abbildung 13).

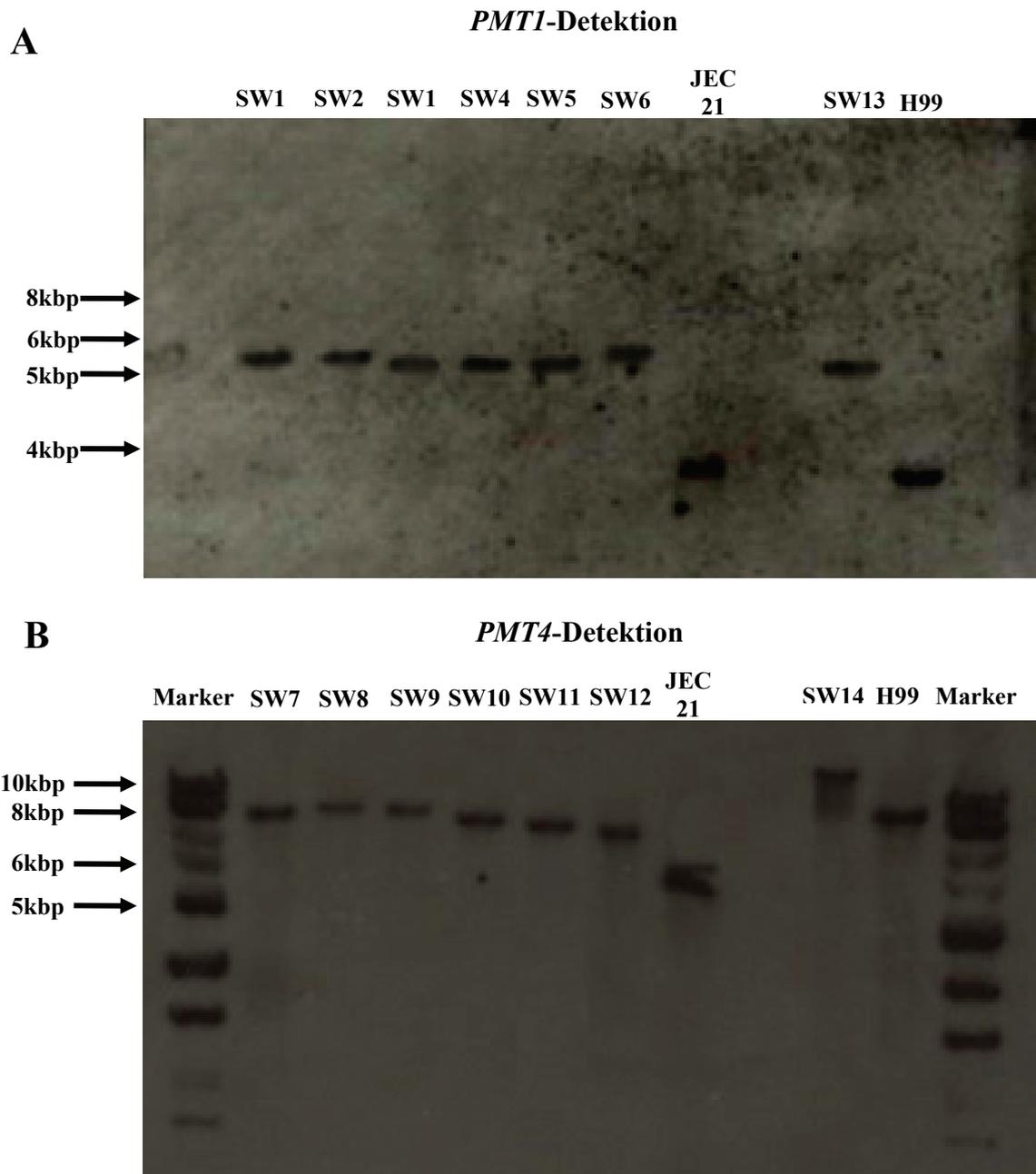


Abbildung 13: Southernblot Analyse verschiedener *C. neoformans* Stämme

Die chromosomale DNA der Stämme SW1, SW2, SW4, SW5, SW6, SW7, SW8, SW9, SW10, SW11, SW12 und JEC21 wurde mit *NdeI* geschnitten. Für die *PMT1* Detektion des Serotyps A wurde die DNA der Stämme SW13 und H99 mit *BamHI* und für die *PMT4* Detektion des Serotyps A wurde die DNA der Stämme SW14 und H99 mit *NsiI* geschnitten. Als Sonde wurde für die *PMT1* Detektion (A) ein 1104 bp großes, und für die *PMT4* Detektion (B) ein 1091 bp großes genspezifisches DNA-Fragment benutzt.

Die genomische DNA der zu untersuchenden Stämme wurde dazu mit *NdeI* verdaut und auf Nylon-Membran übertragen. Nach der entsprechenden Hybridisierung mit den *PMT*-spezifischen Sonden wurden für den Wildtyp JEC21 mit der *PMT1*-Sonde ein Fragment von 3786 bp und bei der *PMT4*-Sonde eine von 5364 bp erwartet. Für die *pmt1 ADE2*-Integrations-Stämme SW1 und SW2 wurde ein Fragment von 6643 bp, bzw. für die *pmt4 ADE2*-Integrations-Stämme SW7, SW8 und SW9 ein Fragment der Größe von 8221 bp erwartet. Bei den entsprechenden *URA5*-Konstrukten wurde mit der *PMT1*-Sonde ein Fragment der Größe 5890 bp (SW4, SW5 und SW6), und mit der *PMT4*-Sonde ein Fragment von 7468 bp (SW10, SW11 und SW12) erwartet (Abbildung 13).

Wie bereits erwähnt konnte für den Serotyp A trotz mehrerer Versuche keine *pmt2A* Insertionsmutante identifiziert werden. In gleicher Weise konnte auch für das Gen *PMT2D* weder mit der *ADE2* noch mit der *URA5* basierenden Insertionsmutations-Kassette eine potentielle Mutante identifiziert werden. Zusammenfassend könnte dies darauf hinweisen, dass *Pmt2* essentiell für das Überleben von *C. neoformans* ist.

4.3. Rekonstituierung der *pmt*-Mutanten

Um eindeutig beweisen zu können, dass morphologische Veränderungen, Wachstumsdefekte unter verschiedensten Bedingungen oder eine verringerte Virulenz auf eine entsprechende Mutationen zurückzuführen sind, werden typischerweise rekonstituierte Stämme auf eine Reversion der gefundenen Phänotypen untersucht. Hierzu wurden zunächst ausreichend große genomische Fragmente der *PMT*-Gene aus den pCnTel-PMT-Plasmiden (Grahl, 2006) durch *BamHI* Restriktionsverdau ausgeschnitten. Diese Fragmente wurden dann jeweils in das durch *BamHI* Restriktionsverdau linearisierte Plasmid pJAF1 ligiert (Abbildung 14). Dieses Plasmid trägt den dominanten Marker Amino 3'-Glykosylphosphotransferase (*NEO*), welcher Resistenz gegen das Antibiotikum G418 vermittelt. Wie oben erwähnt, zeigen viele *pmt*-Mutanten einen ausgeprägten Zellwanddefekt, der oftmals mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber bestimmten Antibiotika einhergeht. Um etwaige negative Auswirkungen von G418 auf die Transformationseffizienz bzgl. der verwendeten Stämme ausschließen zu können, wurden diese auf ihre Sensitivität gegenüber G418 überprüft. Eine erhöhte Sensitivität der *pmt*-Mutanten gegenüber G418 konnte nicht festgestellt werden (siehe Kapitel 4.5). Die so entstandenen Plasmide pPMT1A-NeoR, pPMT4A-NeoR, pPMT1D-NeoR und pPMT4D-NeoR wurden dann in die entsprechenden Disruptionsstämme durch Teilchenbeschuss transformiert. Da für den Serotyp A nur Disruptionen mit dem Auxotrophiemarker *URA5*

möglich waren, wurden aus Gründen des besseren Vergleichs auch die Rekonstitutionen der *pmt*-Mutanten des Serotyps D in den Stämmen mit dem *URA5* Hintergrund durchgeführt. Da es bei der Rekonstitution zunächst meist nicht entscheidend ist, wo die Plasmide in das Genom integriert werden, wurden die Transformanten lediglich auf G418-haltigen Agarplatten auf das Vorhandensein des *NEO* Gens selektiert.

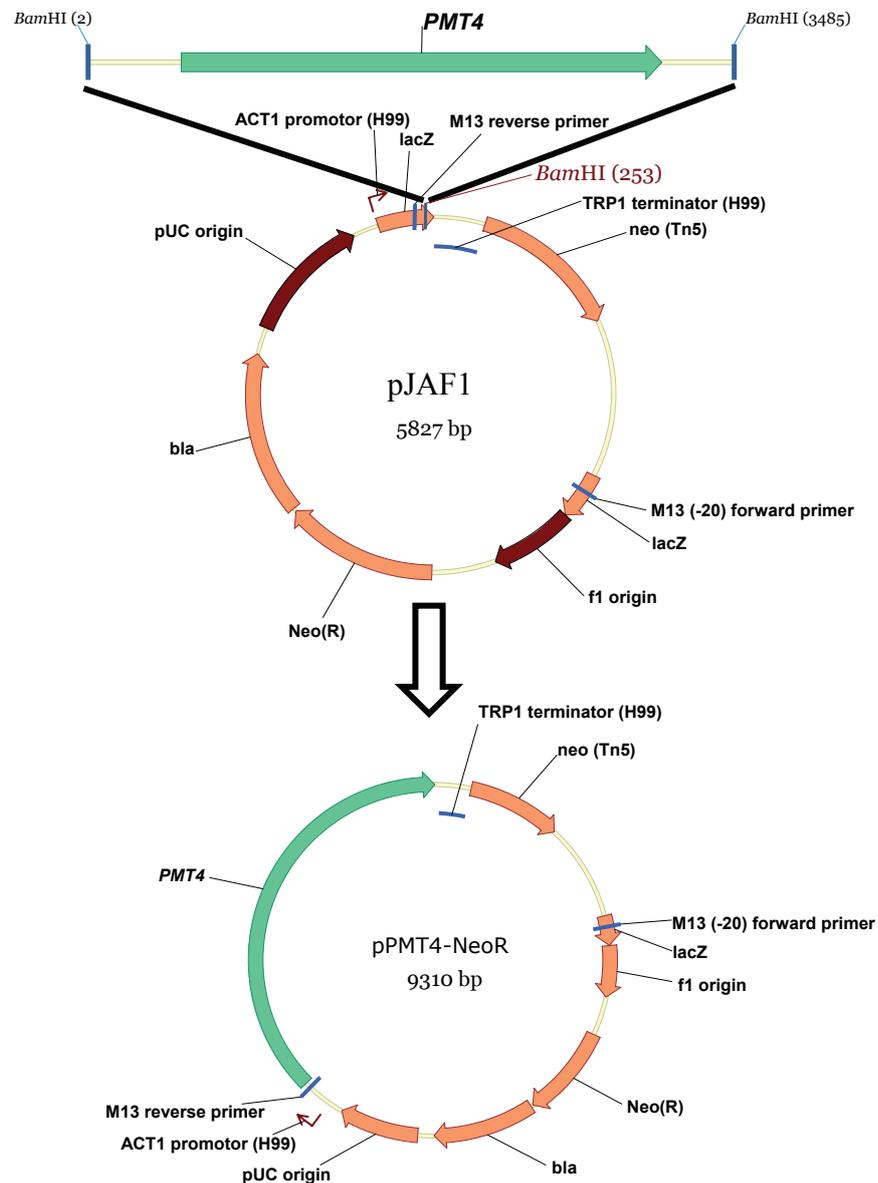


Abbildung 14: Exemplarisches Klonierungsschema für Plasmide zur Rekonstituierung der *pmt*-Mutanten
 Das Plasmid pJAF1 wurde mittels der Restriktionsendonuklease *Bam*HI linearisiert. Als Insert diente hier exemplarisch das *PMT4*-Gen, das aus dem Plasmid pCnTel-*PMT4D* durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI freigesetzt wurde. Durch Ligation der beiden Fragmente entstand das Plasmid pPMT4D-NeoR, das für die Rekonstituierung des *PMT4*-Gens in *C. neoformans* Serotyp D eingesetzt wurde. Dieses Disruptionsschema wurde auch für *PMT1*, sowohl Serotyp A als auch Serotyp D, angewendet.

4.4. Die *pmt2*-Mutante und die *pmt1 pmt4*-Doppelmutante sind *letal*

Wie oben erwähnt, konnten weder für den *C. neoformans* Serotyp A noch den Serotyp D *pmt2* Mutanten hergestellt werden. Interessanterweise konnte vor kurzem in *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005) und *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005) gezeigt werden, dass die Deletion von *PMT2* in diesen Organismen letal ist. Durch weitere Untersuchungen sollte daher überprüft werden, ob *PMT2* in *C. neoformans* eventuell ebenfalls essentiell ist. Um diese Hypothese zu bestätigen wurden zwei Ansätze verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde in die Stämme JEC155 (*MAT α ade2-27 ura5*) bzw. JEC156 (*MAT α ade2-27 ura5*) durch Elektroporation das Plasmid pCtel-PMT2D transformiert. Mit Hilfe dieses Plasmids konnten unter selektiven Bedingungen zusätzliche Kopien des *PMT2D*-Gens in Form von episomalen Elementen stabil in den Zellen etabliert werden (siehe Kapitel 3.4.2.1). Anschließend wurde versucht, die endogene Kopie des *PMT2*-Gens durch das *ADE2*-Insertionsmutations-Konstrukt zu mutieren. Sollte das Gen *PMT2* essentiell sein, dürfte auch nach dem Entfernen des Selektionsdrucks auf die episomalen Elemente (Wachstum auf Vollmedium) diese nicht verlorengehen. Leider konnten bislang keine Stämme hergestellt werden, bei denen die endogene Kopie des *PMT2* Gens mutiert war.

In einem zweiten Ansatz wurde zunächst durch Kreuzung entsprechend auxotropher Stämme ein diploider *ade2-27* Stamm produziert (Sia *et al.*, 2000). Dieser wurde anschließend durch Teilchenbeschuss mit dem *pmt2::ADE2* Disruptionskonstrukt transformiert, und die Transformanten über Kolonie-PCR auf eine entsprechende Integration der Disruptions-Kassette getestet (siehe Kapitel 4.2). Auf diese Weise konnten 4 heterozygote *PMT2 / pmt2::ADE2* Stämme identifiziert werden. Diese Stämme wurden anschließend sporuliert und die Basidiosporen auf SD-Medium ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen filamentieren diploide *C. neoformans* Stämme und können so leicht von potentiellen haploiden, rekombinanten Stämmen unterschieden werden. Insgesamt 50 nicht filamentierende Stämme wurden anschließend durch Kolonie-PCR näher analysiert, wobei gezeigt werden konnte, dass in allen getesteten Stämmen das Wildtyp *PMT2* Gen immer noch vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Berücksichtigt man die Tatsache, dass auch nach mehreren Transformations-Versuchen keine haploiden *pmt2*-Stämme hergestellt werden konnten, so lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, dass *PMT2* in den *C. neoformans* Varietäten *neoformans* und *grubii* essentiell ist.

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt wurde ist die Protein-*O*-Glykosylierung ein essentieller Prozess. Zusätzlich gilt *Pmt2* in vielen Organismen als das Hauptenzym dieser Glykosylierungsform, was im Einklang damit steht, dass in einigen Organismen eine Mutation von *Pmt2* letal ist. Zum anderen sind die Protein-*O*-Mannosyltransferasen nur als Dimere aktiv, wobei *Pmt2* offensichtlich nur Heterodimere bilden kann. Aus diesen Gründen bestand die Möglichkeit, dass neben der *pmt2* Einzel-Mutation eine *pmt1 pmt4*-Doppelmutation in *C. neoformans* ebenfalls letal ist. Diese Hypothese sollte im Weiteren durch Kreuzungsexperimente zwischen einem *pmt1*-Stamm und einem *pmt4*-Stamm überprüft werden. Hierzu wurden der *pmt1*-Stamm SW4 (*MAT α pmt1::URA5 ade2-27*) und der *pmt4*-Stamm SW19 (*MAT α pmt4::ADE2 ura5*), eine 5'-FOA resistente Version des Stamms SW9 (*MAT α pmt4::ADE2*), auf V8-Agarplatten gekreuzt und für 10 Tage bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Nach den 10 Tagen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators Basidiosporen auf YPD-Agarplatten vereinzelt und bei 30 °C inkubiert. Insgesamt konnten auf diese Weise 15 rekombinante Nachkommen isoliert werden. Anschließend wurde mittels „Smash and Grab“ Methode (siehe Kapitel 3.1.2.1) von diesen Stämmen genomische DNA isoliert und über PCR der Genotyp bezüglich der *PMT*-Gene überprüft. Als Kontrolle für die Wildtyp Gene wurde DNA des Wildtyp Stamms JEC21 eingesetzt. In der PCR wurden für *PMT1* die Oligonukleotide C-1 (*PMT_1_D fw*) und C-2 (*PMT_1_D rev*), und für *PMT4* die Oligonukleotide C-5 (*PMT_4_D fw*) und C-6 (*PMT_4_D rev*) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde für das Wildtyp *PMT1*-Gen ein Produkt von 2850 bp und für das *pmt1::URA5* Allel ein Produkt von 4954 bp erwartet (Abbildung 15 A). Bei *PMT4* beträgt die Länge der Wildtyp Fragments 2589 bp und die des *pmt4::ADE2* Allels 5446 bp (Abbildung 15 A). Abbildung 15 A zeigt, dass unter den 15 getesteten Nachkommen vier Stämme den rekombinanten Genotyp *PMT1 PMT4* (Stämme 4, 5, 8, und 10), fünf Stämme den parentalen Genotyp *pmt1::URA5 PMT4* (Stämme 3, 7, 9, 11, und 15), und 6 Stämme den parentalen Genotyp *PMT1 pmt4::ADE2* aufweisen (Stämme 1, 2, 6, 12, 13, und 14). Interessanterweise konnte kein Stamm des Genotyps *pmt1::URA5 pmt4::ADE2*, was der Doppel-Mutation entsprechen würde, identifiziert werden. Zur Überprüfung der PCR-Daten wurden alle Stämme zusätzlich einem Wachstumstest auf verschiedenen Selektivmedien unterzogen (Abbildung 15 B). Es konnte gezeigt werden, dass die bei der Herstellung der Mutanten verwendeten Auxotrophiemarker mit den entsprechenden Gen-Fragmenten aus Abbildung 15 A kosegregieren. So zeigen nur die *pmt1::URA5 PMT4* Stämme Wachstum auf SC-URA Platten, wohingegen die *PMT1 pmt4::ADE2* Stämme auf SC-ADE Medium wachsen können.

Die wildtypischen *PMT1 PMT4* Stämme konnten aufgrund der doppelten Adenin- und Uracil-Auxotrophie auf keinen Selektivplatten wachsen.

Wie die PCR Daten bereits zeigten, konnte kein Stamm identifiziert werden, der auf Selektivplatten ohne Adenin und Uracil wachsen konnte, mit Ausnahme der JEC21 Wildtyp

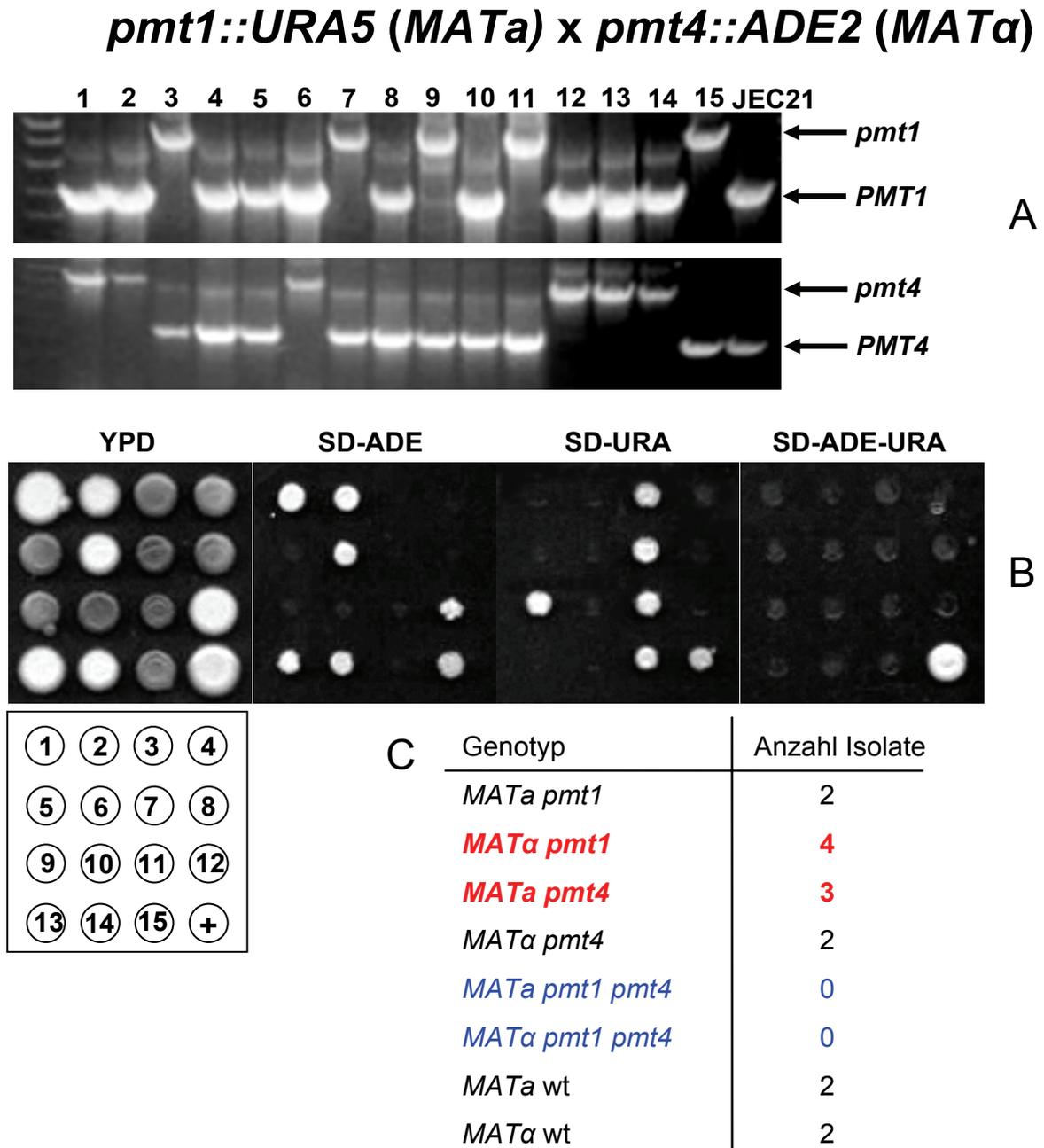


Abbildung 15: Eine *pmt1 pmt4* Doppeldeletion ist letal

Die Stämme SW4 (*MATa pmt1::URA5 ade2-27*) und SW19 (*MATα pmt4::ADE2 ura5*) wurden zur Überprüfung, ob eine synthetischen Letalität vorliegt, gekreuzt. Die Sporen wurden isoliert und über PCR auf deren Genotyp getestet. In A ist das Ergebnis der PCR dargestellt und zeigt 0,7 %ige Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele auf denen die PCRs mit den Oligonukleotiden C-1 und C-2 für *PMT1* und C-5 und C-6 für *PMT4* geladen sind. Die Spuren 1-15 sind jeweils Klone, die getestet wurden. JEC21 ist die Kontrolle für die Größe der *PMT* Gene im Wildtyp. Das PCR Produkt der Disruptionsmutante *pmt1::URA5* bzw. *pmt4::ADE2* ist jeweils größer. In B ist ein Tropfstest der Klone 1-15 auf YPD-, SD-ADE-, SD-URA- und SD-ADE-URA-Agarplatten gezeigt. C zeigt die Auswertung der 15 Klone, deren Genotyp bzgl. des *PMT*-Gens und des Paarungstyps untersucht wurde.

Kontrolle. Um nochmals zu überprüfen, ob es sich bei den isolierten Stämmen, insbesondere bei den Stämmen mit parentalem Genotyp, tatsächlich um rekombinante Nachkommen handelt, wurde der Paarungstyp aller Stämme durch Kreuzung mit den Wildtyp Stämmen JEC20 (*MAT α*) bzw. JEC21 (*MAT α*) bestimmt. In Abbildung 15 C sind die Ergebnisse der Paarungstypbestimmung inklusive der genotypischen Analyse nochmals kurz tabellarisch dargestellt. Von den 15 Sporen entsprachen 7 den eingesetzten Stämmen. Es gab 4 Sporen, die den gleichen Genotyp wie SW4 und 3 Sporen, die den gleichen Genotyp wie SW19 besaßen (in rot markiert). Die verbleibenden 8 Sporen zeigten alle einen rekombinanten Genotyp, entweder bezüglich der *PMT*-Gene oder bezüglich des Paarungstyps. Jeweils 2 Sporen waren *pmt1* bzw. *pmt4*, wiesen jedoch einen anderen Paarungstyp im Vergleich zu den Parentalstämmen auf. 4 Sporen waren bzgl. der *PMT*-Gene wildtypisch, wobei jeweils 2 den Paarungstyp *MAT α* bzw. *MAT α* besaßen. *MAT α* *pmt1* *pmt4* Doppelmutanten (blau markiert) konnten, wie bereits oben gezeigt, nicht isoliert werden. Unter Berücksichtigung der geringen Anzahl an isolierten Sporen ergab sich für die Genotypen *PMT1* *PMT4*, *pmt1* *PMT4* und *PMT1* *PMT4* ein ungefähres Verhältnis von 1:1:1. Dieses Verhältnis, sowie die oben gezeigten genotypischen bzw. phänotypischen Analysen der Sporen, legte den Schluss nahe, dass die *pmt1* *pmt4*-Doppelmutante ähnlich der *pmt2*-Einzelmutante ebenfalls letal ist.

4.5. Phänotypische Charakterisierung der *pmt*-Mutanten

Um die *PMT*-Gen-Familie weiter zu charakterisieren wurde im Anschluss eine phänotypische Analyse der *pmt1*- bzw. *pmt4*-Mutanten durchgeführt. Hierbei sollte unter anderem überprüft werden, ob und welche Auswirkungen die Disruption der einzelnen *PMT*-Gene in Bezug auf Morphologie, Wachstum unter verschiedenen Bedingungen, Sensitivität gegen Antibiotika und andere Substanzen, sowie auf die spezifischen Virulenzfaktoren und Pathogenität von *C. neoformans* haben. Die aus dieser Analyse gewonnenen Daten sollten weitere Hinweise auf die Funktionen der verschiedenen *Pmt*-Proteine liefern. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Mutation eines Gens in den Serotypen A bzw. D zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen führen kann, was vermutlich auf die hohe genetische Verschiedenheit der einzelnen Serotypen zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen wenn möglich für beide Serotypen durchgeführt.

4.5.1. Temperaturabhängiges Wachstum der *pmt*-Mutanten

Wachstumsanalysen in anderen Organismen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass Mutationen in bestimmten Protein-*O*-Mannosyltransferasen oftmals zu temperaturabhängigen Wachstumsdefekten führen. So zeigen z. B. die homozygote *pmt1/pmt1*- bzw. die heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutante in *C. albicans* bereits eine verringerte Wachstumsrate unter Standard-Wachstumsbedingungen sowie einen starken Wachstumsdefekt bei erhöhter Wachstumstemperatur (Prill *et al.*, 2005). Ähnliche Wachstumsdefekte konnten auch für diverse *pmt*-Mutanten in der Hefe *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte zu Beginn der phänotypischen Charakterisierung das Wachstum der *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten von *C. neoformans* sowohl auf Standard-YPD-Agarplatten als auch in YPD-Flüssigkulturen, bei unterschiedlichen Temperaturen, untersucht werden.

In Abbildung 16 ist das Ergebnis einer Wachstumsanalyse der Disruptionsstämme *pmt1* und *pmt4* des Serotyps A, sowie der entsprechenden rekonstituierten Stämme im Vergleich zum Wildtyp H99 bei unterschiedlichen Temperaturen auf YPD-Agarplatten dargestellt. Während unter Standard-Wachstumsbedingungen (30 °C) kein Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen zu beobachten war, zeigten die Disruptionsstämme bei 37 °C einen leichten Wachstumsdefekt. Im Gegensatz zum Wildtyp H99 und den rekonstituierten Stämmen konnten sowohl die *pmt1*-, als auch die *pmt4*-Mutante, nach einer weiteren Erhöhung der Wachstumstemperatur auf 39 °C nicht mehr wachsen.

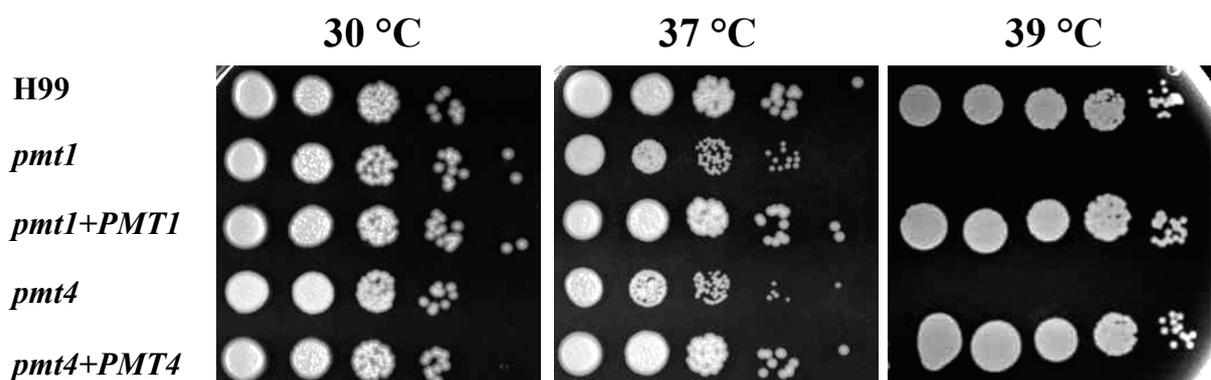


Abbildung 16: Temperaturabhängiges Wachstum der *pmt*-Mutanten des Serotyps A

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW15 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*pmt4::URA5 PMT1-Neo^R*) wurden auf 10^3 bis 10^8 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, 37 °C und 39 °C für zwei bis drei Tage.

Analog zum Serotyp A wurde der soeben beschriebene Wachstumstest auch für die entsprechenden Stämme des Serotyps D durchgeführt (Abbildung 17). Dabei konnten jedoch weder bei 30 °C noch bei 37 °C Unterschiede im Wachstum der *pmt1*- und *pmt4*-Disruptionsstämme, sowie deren rekonstituierten Stämmen im Vergleich zum Wildtyp JEC21

festgestellt werden. Bei 39 °C zeigte keiner der untersuchten Stämme Wachstum. Dieses Ergebnis kam nicht unerwartet, da vom Serotyp D bekannt war, dass die meisten Serotyp D-Stämme im Gegensatz zum Serotyp A bei 39 °C nicht lebensfähig sind.

Eine Wiederholung der oben genannten Experimente auf SD-Minimalmedium lieferte für alle getesteten Stämme das identische Ergebnis im Vergleich zum Wachstum auf YPD-Vollmedium (Daten nicht gezeigt).

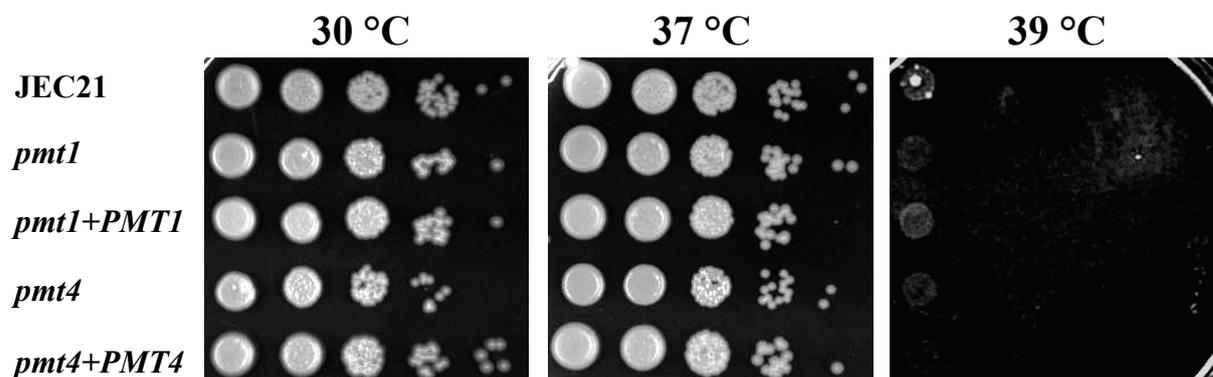


Abbildung 17: Temperaturabhängiges Wachstum der *pmt*-Mutanten des Serotyps D

Zellen einer Übernachtskultur der Stämme JEC21 (Wildtyp), SW6 (*pmt1::URA5*), SW12 (*pmt4::URA5*), SW17 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW18 (*pmt4::URA5 PMT1-Neo^R*) wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l auf YPD-Platten getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, 37 °C und 39 °C für zwei bis drei Tage.

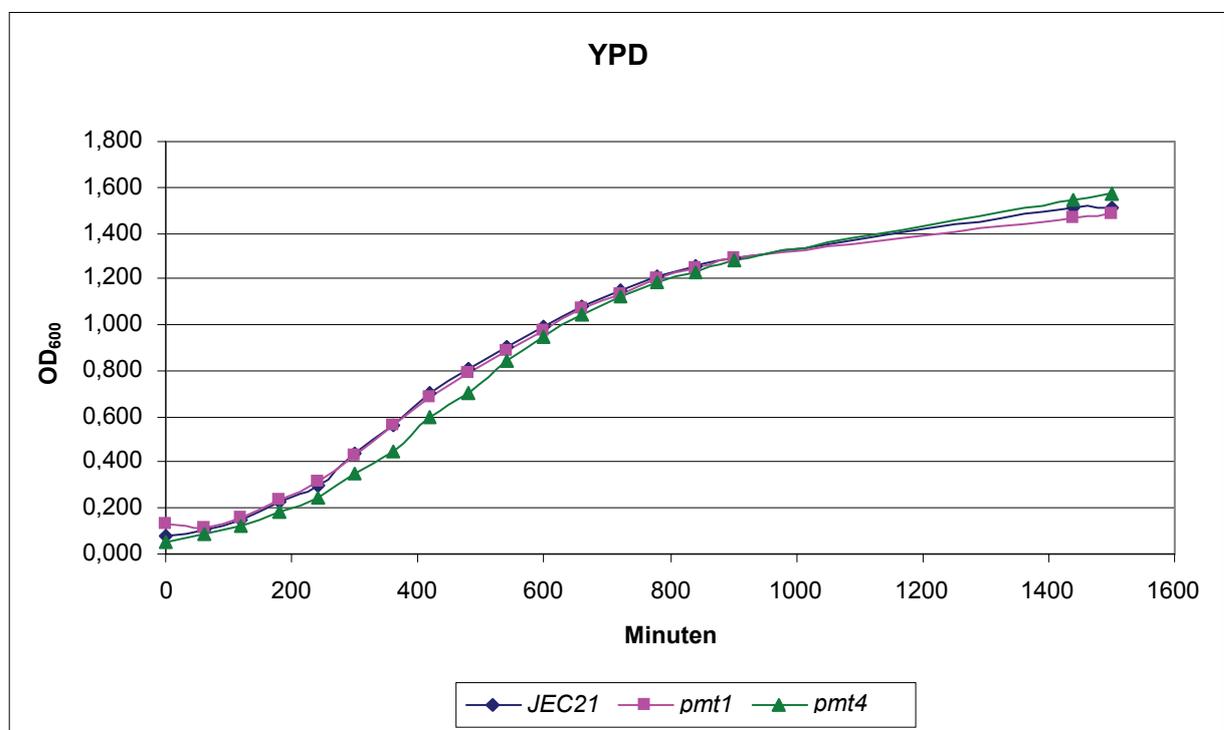


Abbildung 18: Wachstumskurve der *pmt*-Mutanten des Serotyps D

Die Zelldichte wurde photometrisch über einen Zeitraum von 1500 min ermittelt. Es wurden folgende Generationszeiten in YPD-Medium bei 30 °C ermittelt: Wildtyp (JEC21): 200 min; *pmt1* (SW6): 210 min und *pmt4* (SW12): 200 min.

Um festzustellen, ob es einen Unterschied zwischen dem Wachstum auf YPD-Agarplatten und in YPD-Flüssigmedium gibt, wurde exemplarisch für den Serotyp D getestet, ob die *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp JEC21 einen Unterschied im Wachstums bei 30 °C zeigen. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Wachstumskurven der drei untersuchten Stämme über die gesamte Dauer des Experiments nahezu identisch verlaufen. Der Wildtyp JEC21, die *pmt1*-Mutante, und die *pmt4*-Mutante wiesen alle eine Generationszeit von ca. 200 min auf.

4.5.2. Morphologie der *pmt*-Mutanten

Eventuell bedingt durch die zum Teil ausgeprägten Zellwanddefekte neigen *pmt*-Mutanten dazu, Zellaggregate zu bilden. So zeigen bei *C. albicans* *pmt1*-Mutanten eine starke Tendenz zur Aggregation und *pmt4*-Mutanten aggregieren zumindest leicht. Stämme mit Mutationen im *PMT2*-, *PMT5*- oder *PMT6*-Gen aggregieren dagegen nicht (Prill *et al.*, 2005; Timpel *et al.*, 1998). Bei *S. pombe* konnten ebenfalls Zellaggregate bei *pmt*-Mutanten nachgewiesen werden, die vermutlich auf Zellteilungsdefekte zurückzuführen sind (Willer *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob Mutationen in den *PMT*-Genen von *C. neoformans* ebenfalls zu Zellteilungsdefekten und/oder zur Aggregat-Bildung führen wurde eine lichtmikroskopische Analyse der entsprechenden Mutanten durchgeführt. Hierzu wurden die Disruptionsstämme des Serotyps A als auch des Serotyps D in Flüssigmedium unter Standardbedingungen angezogen, und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 mikroskopiert. Die Zellmorphologie der Mutanten wurde mit der Zellmorphologie der entsprechenden Wildtyp-Stämme verglichen. In Abbildung 19 sind lichtmikroskopische DIC (Differential-Interferenzkontrast)-Aufnahmen der Wildtyp-Stämme H99 und JEC21, sowie der *pmt1*- und *pmt4*-Disruptionsstämme des jeweiligen Serotyps dargestellt. Man kann erkennen, dass die *pmt1*-Zellen beider Serotypen im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen stark vergrößert sind und die Zellmorphologie zum Teil stark verändert ist. Die Zellen sind oftmals nicht mehr, wie für Hefen typisch, rund bis oval, sondern es finden sich häufig Zellen, die eine abnormale Zellform zeigen. Neben der abnormalen Zellform und der extremen Größe der Zellen zeichnen sich die *pmt1*-Mutanten zusätzlich scheinbar durch sehr große Vakuolen aus. Im Gegensatz zu den *C. albicans* *pmt1*-Mutanten sind jedoch bei *C. neoformans* nahezu keine Zellaggregate von *pmt1*-Zellen zu finden.

Im Gegensatz zu den *pmt1*-Mutanten zeigen die *pmt4*-Stämme von *C. neoformans* eine sehr starke Zellaggregation. Bei genauer Betrachtung der Aggregate lässt sich beobachten, dass die Aggregate dadurch zu entstehen scheinen, dass sich die Tochterzellen nach der Zellteilung

nicht richtig von der Mutterzelle trennen können (Abbildung 19). Ein ähnliches Verhalten wurde auch für *S. pombe* beschrieben (Willer *et al.*, 2005). Die *pmt4*-Zellen sind dabei im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen ebenfalls leicht vergrößert, erreichen aber bei weitem nicht die Größe der *pmt1*-Zellen. Aberrante Zellmorphologien wie für die *pmt1*-Mutanten konnten

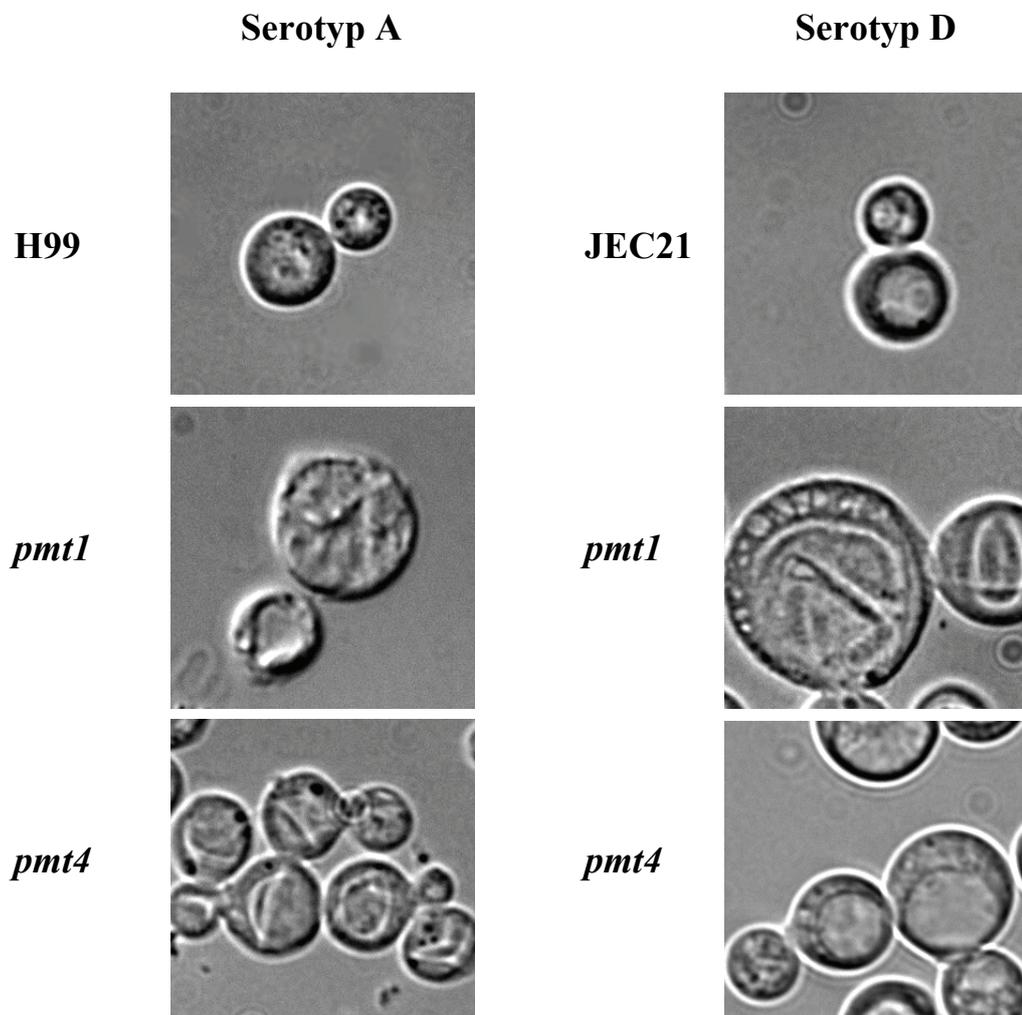


Abbildung 19: Morphologie der *pmt*-Disruptionsstämme

Die Stämme H99 (Wildtyp), JEC21 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*) (Serotyp A), und SW6 (*pmt1::URA5*) und SW12 (*pmt4::URA5*) (Serotyp D) wurden in YPD-Medium bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 1 angezogen und mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop verbunden mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

für die *pmt4*-Mutanten nicht oder nur selten beobachtet werden.

Wie bereits erwähnt ist die Aggregation der *pmt4*-Zellen eventuell auf Defekte während der Zellteilung zurückzuführen. Um zu untersuchen, zu welchem Grad die Zellteilung betroffen ist, wurde versucht, die Zellaggregate durch starkes Schütteln bzw. Ultraschallbehandlung aufzulösen. Dazu wurden die *pmt4*-Zellen zunächst für 24 Stunden bei 30 °C in SD-Minimalmedium angezogen, da unter diesen Bedingungen die stärkste Aggregatbildung zu beobachten ist. Anschließend wurde versucht die Zellaggregate entweder durch starkes

„Vortexen“ oder durch eine Behandlung im Ultraschall-Wasserbad aufzulösen. In Abbildung 20 erkennt man, dass durch 1-minütiges starkes Schütteln die Zellaggregate nicht aufgelöst werden können. Längeres Schütteln hat keinen Einfluss auf die Zellaggregate, führt aber dazu, dass die Anzahl lysierter bzw. aufgeplatzter Zellen mit der Dauer des Schüttelns zunimmt (Daten nicht gezeigt). In vergleichbarer Weise führt auch eine Behandlung der Zellen mit Ultraschall zu keiner Auflösung der Zellaggregate aber auch hier mit Zunahme der Beschallungsdauer zu einem Anstieg an aufgeplatzten Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die Zellteilung in diesen Zellaggregaten nicht vollständig abgeschlossen ist, was beim mechanischen Trennen der Einzelzellen zur Lyse bzw. Platzen der Zellen führt.

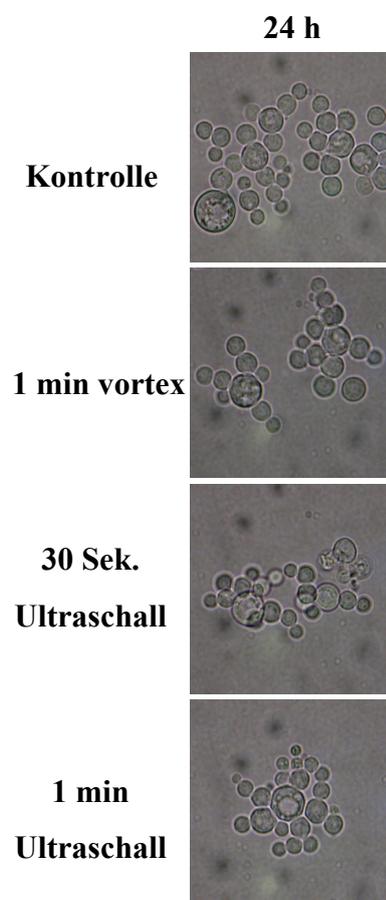


Abbildung 20: Ultraschall

Der Stamm SW6 (*pmt4::URA5*) wurde in YPD-Medium bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 1 angezogen, anschließend entweder direkt oder nach starkem schütteln, bzw. Ultraschallbehandlung mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop verbunden mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

beiden Zellen. Im Gegensatz dazu ist in *pmt4*-Zellen gerade der Bereich dieser Verbindungsstelle sehr stark angefärbt und eine klare Trennung von Mutter- und Tochterzelle

Um weiter zu bestätigen, dass sich Mutter- und Tochterzellen in den *pmt4*-Mutanten nicht komplett trennen, wurden Zellen der verschiedenen Mutanten und zum Vergleich Wildtyp-Zellen mit Calcofluor White, einem fluoreszierenden Farbstoff der spezifisch an Zellwandchitin bindet, angefärbt und mikroskopiert. Dieser Versuch wurde für beide Serotypen durchgeführt und lieferte übereinstimmende Ergebnisse. Bei den *pmt1*-Mutanten konnten im Vergleich zu den Wildtyp Zellen keine besonderen Auffälligkeiten beobachtet werden, obwohl die *pmt1*-Zellen eine etwas stärkere Verfärbung der Zellperipherie zeigen, was eventuell auf eine veränderte Zellwand-Zusammensetzung hindeutet (Abbildung 21). Insbesondere der Bereich zwischen den Mutter- bzw. Tochterzellen zeigt sowohl im Wildtyp als auch in den *pmt1*-Mutanten eine klare Trennung der

ist nicht zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die *pmt4*-Mutanten eventuell einen Defekt in der Zytokinese aufweisen.

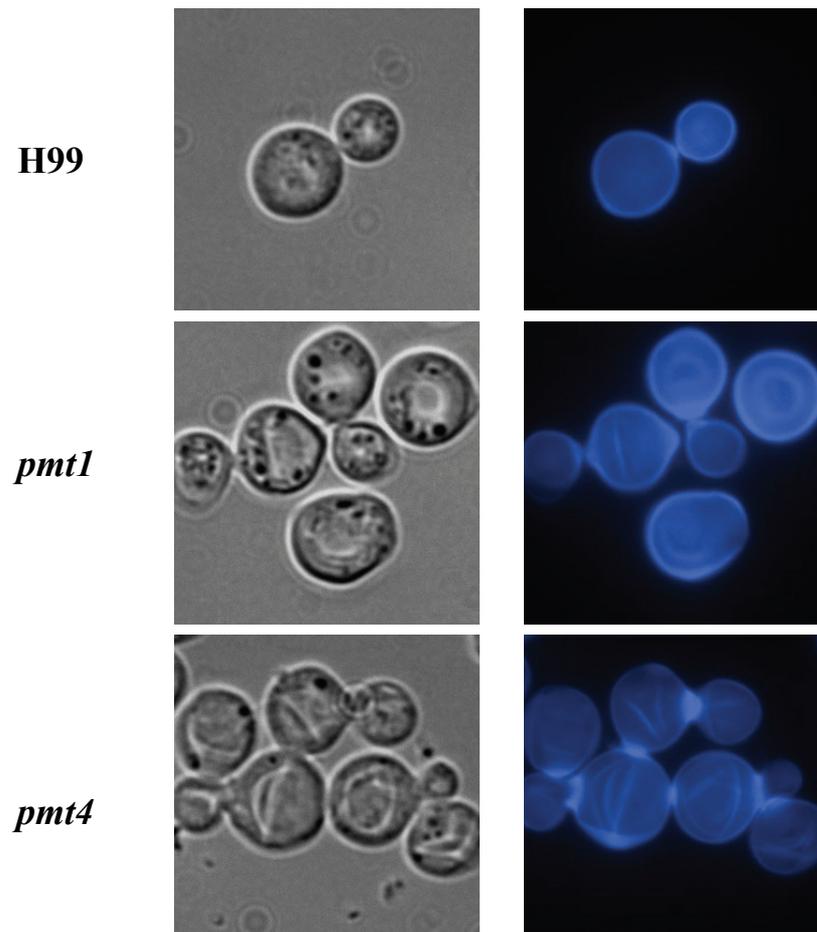


Abbildung 21: Calcofluor White-Färbung des Wildtyps H99 und der *pmt*-Mutanten

Die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*) und SW14 (*pmt4::URA5*) wurden in YPD-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD600) von 1 angezogen, wie in Kapitel 3.5 beschrieben mit dem Farbstoff Calcofluor White behandelt und mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Plus Fluoreszenz Mikroskop mit Hilfe einer AxioCam MRM Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

Wie die lichtmikroskopischen DIC Aufnahmen bereits andeuteten wiesen die *pmt4*-, aber insbesondere die *pmt1*-Mutanten, eventuell eine stark vergrößerte Vakuole im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen auf. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen wurden im Folgenden Zellen von Serotyp A bzw. D Wildtyp-Stämmen bzw. der entsprechenden Mutante mit dem Farbstoff FM4-64, mit dem die Vakuolenmembranen von lebenden Zellen angefärbt werden können, gefärbt und mikroskopiert (Abbildung 22). In Wildtyp-Zellen, hier H99, ist das Zytoplasma diffus angefärbt, was darauf schließen lässt, dass es in diesen Zellen nur sehr kleine Vakuolen gibt. Bei den stark vergrößerten *pmt1*-Zellen war bereits auf dem DIC Bild zu erkennen, dass die Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, eine sehr große Vakuole aufweisen (Abbildung 19). Im Fluoreszenzbild kann man erkennen, dass in diesen Zellen eine größere Anzahl von Vakuolen im Zytoplasma vorliegt, die zum Teil auch sehr stark vergrößert sind.

Die *pmt4*-Mutanten zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wobei dieser aber zumeist nicht so stark ausgeprägt war im Vergleich zu den *pmt1*-Stämmen. Aber auch in diesen Stämmen fanden sich Zellen mit zum Teil sehr stark vergrößerten Vakuolen (Abbildung 22). Ein Großteil der membranösen Organellen in der eukaryotischen Zelle, ER, Golgi oder Lysosomen/Vakuolen, sind in der einen oder anderen Form an dem Transport und der Sortierung von Glykoproteinen beteiligt. Hierzu ist unter Anderem eine Reihe von ebenfalls glykosylierten Membranproteinen notwendig, die die Identität der einzelnen beteiligten vesikulären Kompartimente bestimmen. Es ist daher nicht völlig überraschend, dass Defekte in der Protein-Glykosylierung zu Veränderungen bezüglich dieser vesikulären Komponenten führen.

Die Vakuolenfärbung hat gezeigt, dass in den *pmt*-Mutanten ein Großteil des Zellinneren vermutlich von Vakuolen oder anderen vesikulären Strukturen eingenommen wird. Es war daher interessant herauszufinden, ob dies einen Einfluss auf die Lage des Nukleus in den Zellen hat. Hierzu wurden die Zellen mit dem interkalierenden DNA Farbstoff DAPI gefärbt. Man kann erkennen, dass in den Wildtyp-Zellen der Nukleus als runde Organelle meist mittig innerhalb der Zelle zu

H99

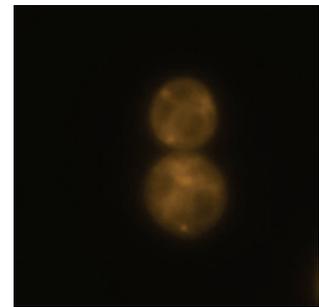
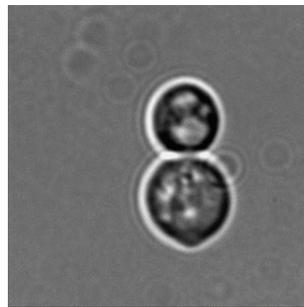
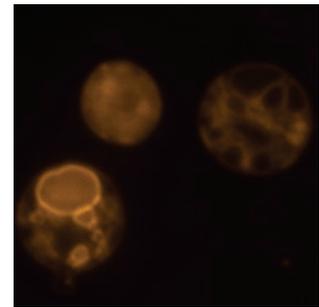
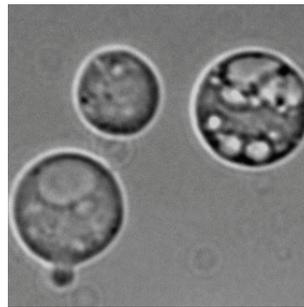
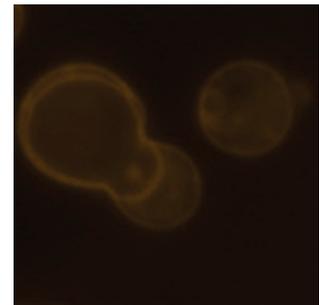
*pmt1**pmt4*

Abbildung 22: Vakuolenfärbung mit FM4-64 des Wildtyps H99 und der *pmt*-Mutanten

Die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*) und SW14 (*pmt4::URA5*) wurden in YPD-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 1 angezogen, wie in Kapitel 3.5 mit dem Vakuolenfarbstoff FM4-64 beschrieben behandelt und mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Plus Fluoreszenz Mikroskop mit Hilfe einer AxioCam MRM Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

sehen ist. In den *pmt*-Mutanten wurde der Zellkern in Zellen mit stark vergrößerten Vakuolen jedoch zumeist durch die Vakuole an die Zellwand gepresst (Abbildung 23). Ob und welche

Auswirkungen diese veränderte Lokalisation und Morphologie des Zellkerns auf die Mitose bzw. den Zellzyklus hat, ist völlig unklar. Da in vielen Organismen der Zellzyklus aber unter Anderem durch das Verhältnis von Zytoplasma- zu Vakuolen-Volumen reguliert wird, scheint eine Beeinflussung des Zellzyklus in den *pmt*-Mutanten nur wahrscheinlich.

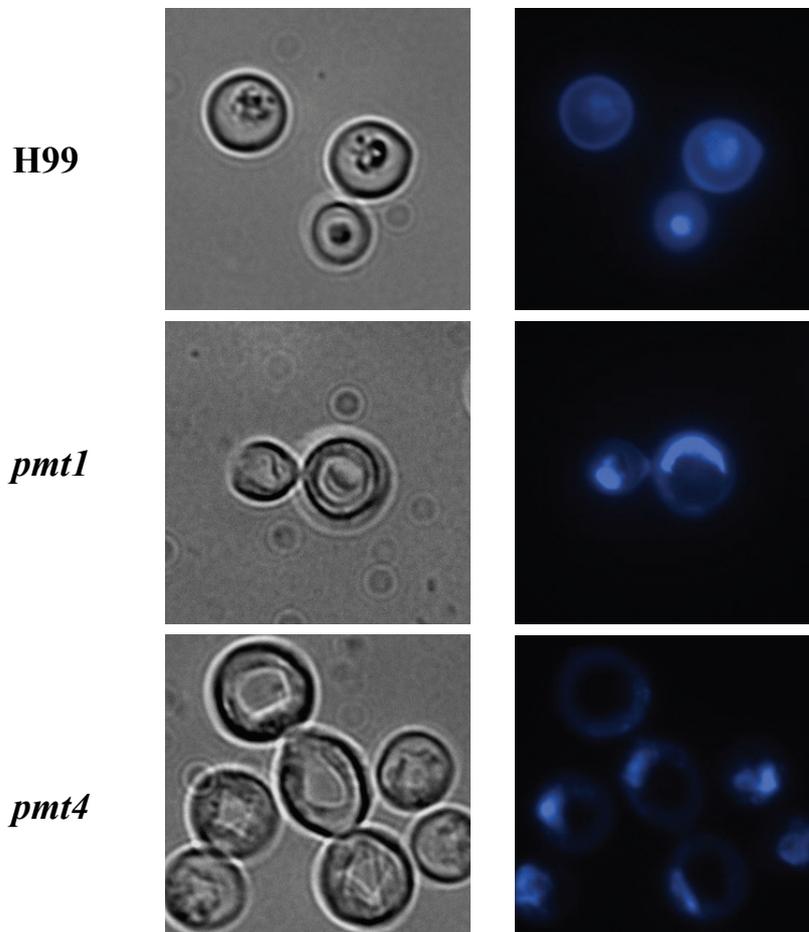


Abbildung 23: DAPI-Färbung des Wildtyps H99 und der *pmt*-Mutanten

Die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*) und SW14 (*pmt4::URA5*) wurden in YPD-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 1 angezogen, wie in Kapitel 3.5 beschrieben mit dem Farbstoff DAPI behandelt und mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Plus Fluoreszenz Mikroskop mit Hilfe einer AxioCam MRM Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

4.5.3. Untersuchungen zur Sensitivität der *pmt*-Mutanten

Anhand von Sensitivitäten gegenüber bestimmten Substanzen lassen sich zum Teil relativ konkrete Aussagen über Art und Weise der durch eine Mutation hervorgerufenen Schädigungen machen. Aus *C. albicans* ist zum Beispiel bekannt, dass mit der Ausnahme der *pmt5*-Mutante alle *pmt*-Mutanten in der einen oder anderen Weise sensitiv gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden und Zellwand destabilisierenden Agenzien sind (Prill *et al.*, 2005), was z. B. durch entsprechende Defekte in der Zellwand erklärt werden kann. Aus diesem Grund sollten analog zu *C. albicans* die *pmt*-Mutanten aus *C. neoformans* bezüglich.

ihrer Sensitivität gegenüber diesen Agenzien untersucht werden. Dabei wurden, soweit nicht besonders erwähnt, für den Serotyp A die Stämme SW13 (*MAT α pmt1::URA5*), SW14 (*MAT α pmt4::URA5*), SW15 (*MAT α pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) und für den Serotyp D die Stämme SW6 (*MAT α pmt1::URA5*), SW12 (*MAT α pmt4::URA5*), SW17 (*MAT α pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW18 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*), sowie die entsprechenden Wildtyp Stämme H99 (Serotyp A) und JEC21 (Serotyp D) verwendet.

4.5.3.1. **Sensitivität gegen Aminoglykoside und Zellwand-destabilisierende Substanzen**

Defekte in der Protein-Glykosylierung führen oftmals zu schweren Schäden in der Zellwand, was sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber bestimmten Antibiotika und anderen Zellwand-destabilisierenden Chemikalien bemerkbar macht. Zuerst wurde die Sensitivität der *C. neoformans pmt*-Mutanten gegen Aminoglykoside getestet, die im Inneren der Zelle an den Ribosomen wirken und die Proteinbiosynthese negativ beeinflussen. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Substanzen könnte z. B. dadurch erklärt werden, dass Defekte in der Zellwand die Diffusion der Antibiotika in die Zelle erleichtert. Hier wurden die Aminoglykosid-Antibiotika Hygromycin B (20 μ g/ml) und Geneticin 418 (G418) (1 mg/ml), sowie Cycloheximid (20 μ g/ml) durch serielle Standard-Tropftests getestet. Im Gegensatz zu *C. albicans* konnte allerdings bei *C. neoformans* für keines der getesteten Antibiotika eine veränderte Sensitivität der Disruptionsstämme im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden analog die *pmt*-Mutanten bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber den Zellwand-destabilisierenden Substanzen Kongo Rot (500 μ g/ml), Calcofluor White (100 μ g/ml), und SDS (0,01 % - 0,02 %), sowie Koffein (500 μ g/ml) getestet. Kongo Rot und Calcofluor White sind Fluoreszenzfarbstoffe, die mit bestimmten Komponenten der Zellwand (Glukan- bzw. Chitin-Fibrillen) komplexieren und dadurch den Aufbau der Zellwand negativ beeinflussen. Ähnlich wie bei den oben erwähnten Antibiotika konnte allerdings auch für diese beiden Farbstoffe unter den gewählten Bedingungen keine veränderte Sensitivität der *pmt*-Mutanten aus *C. neoformans* festgestellt werden, wie sie wiederum bei *C. albicans* gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Proteinkinase C (PKC) ist die zentrale Komponente des Signaltransduktionsweges, welcher die Expression von Zellwandkomponenten insbesondere unter Stressbedingungen

kontrolliert. In *S. cerevisiae* sind viele Mutanten des PKC-Weges sensitiv gegen niedrige Konzentrationen von SDS, sowie gegen den Diesterase-Inhibitor Koffein (Costigan *et al.*, 1992). Wie bei den zuvor getesteten Substanzen konnte beim Wachstum auf Koffein-haltigen Medien kein Unterschiede beim Wachstum der *pmt*-Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auf SDS-haltigen Medien zeigten jedoch sowohl die *pmt1*- als auch die *pmt4*-Mutante einen Wachstumsdefekt, wobei sich die beiden getesteten Serotypen nur geringfügig voneinander unterschieden. Während die *pmt1*-Mutanten in einem Tropftest auf 0,01 % SDS minimal langsamer wuchsen als die Wildtyp- bzw. die rekonstituierten Stämme (Abbildung 24), zeigten die *pmt4*-Mutanten, insbesondere beim Serotyp A, einen deutlich stärkeren Wachstumsdefekt. Mit zunehmender SDS-Konzentration, hier für 0,02 % SDS gezeigt, verstärkten sich die Unterschiede der *pmt*-Mutanten untereinander sowie gegenüber dem Wildtyp und den rekonstituierten Stämmen deutlich. Insbesondere die *pmt4*-Mutanten konnten bei einer SDS-Konzentration von >0,02 % kaum noch wachsen. Auffallend ist, dass im Gegensatz zum Serotyp A das Wachstum der Serotyp D Stämme auf 0,02 % SDS generell stark eingeschränkt ist, die *pmt*-Mutanten aber dennoch einen merklichen Wachstumsdefekt zeigen (Abbildung 24).

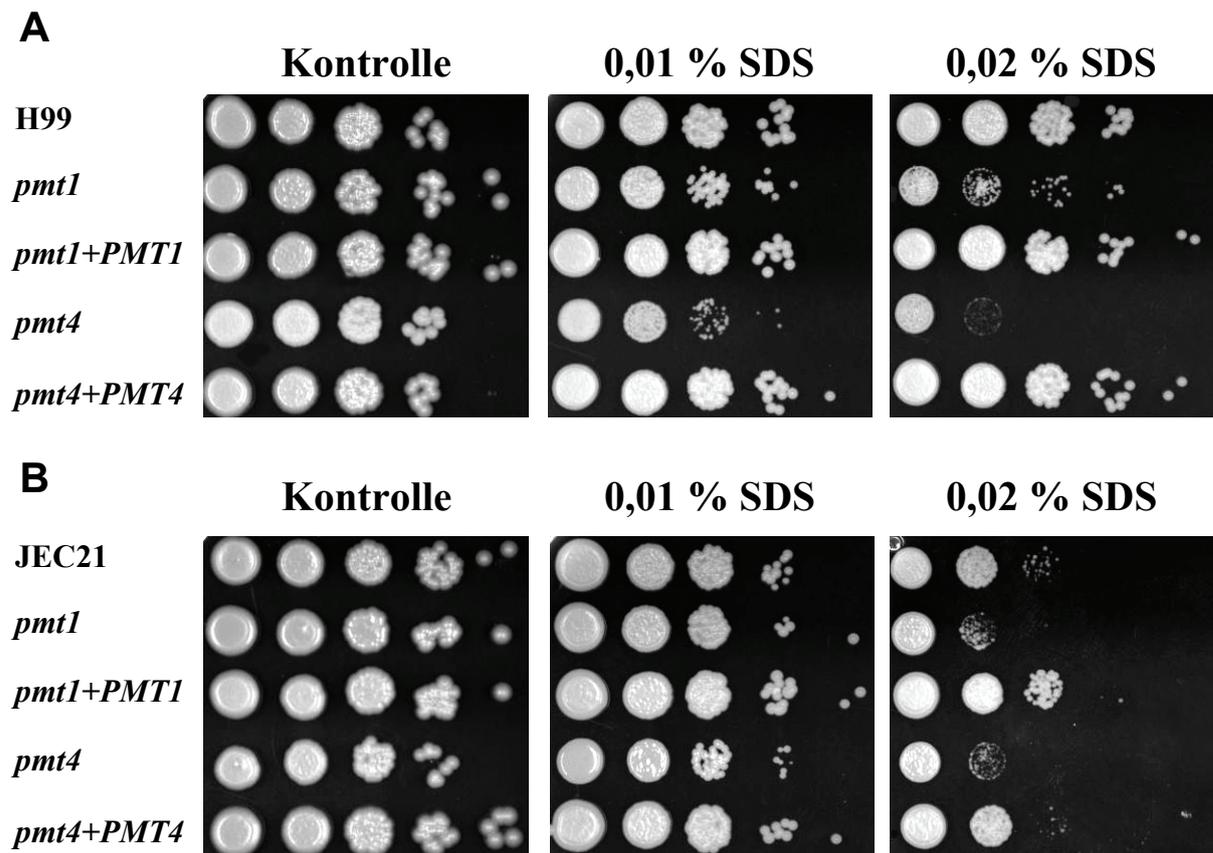


Abbildung 24: Wachstum der *pmt*-Mutante auf SDS-haltigen Agarplatten

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW15 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) für den Serotyp A (A) und die Stämme JEC21 (Wildtyp), SW6 (*pmt1::URA5*), SW12 (*pmt4::URA5*), SW17 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW18 (*pmt4::URA5 PMT1-Neo^R*) für den Serotyp D (B) wurden auf 10^5 bis 10 Zellen verdünnt und in einem Volumen von $5 \mu\text{l}$ auf YPD-Platten mit 0,01 % und 0,02 % SDS getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für zwei bis drei Tage.

Das Ergebnis dieses Tropftests konnte auch in Flüssigmedium bestätigt werden. Dazu wurde jeweils 11 YPD-Flüssigmedium mit 0,01 % SDS versetzt, mit Übernachtskulturen der Stämme JEC21, SW6 (*MAT α pmt1::URA5*) und SW12 (*MAT α pmt4::URA5*) auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ angeimpft, und anschließend eine Wachstumskurve bei 30°C und 120 Upm aufgenommen. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die *pmt4*-Mutante eine deutlich längere lag-Phase aufweist als der Wildtyp JEC21 bzw. die *pmt1*-Mutante. Letztere wächst innerhalb der ersten 6 Stunden ähnlich dem Wildtyp, anschließend knickt die Wachstumskurve ein. Ähnlich dem Tropftest fällt auf, dass der Serotyp D Wildtyp Stamm JEC21 unter SDS Bedingungen im Vergleich zu YPD Vollmedium (Abbildung 18) bereits deutlich schlechter wächst, aber offensichtlich diese Stressbedingungen immer noch besser kompensieren kann als die entsprechenden *pmt*-Mutanten.

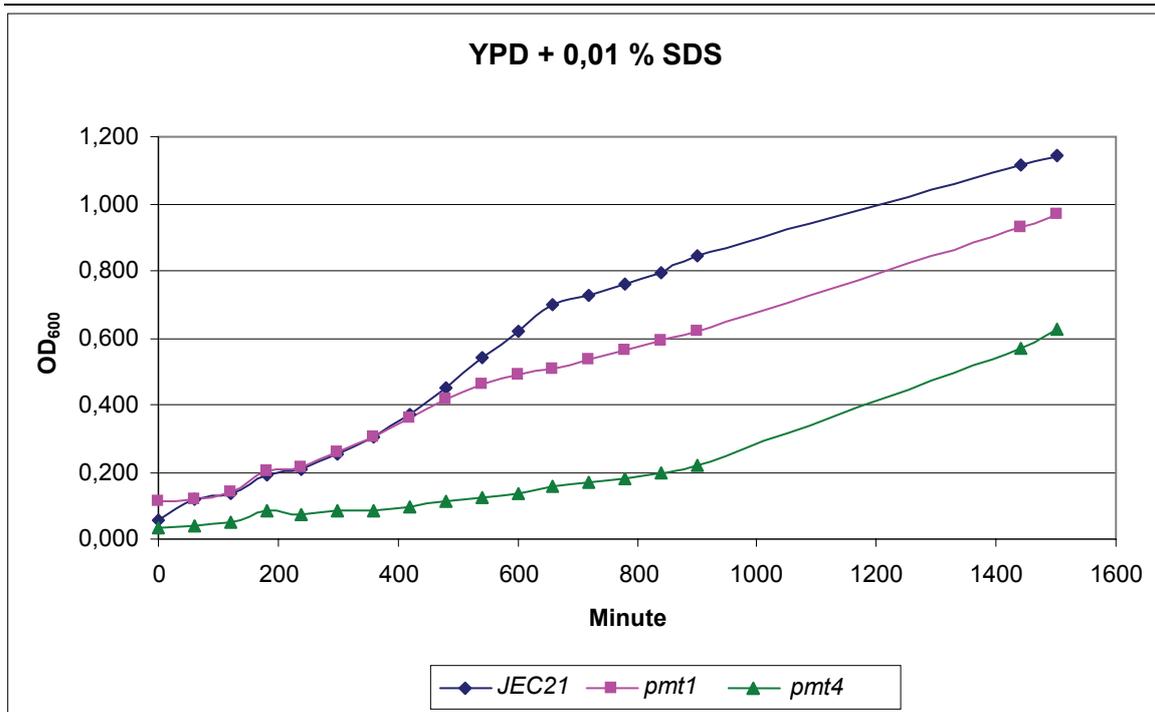


Abbildung 25: Wachstum der *pmt*-Mutanten in 0,01 % SDS-haltigem YPD-Flüssigmedium

Die Zelldichte wurde photometrisch über einen Zeitraum von 1500 min ermittelt. Die Zellen wurden in YPD-Medium mit 0,01 % SDS bei 30 °C und 120 Upm inkubiert.

4.5.3.2. Sensitivität gegen verschiedene Substanzen

Wie bereits mehrfach erwähnt führen Mutationen in den Protein-*O*-Mannosyltransferasen oftmals zu Defekten im Zellwandaufbau, was zumeist mit Wachstumsdefekten unter Zellwand-destabilisierenden Bedingungen einhergeht. In den bisher durchgeführten Wachstumstests konnte dieses zum Teil für das Wachstum auf SDS bestätigt werden. Die auftretenden Wachstumsdefekte lassen sich oftmals durch eine osmotische Stabilisierung der Zellen vermindern. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Substanzen getestet, die die Zellen osmotisch stabilisieren können oder aber osmotischen bzw. oxidativen Stress hervorrufen. Getestet wurden die osmotischen Stress hervorrufenden Salze Kaliumchlorid (KCl) und Natriumchlorid (NaCl), das zumeist als osmotischer Stabilisator eingesetzte Sorbitol, bzw. das oxidativen Stress hervorrufende Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

In Abbildung 26 sind zunächst die entsprechenden Tropftest des Serotyps A für die Salze KCl (0,5 M) und NaCl (0,7 M bzw. 1 M) dargestellt. Während die *pmt1*-Mutante nur bei einer NaCl Konzentration von 1 M einen sehr leichten Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp H99 zeigt, kann für die *pmt4*-Mutante auf beiden getesteten NaCl Konzentrationen nach 3-4 Tagen kein Wachstum festgestellt werden. Auf 0,5 M KCl zeigte die *pmt4*-Mutante zwar Wachstum, dieses ist aber ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtyp und dem rekonstituierten Stamm.

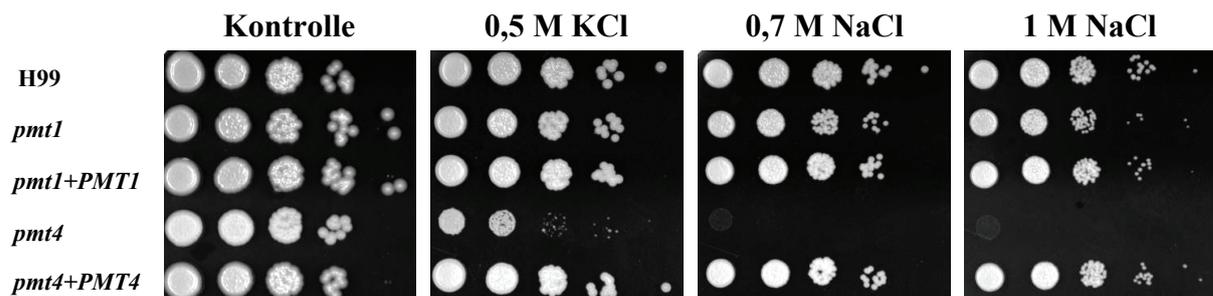


Abbildung 26: Wachstum der *pmt*-Mutanten des Serotyps A auf salzhaltigen Agarplatten

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW15 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l auf YPD-Platten mit 0,5 M KCl, 0,7 M NaCl und 1 M NaCl getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

Ähnlich wie für die erhöhte Wachstumstemperatur von 39 °C zeigen die Serotyp D-Wildtyp- und rekonstituierten Stämme auch unter sehr hohen Salzbedingungen (1 M NaCl) bereits einen drastischen Wachstumsdefekt. Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, ist bei den entsprechenden Stämmen kaum noch Wachstum bei 1 M NaCl zu beobachten. Sowohl die *pmt1*-Mutante als auch die *pmt4*-Mutante konnten unter diesen Bedingungen nicht mehr wachsen. Im Gegensatz zum Serotyp A schien die *pmt1*-Mutante bei 0,7 M NaCl einen ausgeprägten Wachstumsdefekt zu haben, wohingegen die *pmt4*-Mutante ähnlich Serotyp A unter dieser Bedingung gar nicht mehr wachsen kann. Im Gegensatz zum Serotyp A hat KCl auf die *pmt4*-Mutante von Serotyp D keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen.

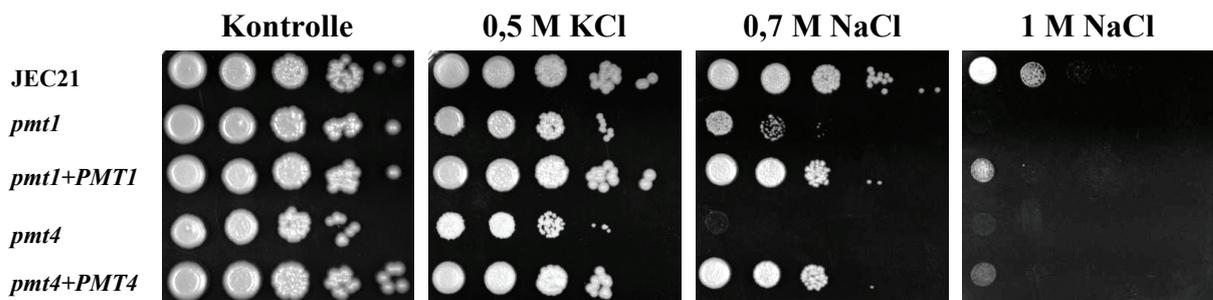


Abbildung 27: Wachstum der *pmt*-Mutanten des Serotyps D auf salzhaltigen Agarplatten

Zellen einer Übernachtskultur der Stämme JEC21 (Wildtyp), SW6 (*pmt1::URA5*), SW12 (*pmt4::URA5*), SW17 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW18 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) wurden auf 10^5 bis 10^6 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l auf YPD-Platten mit 0,5 M KCl, 0,7 M NaCl und 1 M NaCl getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

Wie schon bei der Zellwand-destabilisierenden Substanz SDS sollte das Ergebnis des Tropftests durch eine Wachstumskurve in Flüssigmedium überprüft werden. Dazu wurde jeweils 1 l YPD mit 1 M NaCl mit Übernachtskulturen der Stämme SW6 (*MAT α pmt1::URA5*), SW12 (*MAT α pmt4::URA5*) und dem Wildtyp JEC21 mit einer $OD_{600} \sim 0,1$ inokuliert und eine Wachstumskurve bei 30 °C und 120 Upm ermittelt. Überraschenderweise zeigt die Serotyp D *pmt1*-Mutante in dem Flüssigmedium ein ähnlich gutes Wachstum, wie der Wildtyp Stamm JEC21, wohingegen die *pmt4*-Mutante unter diesen Bedingungen nicht wachsen konnte (Abbildung 28). Das Wachstumsverhalten der Serotyp D *pmt*-Mutanten in

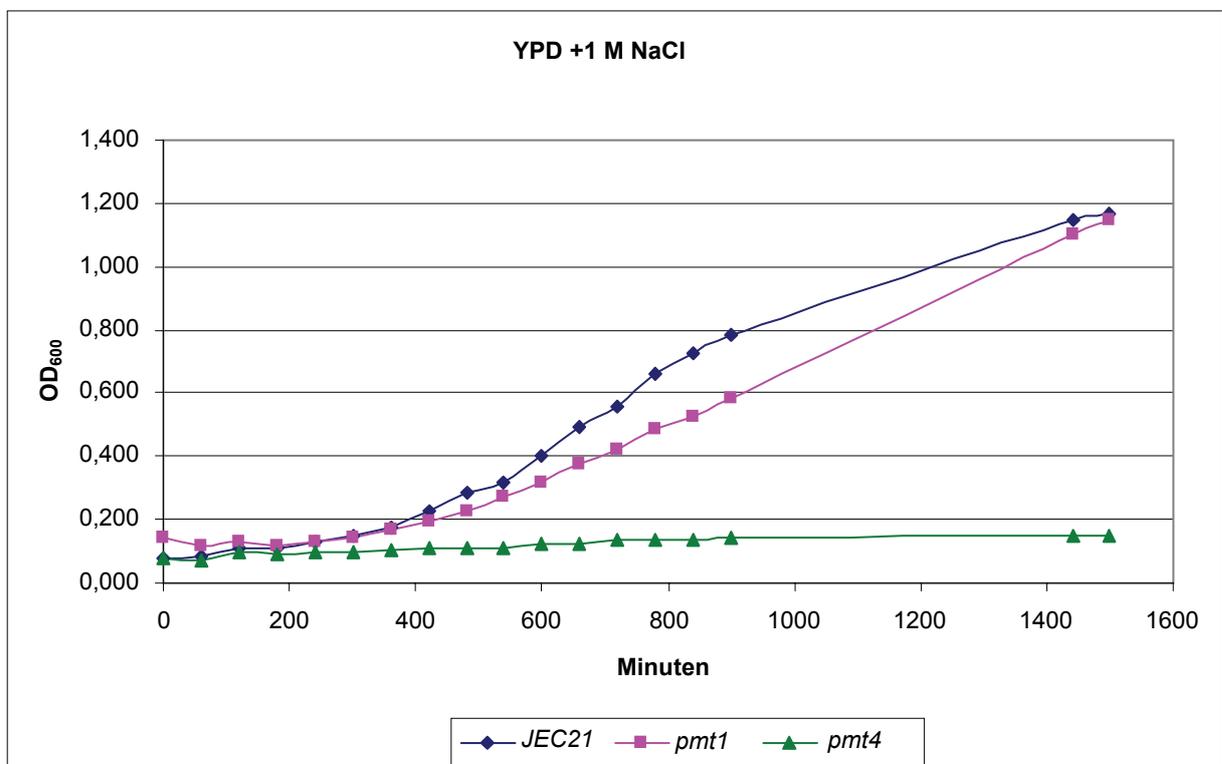


Abbildung 28: Wachstum der *pmt*-Mutanten in YPD-Flüssigmedium mit 1 M NaCl

Die Zelldichte wurde photometrisch über einen Zeitraum von 1500 min ermittelt. Die Zellen wurden in YPD-Medium mit 1 M NaCl bei 30 °C und 120 Upm inkubiert.

Flüssigmedium mit 1 M Salz entsprach erstaunlicherweise in etwa dem, was bei den Tropftests beim Serotyp A beobachtet werden konnte, und nicht den Ergebnissen des Tropftests für die Serotyp D Stämme.

Als nächstes wurden die *pmt*-Mutanten auf ihre Sensitivität gegenüber dem osmotischen Stabilisator Sorbitol überprüft und auf Wachstum bei hohen Sorbitolkonzentrationen getestet. Während der Transformation von *C. neoformans* durch Teilchenbeschuss werden die transformierten Zellen auf 1 M Sorbitol-haltigen Agarplatten stabilisiert. Diese Sorbitol-Konzentration hat auf das Wachstum von *C. neoformans* offensichtlich keinen Effekt. Daher wurden für diesen Test höhere Konzentrationen von 2 M und 2,5 M Sorbitol eingesetzt. Wie schon bei den Tests mit NaCl gefunden wurde, unterscheiden sich die Serotypen in der Sensitivität gegenüber hohen Sorbitol Konzentrationen zum Teil deutlich. Allerdings stimmen die Serotypen darin überein, dass bereits die Wildtyp und rekonstituierten Stämme bei 2,5 M Sorbitol deutlich reduziertes Wachstum aufweisen. Ansonsten zeigte beim Serotyp A auf 2 M Sorbitol nur die *pmt4*-Mutante einen starken Wachstumsdefekt, während die anderen

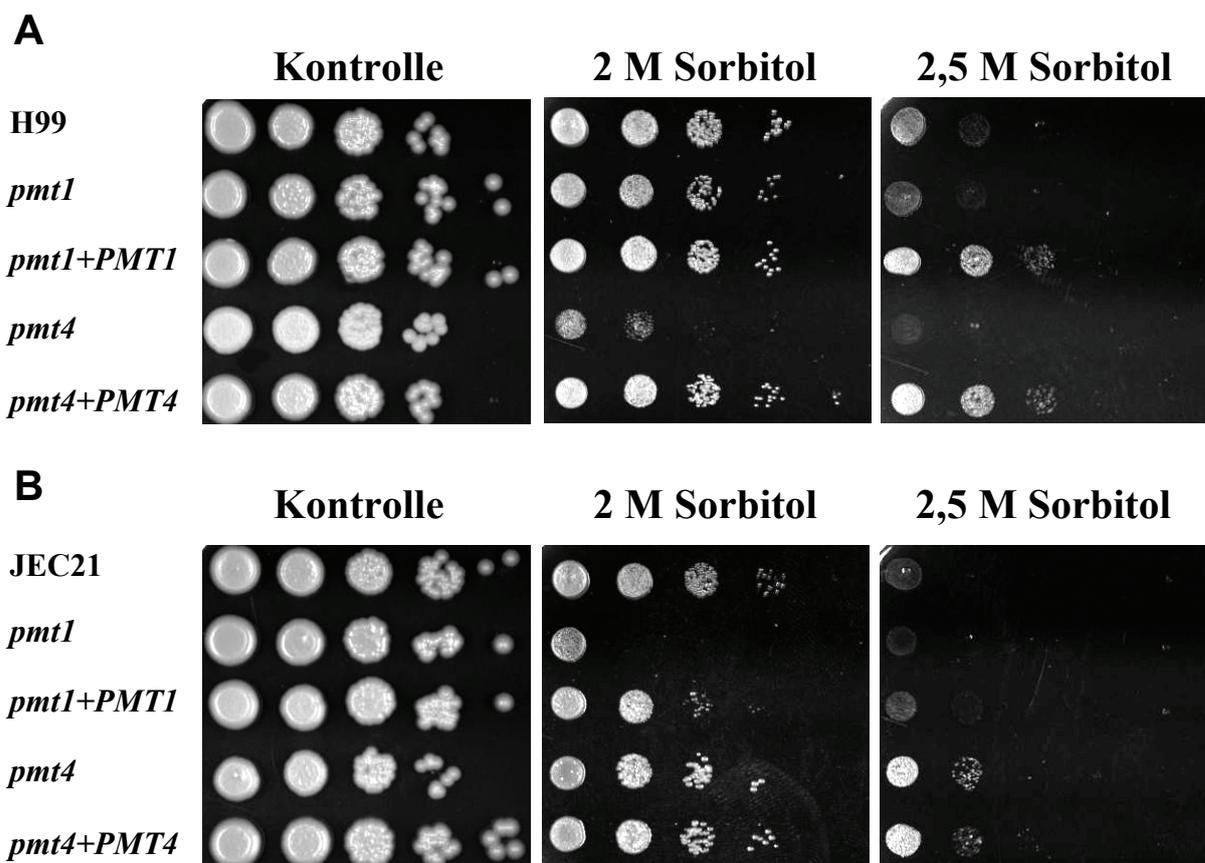


Abbildung 29: Wachstum der *pmt*-Mutanten beider Serotypen auf Agarplatten mit Sorbitol

Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW15 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) für den Serotyp A (A) und die Stämme JEC21 (Wildtyp), SW6 (*pmt1::URA5*), SW12 (*pmt4::URA5*), SW17 (*pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW18 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) für den Serotyp D (B) wurden auf 10^5 bis 10 Zellen verdünnt und in einem Volumen von 5 μ l auf YPD-Platten mit 2 M und 2,5 M Sorbitol getropft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage.

getesteten Stämme nahezu identisches Wachstum zeigten. Auf 2,5 M Sorbitol zeigte die *pmt1*-Mutante eine starke Sensitivität gegen Sorbitol, und die *pmt4*-Mutante konnte gar nicht mehr wachsen (Abbildung 29 A).

Beim Serotyp D ist das Ergebnis überraschenderweise drastisch abweichend von Serotyp A. Auf den Platten mit 2 M Sorbitol zeigte die *pmt1*-Mutante im Gegensatz zu Serotyp A einen starken Wachstumsdefekt, während die *pmt4*-Mutante normal wuchs. Dieses entspricht dem umgekehrten Ergebnis zu Serotyp A. Auf den Platten mit 2,5 M Sorbitol stellen sich die Ergebnis noch erstaunlicher dar, da nur die *pmt4*-Mutante aber auch der rekonstituierte *PMT4*-Stamm wachsen, obwohl letzterer die gleiche Sensitivität gegenüber 2,5 M Sorbitol haben sollte, wie der Wildtyp (Abbildung 29 D). Da aber alle Stämme auf 2,5 M Sorbitol nur sehr eingeschränkt wachsen, ist eine Interpretation dieser Daten nur sehr schwer möglich.

Zum Abschluss wurden die unterschiedlichen *pmt*-Mutanten auf ihr Verhalten bezüglich oxidativem Stress, hervorgerufen durch H₂O₂, untersucht. Es konnten allerdings keine Unterschiede im Wachstum zwischen *pmt*-Mutanten und Wildtyp und rekonstituierten Stämmen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.4. Analyse der Virulenzfaktoren

Wie bereits erwähnt wird die Virulenz von *C. neoformans* mit vielen besonderen Eigenschaften in Verbindung gebracht, wie z. B. der Fähigkeit bei 37 °C zu wachsen (Cruz *et al.*, 2000), eine Polysaccharidkapsel zu bilden (Doering, 2000), Melanin zu produzieren (Polacheck, 1991) sowie verschiedene lytische Enzyme in die Umgebung zu sekretieren (Chen *et al.*, 1997). Die Fähigkeit der *pmt*-Mutanten, bei 37 °C zu wachsen, wurde bereits überprüft, wobei keine signifikanten Wachstumsdefekte festgestellt werden konnten. Im Folgenden sollten die *pmt*-Mutanten auf mögliche Defekte in anderen wichtigen Virulenzfaktoren überprüft werden.

4.5.4.1. *Die Kapsel der pmt-Mutanten ist geringfügig dünner*

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. neoformans* ist die Polysaccharidkapsel, welche passiv die Hefezellen vor der Phagozytose durch aktivierte Immunzellen (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen) schützt (Kozel und Gotschlich, 1982; Kozel *et al.*, 1988) und das intrazelluläre Überleben durch Inhibierung der Verdauung in den Phagolysosomen ermöglicht (Goldman *et al.*, 2000).

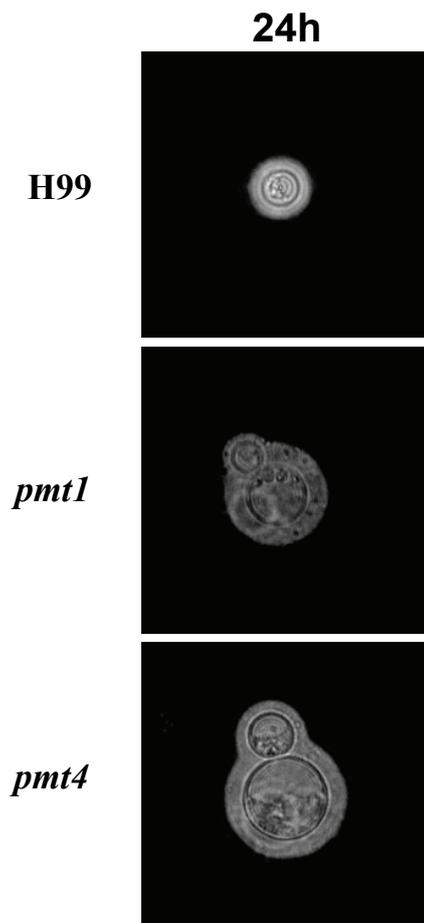


Abbildung 30: Kapselinduktion

Die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), und SW14 (*pmt4::URA5*) wurden in Eagle's Medium über Nacht wachsen gelassen und nach Zugabe von Tusche mikroskopiert. Die Fotos wurden mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop verbunden mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

man fest, dass der Wildtyp mit einem Quotienten von 1,80 verhältnismäßig die größte Kapsel bildet. Die *pmt1*-Mutante weist einen Quotienten von 1,74 auf und liegt damit noch ungefähr im Bereich des Wildtyps, wohingegen die *pmt4*-Mutante mit einem Quotienten von 1,43 die kleinste Kapsel im Vergleich zur Zellgröße produziert. Ähnliche Werte wurden auch für den Serotyp D ermittelt (Daten nicht gezeigt).

4.5.4.2. Extrazelluläre Enzyme sind in den *pmt*-Mutanten unverändert

Wie in Kapitel 1.4.4 bereits beschrieben konnten in *C. neoformans* einige sekretierte Enzyme (Proteasen, Esterasen und Lipasen) identifiziert werden, die mit der Virulenz des Organismus assoziiert werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass *C. neoformans*-Stämme mit einem Defekt im Enzym Urease eine geringere Virulenz zeigen als Wildtyp Stämme (Cox *et al.*, 2000). Ebenso konnte in *C. neoformans* eine extrazelluläre Phospholipaseaktivität identifiziert werden, die mit der Virulenz des Pathogens assoziiert wird (Cox *et al.*, 2001).

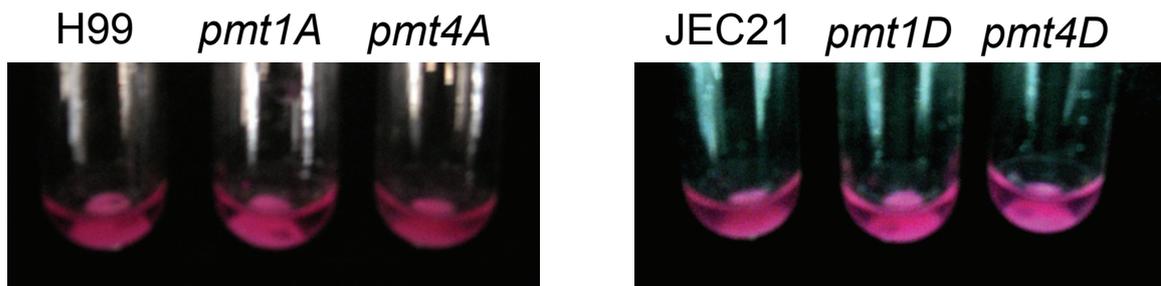


Abbildung 31: Urease Produktion

Für die Bestimmung, ob Urease von den *C. neoformans*-Stämmen H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1A*), SW14 (*pmt4A*), JEC21 (Wildtyp), SW6 (*pmt1D*) und SW12 (*pmt4D*) ins Medium sekretiert wird, wurden „BBL™ Taxo™ Differentiation Discs Urea“ der Firma BD verwendet. Wenige Zellen werden in 1 ml H₂O resuspendiert, die Discs direkt in die Suspension gegeben und für 4 h bei 30 °C inkubiert. Der Test beruht auf einer Rotfärbung des Mediums bei Anwesenheit von Urease.

Im Folgenden wurde getestet, ob die Disruption der *PMT*-Gene zu einer Reduktion der Urease- bzw. Phospholipase B-Aktivität führt. Die Bestimmung der Urease-Aktivität der *C. neoformans*-Stämme erfolgte mit Hilfe der „BBL™ Taxo™ Differentiation Discs Urea“ der Firma BD (siehe Kapitel 3.6). In Abbildung 31 sind die Urease-Tests der *pmt*-Mutanten der Serotypen A und D, sowie der entsprechenden Wildtypen dargestellt. Anhand der Rotfärbung der Kulturen kann man erkennen, dass der Test auf Urease-Aktivität für alle Stämme positiv verlaufen ist, die *pmt*-Mutanten somit keinen Urease-Defekt aufweisen.

Zur Überprüfung der extrazellulären Phospholipase B-Aktivität wurden die zu untersuchenden Stämme auf sogenannte „Egg Yolk Agar“-Platten getropft. Wird die Phospholipase B in das Medium sekretiert, werden die Proteine des Eigelbs im Medium denaturiert, was zu einer Trübung des Mediums

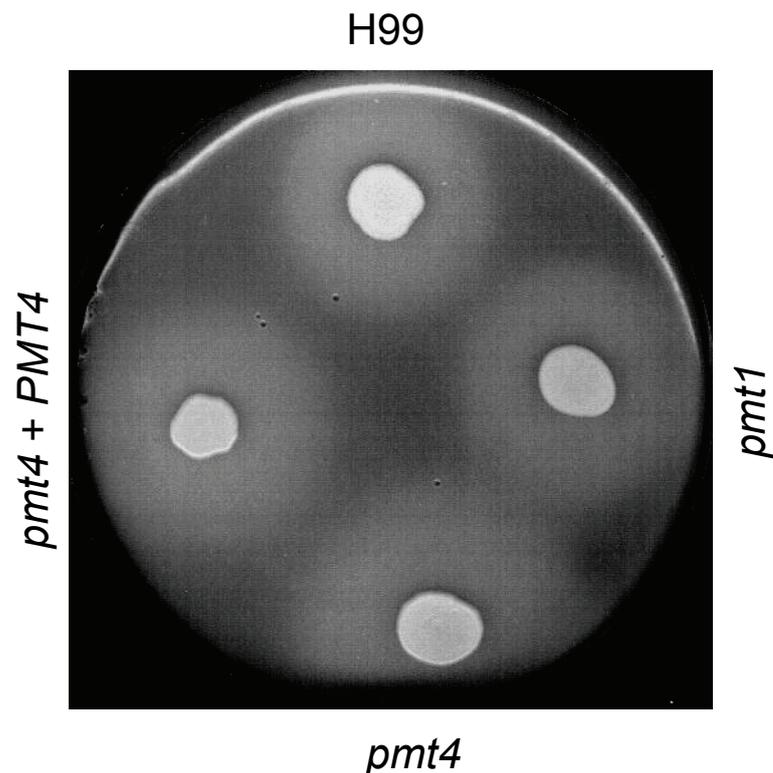


Abbildung 32: Phospholipase B Produktion

Die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1*), SW14 (*pmt4*) und SW16 (*pmt4+PMT4*) werden auf Egg Yolk Agarplatten (siehe Kapitel 2.7.2) aufgetropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

um die getropften Kolonien führt. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis für die Serotyp A Stämme

H99 (Wildtyp), SW13 (*MAT α pmt1::URA5*), SW14 (*MAT α pmt4::URA5*) und SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*). Um alle Stämme zeigte sich eine Trübung des Mediums und auch der Durchmesser der Trübung war in etwa gleich groß, so dass man auch hier davon ausgehen kann, dass in allen Stämmen eine ähnliche Menge an Phospholipase B produziert und sekretiert wird.

4.5.4.3. Paarung

Neben seiner Bedeutung für den Lebenszyklus, übt der Paarungstyp von *C. neoformans* scheinbar auch einen gewissen Effekt auf die Virulenz des Organismus aus. Es sollte daher im Weiteren für den Serotyp D durch unilaterale und bilaterale Kreuzungen der einzelnen *pmt*-Disruptionsstämme untersucht werden, ob die *pmt1*-Mutante bzw. die *pmt4*-Mutante Paarungsdefekte aufweist. Hierzu wurden für die unilateralen Kreuzungen *MAT α pmt*-Mutanten mit dem Wildtyp JEC21 (*MAT α*) auf V8-Agarplatten gemischt, und nach mehreren Tagen auf Filamentbildung überprüft. Für die bilateralen Kreuzungen wurden die *MAT α pmt*-Mutanten mit den entsprechenden *MAT α pmt*-Mutanten in allen möglichen Kombinationen gekreuzt, und in ähnlicher Weise untersucht. In Abbildung 33 erkennt man, dass nach 48 Stunden Inkubation bei 25 °C die *pmt1*-Mutante im Vergleich zur Kontrolle (JEC20 x JEC21) sowohl bei der unilateralen als auch der bilateralen Kreuzung keinen Paarungsdefekt zeigte. Im Gegensatz dazu war bei der *pmt4*-Mutante, sowohl bei uni- also auch bilateralen Kreuzungen, und auch bei Kreuzungen mit der *pmt1*-Mutante, nach 48 Stunden ein deutlicher Paarungsdefekt zu beobachten. Die Fähigkeit zur Paarung und Filamentbildung war aber nicht grundsätzlich gestört, da nach 72 Stunden bei den Kreuzungen mit der *pmt4*-Mutante kaum noch ein Unterschied zu der Wildtyp Kontrolle zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Die Paarung in der *pmt4*-Mutante ist demnach deutlich verlangsamt.

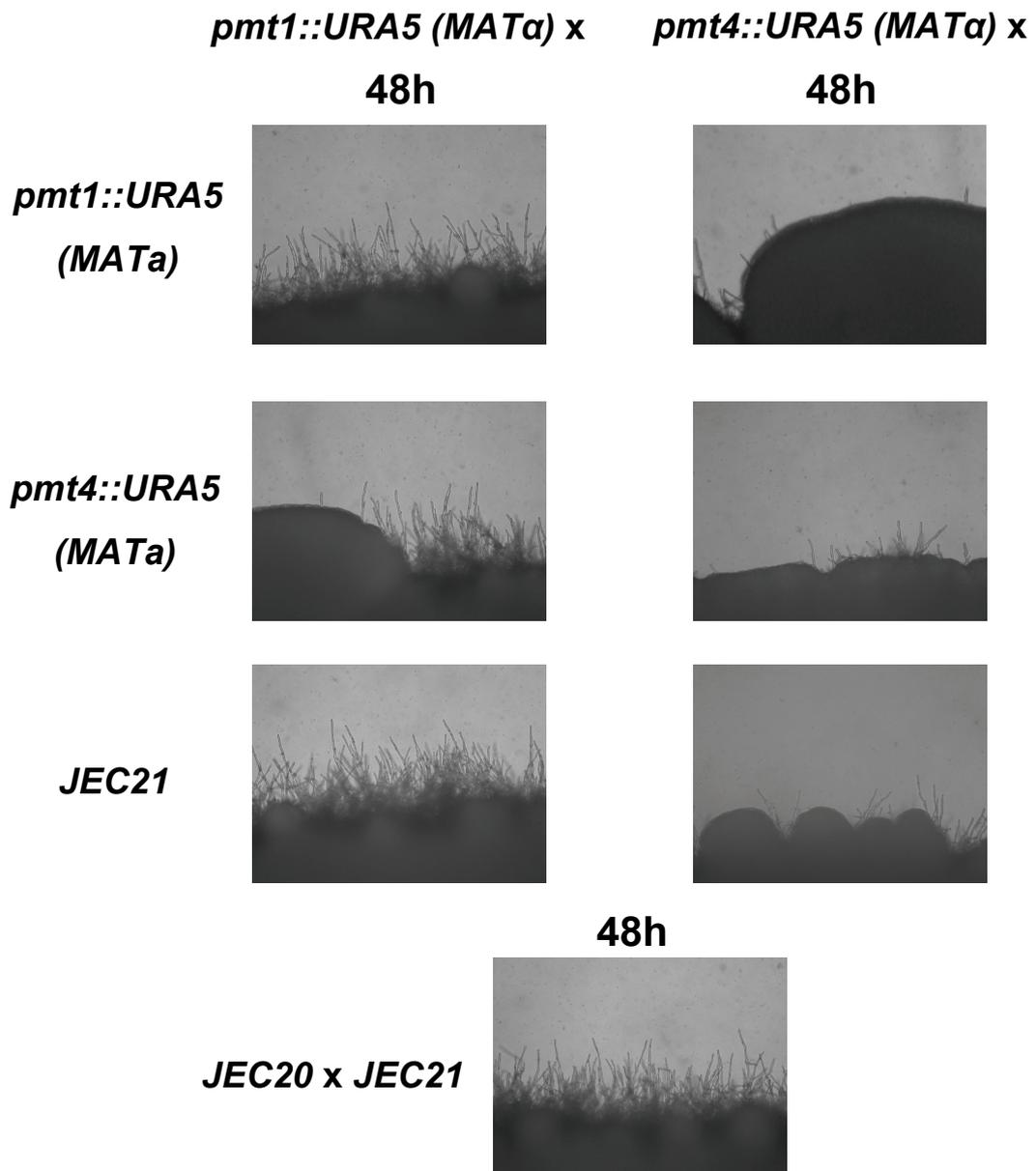


Abbildung 33: Uni- und bilaterale Paarung der Serotyp D *pmt*-Mutanten

Die *URA5*-Disruptionsstämme wurden in den angegebenen Kombinationen auf V8-Agarplatten gekreuzt und für 48 h bei 25 °C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Kreuzungen auf Filamentbildung qualitativ überprüft. Als Positivkontrolle diente die Kreuzung der Wildtyp-Stämme JEC20 mit JEC21. Die Fotos wurden mit einem Nikon Eclipse E400 Mikroskop verbunden mit einer Nikon CoolPix 990 Digitalkamera bei 400facher Vergrößerung aufgenommen.

4.5.4.4. Die Melaninproduktion der *pmt4*-Mutanten ist gestört

Als weiterer wichtiger Virulenzfaktor wurde die Fähigkeit der *pmt*-Mutanten zur Produktion von Melanin untersucht. Wie bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben ist *C. neoformans* nicht in der Lage, Melanin *de novo* aus L-Tyrosin herzustellen, und ist auf diphenolische Vorläufermoleküle angewiesen, die die Umwelt bereitstellt. Diese Vorläufer werden durch das Enzym Laccase, eine Phenoloxidase, die den limitierenden Schritt bei der Biosynthese des Melanins katalysiert, umgesetzt. Für diesen Test wurden zunächst die Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*MAT α pmt1::URA5*), SW14 (*MAT α pmt4::URA5*) und SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) wie in Kapitel 3.11.1. beschrieben auf Niger Seed-Platten getropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. In Abbildung 34 A ist das Ergebnis des Tropftest dargestellt. Man kann deutlich die Braunfärbung des Wildtyp-Stamms, sowie der *pmt1*-Mutante erkennen, was auf eine normale Melanin-Produktion schließen lässt. Im Gegensatz

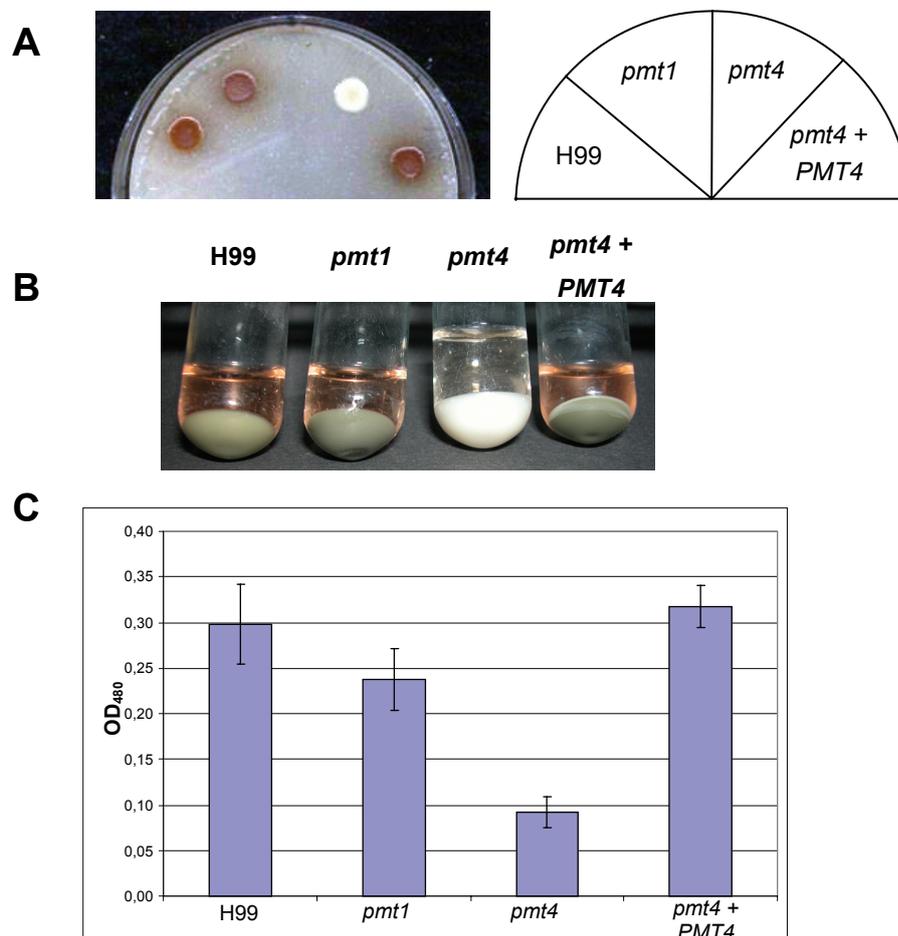


Abbildung 34: Analyse der Melanin Produktion in verschiedenen Medien

A Zellen einer Übernacht-Kultur der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW16 (*pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 1$ wachsen gelassen und in einem Volumen von 10 μ l auf Niger Seed-Platten aufgetropft und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. **B** Zellen einer Übernacht-Kultur der gleichen Stämme wurden in 2 ml glukosefreiem Asparagin-Medium (mit L-DOPA) resuspendiert. Die Zellen wurden für 24 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und das Pellet fotografiert. Die OD_{480} des Überstands wurde zur Quantifizierung der Färbung gemessen und als Balkendiagramm dargestellt. **(C)**

dazu zeigte die *pmt4*-Mutante einen deutlichen Defekt in der Melanin-Synthese. Durch die Reintegration des *PMT4* Gens (Stamm SW16) konnte die Fähigkeit, Melanin zu produzieren, im *pmt4*-Stamm SW14 wiederhergestellt werden, was nochmals die Abhängigkeit des Melanin-Defekts von der *pmt4*-Mutation bestätigt. Um die Daten des Niger Seed-Tropftests zu bestätigen, wurde im Anschluss ein zusätzlicher Melanintest in Flüssigmedium durchgeführt (Kapitel 3.8.2). Mit diesem Test kann grob überprüft werden, ob die Laccase falsch lokalisiert wird. Unter normalen Umständen ist das Enzym Laccase relativ fest an die Zellwand von *C. neoformans* gebunden. Wird die Laccase nun verstärkt in die Umgebung abgegeben, könnte dies in dem Flüssigtest zu einer verstärkten Melanin-Bildung im Überstand der Reaktion führen. Zunächst einmal bestätigte der Melanin-Flüssigtest die Ergebnisse des Tropftests, dass die *pmt4*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp, der *pmt1*-Mutante, sowie der rekonstituierten *pmt4*-Mutante kein Melanin produzieren konnte. Außerdem zeigt Abbildung 34 B, dass sowohl im Zellpellet der *pmt4*-Mutante, aber auch im entsprechenden Überstand keine Melanin-Bildung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 34 C). Dieses deutet darauf hin, dass die Laccase entweder nicht aus der Zelle sekretiert werden kann, oder aber die Aktivität des Enzyms drastisch reduziert ist. Beide Hypothesen müssten in Zukunft durch weitere Versuche überprüft werden.

4.6. Makrophagen Test

In den zurückliegenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die *pmt*-Mutanten zum Teil drastische Defekte in den wichtigsten Virulenzfaktoren aufweisen. Insbesondere der *pmt4*-Disruptionsstamm zeigte eine verringerte Kapselproduktion, aber vor allem einen kompletten Verlust der Melanin-Synthese. Dieses lässt vermuten, dass die Gesamtpathogenität der *pmt*-Mutanten mit großer Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu Wildtyp Stämmen deutlich reduziert sein könnte. Aus diesem Grund sollte abschließend die Virulenz der *pmt*-Disruptionsstämme in einem eukaryotischen Virulenzmodell getestet werden. Diese Tests wurden aufgrund der allgemein höheren Virulenz der Serotyp A Stämme nur mit dieser Varietät durchgeführt. Als Vortest wurde zunächst die Überlebensfähigkeit der *C. neoformans* Serotyp A Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*MAT α pmt1::URA5*), sowie SW14 (*MAT α pmt4::URA5*) in der Makrophagen Zelllinie J774A.1, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 35 ist die Auswertung dieses Virulenztests gezeigt, wobei die Anzahl der dargestellten Kolonie bildenden Einheiten (CFU=„Colony forming units“) nach der Extraktion aus den Makrophagen ein Maß für die Überlebensfähigkeit der *Cryptococcus*-

Stämme in den Makrophagen darstellt. Wie aufgrund der Defekte in den spezifischen Virulenzfaktoren erwartet wurde, zeigte die *pmt4*-Mutante in diesem Test eine deutliche, um etwa den Faktor ~20, reduzierte Anzahl Kolonie bildender Einheiten, das heißt, dass 20-mal weniger Zellen der *pmt4*-Mutante den Angriff der Makrophagen überlebt haben. Überraschend ist dagegen die Beobachtung, dass im Vergleich zum Wildtyp auch von der *pmt1*-Mutante deutlich mehr Zellen von Makrophagen getötet wurden (Faktor ~10) (Abbildung 35), obwohl phänotypisch kaum ein Unterschied bei den Tests bezüglich der Virulenzfaktoren zu beobachten war. Einen möglichen negativen Einfluss des Makrophagen-Nährmediums und der CO₂-Bedingungen auf die *C. neoformans pmt*-Mutanten konnte als Begründung für diese Beobachtungen ausgeschlossen werden, da keine Wachstumsunterschiede der *pmt*-Disruptionstämmen im Vergleich zum Wildtyp H99 in diesem Medium beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der *pmt*-Mutanten in den Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Disruption der *PMT*-Gene zurückzuführen.

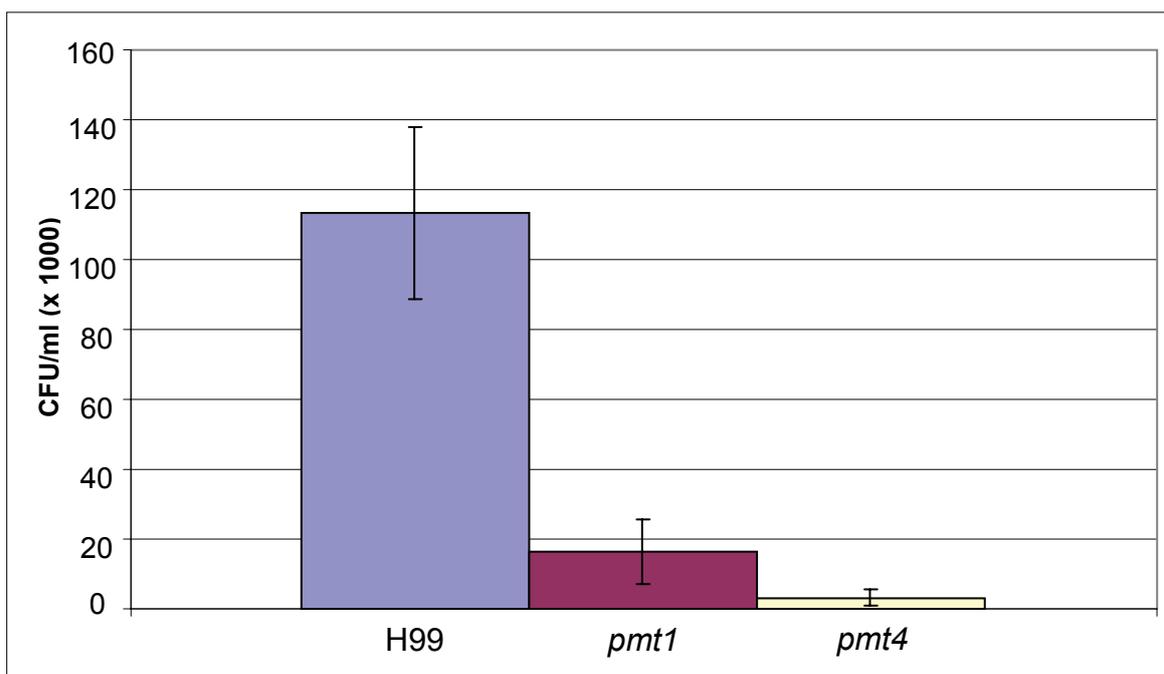


Abbildung 35: Makrophagen Phagozytose/Tötungstest

Die Virulenz der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*) und SW14 (*pmt4::URA5*) wurde im Makrophagen Phagozytose/Tötungstest ermittelt (siehe Kapitel 3.10). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten, die für jeden Stamm jeweils in 4-fach Bestimmung durchgeführt worden sind.

4.7. Die *pmt*-Mutanten im murinen Inhalations-Model

Zur endgültigen Bestimmung, ob die Pmt katalysierte O-Mannosylierung von Proteinen für die Virulenz von *C. neoformans* wichtig ist, wurden die *C. neoformans pmt*-Mutanten im

Anschluss an den Makrophagen-Test in einem murinen Inhalations-Modell auf ihre Infektiösität getestet (siehe Kapitel 3.11). Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. James A. Alspaugh und Dr. Michael S. Price an der Duke University (Durham, NC) wie beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden A/Jcr Mäuse durch Inhalation mit den *C. neoformans pmt*-Mutanten SW13 (*MAT α pmt1::URA5*) und SW14 (*MAT α pmt4::URA5*), den rekonstituierten Stämmen SW15 (*MAT α pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*), sowie als Kontrolle mit dem Wildtyp Stamm H99 infiziert. Es soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass sich bei dem Stamm SW14 (*MAT α pmt4::URA5*) aufgrund des vorhandenen Zellteilungsdefektes (s.o.) die Einstellung des Inokulums auf 10^5 CFU schwierig darstellte. Um dieses Problem auf eine sinnvolle Weise zu lösen, wurde ein Zellklumpen als ein CFU bezeichnet, wodurch aber effektiv mehr Zellen in dem Inhalationsmodell eingesetzt wurden als bei den Vergleichsstämmen.

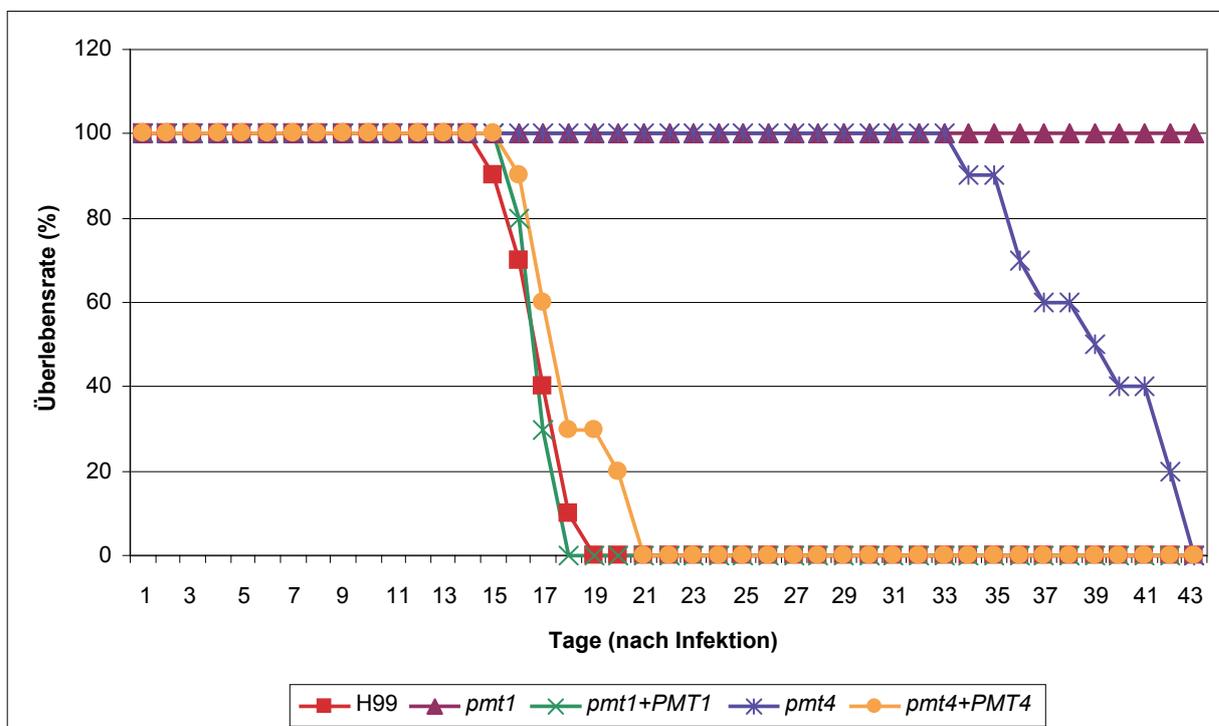


Abbildung 36: Die *pmt*-Mutanten im murinen Inhalations-Modell

Jeweils 10 A/Jcr Mäuse wurden intranasal mit 10^5 CFUs der Stämme H99 (Wildtyp), SW13 (*pmt1::URA5*), SW14 (*pmt4::URA5*), SW15 (*MAT α pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) und SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) infiziert. Dargestellt ist die Überlebensrate der Mäuse nach der Infektion.

An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass aus ethischen Gründen die Mäuse zu einem gesetzlich vorgeschriebenen Zeitpunkt nach streng definierten Kriterien getötet werden, und nicht an der Infektion zu Grunde gehen. Dieser Zeitpunkt, der im Folgenden als „Sterben“ bezeichnet wird, ist erreicht, wenn die infizierten Mäuse einen

>15 %igen Gewichtsverlust, starke neurologische Auffälligkeiten sowie Unfähigkeit, Nahrung und Wasser aufzunehmen, zeigen.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, sind die Mäuse, die mit dem Wildtyp (H99) bzw. den rekonstituierten Stämmen SW15 (*MAT α pmt1::URA5 PMT1-Neo^R*) oder SW16 (*MAT α pmt4::URA5 PMT4-Neo^R*) infiziert wurden, nach spätestens 21 Tagen gestorben, einem Wert, der typisch ist für das angewandte Modell-System. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen drei Stämmen konnte nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse des Maus-Modells für die Stämme SW13 und SW14 bestätigen wiederum die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Makrophagen-Tests (Abbildung 35). Die Virulenz der beiden getesteten *pmt*-Mutanten ist deutlich verringert. So starb die erste Maus, die mit SW14 (*pmt4A*) infiziert wurde, erst nach 34 Tagen und erst nach 42 Tagen waren alle Mäuse gestorben. Von den Mäusen, die mit SW13 (*pmt1A*) infiziert wurden, waren selbst nach Tag 43 noch keine Individuen gestorben. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Experiment abgebrochen, und die Mäuse wurden getötet. Anschließend wurden die Lungen der Tiere näher untersucht, um die Anzahl von SW13-Zellen in den Lungen der Mäuse zu bestimmen. Es wurde dabei eine große Zahl lebensfähiger Hefezellen festgestellt, was vermuten lässt, dass die *pmt1*-Mutante ebenfalls nicht komplett avirulent ist, aber sehr stark in ihrer Virulenz attenuiert ist. Im Vergleich zu den Mäusen, die mit den Wildtyp Cryptococccen infiziert wurden, überleben die Mäuse, die mit SW13 bzw. SW14 infiziert wurden jedenfalls signifikant länger ($p < 0,001$ für H99 gegenüber SW13 und SW14). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Protein-*O*-Mannosyltransferase Aktivität der Pmt-Proteine und damit die Protein-*O*-Glykosylierung einen großen Einfluss auf die Virulenz von *C. neoformans* hat.

5. Diskussion

Der humanpathogene Pilz *C. neoformans* hat in der Klinik in den letzten Jahren aufgrund der steigenden Zahl immunsupprimierter Menschen, hervorgerufen durch den zunehmenden Einsatz von Chemotherapeutika und Immunsuppressiva, sowie immunschwächende Krankheiten wie z. B. AIDS, enorm an Bedeutung gewonnen. Neben der beständigen Zunahme an Risikopatienten, ist in den letzten Jahren vor allem auch die Resistenzbildung gegen Antimykotika ein zunehmendes Problem der Medizin, was unter anderem durch eine unsachgemäße Anwendung der Antibiotika in der Klinik einerseits, und möglicherweise auch durch eine extensive Anwendung von Fungiziden in der Landwirtschaft andererseits hervorgerufen wird. Durch diese Resistenzbildung wird die Zahl der gegen Pilzinfektionen wirksamen Medikamente zunehmend eingeschränkt. Die Erforschung spezifischer Virulenzfaktoren humanpathogener Pilze hat sich bei der Suche nach neuen, wirksamen und spezifischen Antimykotika zu einem der wichtigsten Forschungsgebiete entwickelt. Wie bei allen pathogenen Organismen wird die Virulenz von *C. neoformans* durch die Interaktion des Pathogens mit seinem Wirt bestimmt und hängt daher im Wesentlichen von extrazellulären Faktoren ab. Es ist bekannt, dass die *O*-Glykosylierung einen großen Einfluss auf die Sekretion und Funktion vieler extrazellulärer Komponenten und Zellwandstrukturen hat, wobei die Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) eine zentrale Rolle bei der *O*-Glykosylierung spielen, da sie den initiiierenden Schritt dieser post-translationalen Proteinmodifikation katalysieren (Ernst und Prill, 2001; Gentzsch und Tanner, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Protein-*O*-Glykosylierung einen starken Einfluss auf einige spezifische Virulenzfaktoren, sowie die gesamte Virulenz von *C. neoformans* hat.

5.1. Sequenzanalyse der Pmt-Proteine

Die Protein-*O*-Mannosyltransferasen sind vor allem innerhalb der Eukaryonten, mit Ausnahme der Pflanzen, hoch konserviert, konnten aber auch in einer bestimmten Gruppe von Prokaryonten, den sogenannten Actinobacteria wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Corynebacterium glutamicum*, nachgewiesen werden. Der in Abbildung 8 dargestellte phylogenetische Stammbaum verdeutlicht die Einteilung der Pmt-Proteine in drei Subfamilien, bestehend aus der Pmt1-, der Pmt2 und der Pmt4-Familie. In *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* konnte jeweils nur ein einziges Mitglied der Pmt-Familie identifiziert werden, das Protein-*O*-Mannosyltransferase-Aktivität zeigt (Mahne *et al.*, 2006; VanderVen

et al., 2005). Diese Mannosyltransferasen wurden trotz struktureller Abweichungen der Pmt1-Subfamilie zugeordnet. Abbildung 8 zeigt allerdings, dass die bakteriellen Pmt-Proteine eine sehr große phylogenetische Distanz zu den anderen Pmt-Proteinen aufweisen. Es ist also gut möglich, dass sich in den Bakterien parallel zu den Pilzen ein Protein mit Protein-O-Mannosyltransferase-Aktivität entwickelt hat. Während in *S. cerevisiae* und *C. albicans* sieben bzw. fünf Pmt-Proteine vorhanden sind (Ernst und Prill, 2001; Gentzsch und Tanner, 1997), konnten bei vielen anderen Pilzen wie z. B. *C. neoformans*, *Coprinus cinereus* und *Ustilago maydis* nur jeweils drei Pmt-Proteine identifiziert werden. In höheren Eukaryonten, wie *Drosophila* und Säugetieren (Maus, Ratte, Mensch), sind dagegen nur noch zwei *PMT*-Gene, *POMT1* und *POMT2*, vorhanden. Durch Sequenzvergleiche (Abbildung 8) konnte gezeigt werden, dass das *POMT2*-Gen ein Mitglied der Pmt2-Subfamilie ist, und dass das *POMT1*-Gen zur Pmt4-Subfamilie gehört (Endo, 2004; Girrbach und Strahl, 2003; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), wohingegen ein Mitglied der Pmt1-Subfamilie nicht identifiziert werden konnte.

Wie bereits erwähnt konnten durch Sequenzanalysen in vielen Pilzen, bis auf wenige Ausnahmen, in der Regel drei Mitglieder der Pmt-Familie identifiziert werden. Proteinfamilien entstehen oftmals durch Duplikationen und anschließender Mutation eines einzelnen Ur-Gens, was sich zumeist durch Ähnlichkeiten in der Protein-, aber auch Genstruktur bemerkbar machen kann. Aufgrund der ermittelten Exon/Intron-Struktur der *PMT*-Gene war es uns möglich die Verwandtschaft der *PMT*-Gene in *C. neoformans* durch eine Analyse der Intronpositionen zu ermitteln. Es konnten jedoch innerhalb der drei *PMT*-Gene keine konservierten Intronpositionen oder wiederkehrende Module gefunden werden. Die Sequenzvergleiche und auch die Analyse der Intronpositionen deuten demnach darauf hin, dass sich die drei Gene *PMT1*, *PMT2* und *PMT4* unabhängig voneinander entwickelt haben. Ein Grund für die ungewöhnlich hohe Zahl von sieben Pmt-Proteinen in *S. cerevisiae* ist vermutlich die während der Evolution des Organismus aufgetretene Duplikation des kompletten Hefe-Genoms (Wolfe und Shields, 1997). In *C. albicans* wird dagegen diskutiert, dass die erhöhte Anzahl von Pmt-Proteinen sich möglicherweise dadurch erklären lässt, dass einzelne Isoformen spezielle, für die Virulenz relevante Funktionen erworben haben, welche dem Pilz einen Selektionsvorteil unter entsprechenden Bedingungen bieten. So zeigt beispielsweise die *pmt5*-Mutante keine *in vitro* Phänotypen, ist jedoch im Maus- und Hautmodell in ihrer Virulenz eingeschränkt, was für eine spezielle Funktion von Pmt5p in der Virulenz spricht (Rouabhia *et al.*, 2005).

Warum in den höheren Eukaryoten nur noch zwei Mitglieder der Pmt-Familie vorhanden sind ist bisher völlig ungeklärt. Es ist allerdings möglich, dass die Pmt-katalysierte Protein-*O*-Mannosylierung im Laufe der Evolution immer mehr an Bedeutung verloren hat. Während in Pilzen die *O*-Mannosylierung ein essentieller Prozess ist, scheinen Defekte in den Pmt-Proteinen zwar schwere Schäden hervorzurufen, sie sind aber allem Anschein nach nicht letal. Dies liegt vermutlich daran, dass der Großteil der Protein-*O*-Glykosylierung in diesen Organismen nach einem anderen Prozess verläuft. Berücksichtigt man, dass die Pmt-Proteine als Dimere funktionell sind, scheinen die höheren Eukaryoten sich auf ein Minimum an notwendiger genetischer Ausstattung für den Prozess der Mannosylierung zu beschränken. Demgegenüber könnte die höhere Anzahl von mindestens drei Pmt-Proteinen in Pilzen zum einen als „back-up“ verstanden werden, ein für essentielle Prozesse typisches Phänomen. Zum anderen könnte dies aber auch, wie bereits angedeutet, als Anpassung des Prozesses an spezifische Bedingungen oder Zielproteine verstanden werden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass in diesen Organismen im Gegensatz zu den höheren Eukaryoten ein zusätzlicher *O*-Glykosylierungs-Mechanismus fehlt.

5.2. Die Protein-*O*-Mannosylierung ist essentiell für *C. neoformans*

Wie bereits mehrfach erwähnt ist die Protein-Glykosylierung eine essentielle post-translationale Proteinmodifikation. So konnte schon in mehreren Organismen gezeigt werden, dass ein totaler Verlust der Protein-*N*-Glykosylierung letal ist (Freeze und Westphal, 2001). Es war demnach naheliegend, dass die *O*-Glykosylierung ebenfalls essentiell ist, und in *S. cerevisiae* konnte bereits vor einiger Zeit gezeigt werden, dass ein Minimum an *O*-Glykosylierung für das Überleben der Zelle notwendig ist (Gentzsch und Tanner, 1996). Zudem konnte vor kurzem in *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005) und *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005) gezeigt werden, dass eine Mutation von Pmt2 essentiell für das Wachstum ist. Pmt2 gilt in vielen Organismen als Hauptenzym der Protein-*O*-Glykosylierung, ist aber für seine Aktivität auf die Dimerisierung mit anderen Pmt-Proteinen angewiesen. Im Gegensatz zu *C. albicans* und *S. pombe* ist in *S. cerevisiae* eine Mutation von *PMT2* nicht essentiell für das Wachstum, was vermutlich daran liegt, dass es in dieser Hefe 3 Mitglieder der Pmt2-Subfamilie gibt (Abbildung 5). Da in *C. neoformans* nur ein Mitglied der Pmt2 Sub-Familie vorhanden ist, und aufgrund der insgesamt geringen Zahl an Pmt-Proteinen war die Wahrscheinlichkeit sehr

hoch, dass *Pmt2* in *C. neoformans* ebenfalls essentiell ist. Während die Disruption des *PMT1*- und *PMT4* Gens in haploiden Stämmen relativ schnell durchgeführt und verifiziert werden konnte, konnte *PMT2* trotz mehrfacher Versuche nicht mutiert werden. Zum anderen konnte von einem diploiden, heterozygoten *pmt2* / *PMT2*- Stamm keine haploiden *pmt2*-Nachkommen isoliert werden. Diese beiden Experimente scheinen demnach die Hypothese zu bestätigen, dass *PMT2* in *C. neoformans* ebenfalls essentiell ist.

Während in *S. cerevisiae* die gleichzeitige Disruption von *PMT1* und *PMT4*, vermutlich auch aufgrund der bereits erwähnten Duplikation des kompletten Genoms (Wolfe und Shields, 1997), kaum einen Effekt auf den Organismus hat (Gentzsch und Tanner, 1996), konnte dagegen für *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005) und *C. albicans* (Ernst und Prill, 2001) gezeigt werden, dass eine *pmt1 pmt4*-Doppeldelation letal ist. Durch die Kreuzung einer *pmt1*- und einer *pmt4*-Mutante mit anschließender Analyse der Nachkommen konnte ich zeigen, dass eine Doppeldisruption der nicht-essentiellen Pmt-Proteine in *C. neoformans* ebenfalls synthetisch letal ist. Unter den rekombinanten Nachkommen konnten keine lebensfähigen *pmt1 pmt4*-Zellen gefunden werden. Die gefundene genetische Interaktion von *PMT1* und *PMT4*, bzw. die für Pmt2 angenommene Heterodimer-Bildung lässt daher vermuten, dass Pmt2 sowohl mit Pmt1, als auch Pmt4 Heterodimere bilden kann, die zumindest zum Teil redundante Funktionen haben müssen. Eine physikalische Interaktion der Proteine wäre im Weiteren zu überprüfen, wobei eine anfängliche Analyse der Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe des „Split-Ubiquitin“-Systems eine Pmt2/Pmt4 Heterodimer- bzw. Pmt4/Pmt4 Homodimer-Bildung in *C. neoformans* nahelegt (Grahl, 2006). Die Homodimerisierung von Pmt4 wird auch für andere Organismen vermutet, wobei die Aktivität dieses Dimers aber nicht ausreichen scheint, um den Verlust von Pmt2 kompensieren zu können. Dieses unterstützt nochmals die Annahme, dass es sich bei Pmt2 in den meisten Pilze vermutlich um das Hauptenzym der O-Glykosylierung handelt. Eine herausragende Funktion des Pmt4 Homodimers unter bestimmten Bedingungen kann natürlich nicht ausgeschlossen werden. Die anschließenden phänotypischen Analysen der einzelnen *pmt*-Mutanten in *C. neoformans* sollten auch diesbezüglich weitere Aufschlüsse auf die eventuell unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Pmt-Proteine liefern.

5.3. Mutationen in den PMT-Genen beeinflussen die Zellwand

Die Zellwand von *C. neoformans* besteht, wie bei den meisten Pilze, aus α -Glukanen (ca. 35 %, die meisten α -1,3, einige auch α -1,4 verknüpft), β -Glukanen (15 %, die meisten β -1,6,

einige β -1,3 verknüpft), Glykoproteinen, die Mannosen und Galaktosen enthalten, und Chitin (Klutts *et al.*, 2006). Das Fehlen von α -Glukanen führt in *C. neoformans* dazu, dass die Zellen sensitiver auf bestimmte Stressfaktoren, z. B. erhöhte Temperatur und SDS, reagieren und Zellteilungsdefekte aufweisen. Obwohl weiterhin Kapselmaterial in die Umgebung sezerniert wird fehlt diesen Zellen außerdem die Kapsel, da die Kapsel durch α -1,3 Verknüpfungen an die Zellwand gebunden ist. Weiterhin führt die Abwesenheit von α -Glukanen zu einer stark unorganisierten Zellwand, was sich durch eine abnormale Zellmorphologie bemerkbar macht (Reese *et al.*, 2007). Da Glykoproteine ebenfalls für die Struktur und Organisation der Zellwand verantwortlich sind und im Wesentlichen *O*-mannosyliert werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Disruption der *PMT* Gene einen Einfluss auf die Struktur und Organisation der Zellwand haben.

Die von uns durchgeführten Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der *pmt*-Mutanten, bei denen sie unterschiedlichsten Stressfaktoren, wie z. B. erhöhter Temperatur (Abbildung 16 und Abbildung 17), SDS (Abbildung 24 und Abbildung 25), hyperosmotischen (Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28) bzw. hypoosmotischen (Abbildung 29) Bedingungen ausgesetzt waren, bestätigen, dass die Disruption der *PMT* Gene einen starken Einfluss auf die Zellwandstruktur und -organisation hat. Zudem zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen der *pmt*-Mutanten (Abbildung 19), dass sowohl eine veränderte Zellmorphologie als auch Probleme bei der Zellteilung zu beobachten sind, welche durch weitere Test (Abbildung 20) bestätigt wurden. Fluoreszenzaufnahmen mit Calcofluor White zeigten ebenfalls, dass die *pmt4*-Mutante zwar Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle bilden kann aber die Zellseparation gestört ist. Dieser Phänotyp wurde auch schon bei *S. pombe* für *eng1*-Mutanten beschrieben (Martin-Cuadrado *et al.*, 2003). Dieses Gen kodiert für eine Endoglukanase, die in die Zellwand sekretiert wird und für die Auflösung des primären Septums während der Zellteilung benötigt wird. SpEng1p hat eine Threonin-reiche Domäne, was wie erwähnt als ein Zeichen für eine mögliche Mannosylierung gewertet wird. Einen Datenbanksuche nach *Cryptococcus* Proteinen, die eine Serin / Threonin reiche Region und eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker Domäne besitzen, ergab eine Liste von 55 Proteinen (Levitz und Specht, 2006). Unter diesen Proteinen sind einige Kandidaten, die sehr wahrscheinlich an der Modifikation von Zellwandglukanen und der Kapsel beteiligt sind. Unter anderem konnten drei Chitin-Deacetylasen (Cda1-3), eine β -1,3-Glukosyltransferase (Gas1), die potentielle Glukanosyltransferase Cig1, und drei vermutliche β -1,3-Endoglukanen (AAW45003, AAW46063 und AAW46065) identifiziert werden (Levitz und Specht, 2006). Eine reduzierte *O*-Mannosylierung, hervorgerufen durch die Disruption von

PMT4, könnte demnach die Funktion dieser Endoglykanasen einschränken und somit die Probleme bei der Zellseparation verursachen. Da die erwähnten Zellteilungsdefekte spezifisch für die *pmt4*-Mutation sind, nicht aber in den entsprechenden *pmt1*-Mutanten auftreten, könnte es sich bei diesen Enzymen dann sogar um *Pmt4*-spezifische Zielproteine handeln. Dies könnte in Zukunft über entsprechende Protein-Analysen überprüft werden.

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass während des vegetativen Wachstums, der Reaktion auf Umweltstress und der Pheromon-induzierten Morphogenese die Zellwandstabilität durch den Proteinkinase C (*Pkc1*) Signaltransduktionsweg kontrolliert wird (Heinisch *et al.*, 1999). Veränderungen der Zellwand werden von bestimmten Plasmamembranproteinen wahrgenommen, die oberhalb der Protein Kinase C abhängigen MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Signalkaskade aktiv sind. Die *O*-Mannosylierung dieser Proteine, zu denen die *Wsc* Proteinfamilie und *Mid2p* zählen, ist essentiell für deren Funktion (Lommel *et al.*, 2004). Der *Pkc1* Weg ist hoch konserviert, und Phänotypen, die in *S. pombe* für Mutanten des *Pkc1* Wegs beobachtet wurden, konnten in *S. pombe* *pmt*-Mutanten ebenfalls beobachtet werden. Dazu gehört eine erhöhte Sensitivität gegenüber Temperaturstress, eine anormale Zellmorphologie, veränderte Zellwandstrukturen, eine erhöhte Anzahl an Vakuolen und ungewöhnlich viele oder falsch positionierte Septen (Willer *et al.*, 2005). Der *Pkc1* Weg in

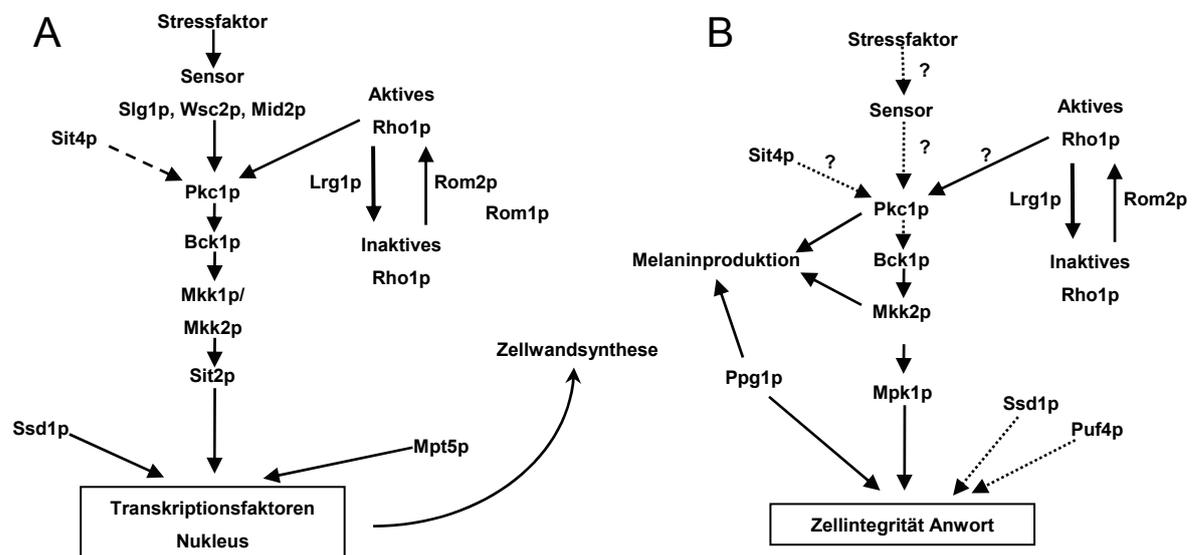


Abbildung 37: *Pkc1* Weg in *S. cerevisiae* und *C. neoformans*

Model des PKC Wegs in *S. cerevisiae* (A) und *C. neoformans* (B). (modifiziert nach (Gerik *et al.*, 2005))

C. neoformans ist noch nicht gut untersucht, doch erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass viele Komponenten dieses Signaltransduktionswegs, die in *S. cerevisiae* vorkommen auch in *C. neoformans* zu finden sind (Abbildung 37), obwohl sich die beiden Organismen evolutionär vor über 500 Millionen Jahren getrennt haben (Gerik *et al.*, 2005). Wie schon

zuvor berichtet zeigen die *pmt*-Mutanten in *C. neoformans* Temperatursensitivität, eine anormale Zell- und Vakuolenmorphologie und ungewöhnlich viele oder falsch positionierte Septen. In Analogie zu *S. pombe* könnte dies bedeuten, dass eventuell durch die *pmt*-abhängigen Defekte in der Zellmembran und/oder Zellwand eine korrekte Signalperzeption bzw. -weiterleitung durch den Pkc1-Weg nicht gewährleistet ist. Mitglieder der Wsc Proteinfamilie, Mid2p oder ein anderer Sensor des Pkc1 Wegs konnten in *C. neoformans* bis jetzt nicht identifiziert werden (Abbildung 37) (Gerik *et al.*, 2005), aber bei einer Datenbankanalyse konnten mehrere hypothetische Proteine gefunden werden, die eine oder mehrere Wsc Domänen tragen. Zusammenfassend kann man sagen, dass vermutlich eine Reihe von Proteinen, die an der Aufrechterhaltung der Struktur und Organisation der Zellwand beteiligt sind, *O*-mannosyliert werden, und somit die Pmt Proteine indirekt einen erheblichen Einfluss auf die Zellmorphologie haben.

Wie gerade erwähnt konnten wir zeigen, dass es sowohl bei der *pmt1*-, als auch bei der *pmt4*-Mutante scheinbar zu erheblichen Defekten in der Biogenese vesikulärer Strukturen kommt. Für die einwandfreie Biogenese vesikulärer Strukturen, aber auch für das korrekte Sortieren von Proteinen während der Sekretion und anderen Vesikel-abhängigen Transportprozessen sind eine Reihe von Proteinen beteiligt, die sich in der Membran der Vesikel befinden und unter anderem für die Identifizierung oder Fusion der Vesikel benötigt werden. Defekte in der Glykosylierung könnten nun dazu führen, dass diese Proteine ihre entsprechenden Funktionen nicht mehr erfüllen können, was zu den beobachteten Defekten führen könnte. Des Weiteren führen Defekte in der Glykosylierung offensichtlich zu Fehlern bezüglich der Lokalisation von bestimmten Proteinen. So konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Fus1p, ein für die Zellfusion bei der Pheromon-induzierten Paarung benötigtes Protein, in *pmt4*-Mutanten in späten Golgi Strukturen akkumuliert, da es nicht *O*-glykosyliert wird. Einen ähnlichen Phänotyp konnte beobachtet werden, wenn das entsprechende *O*-Glykosylierungsmotiv von Fus1p entfernt wurde (Proszynski *et al.*, 2004). Insgesamt scheint es also durch Defekte bei der *O*-Glykosylierung zu einer Störung des Protein-sekretorischen Wegs zu kommen. Dies könnte im Fall von *C. neoformans* eine wichtige Rolle hinsichtlich der spezifischen Virulenzfaktoren spielen.

5.4. *pmt*-Mutanten haben eine stark verringerte Virulenz

In Kapitel 1.4 wurde bereits erläutert, dass die Virulenz von *C. neoformans* mit vielen besonderen Eigenschaften in Verbindung gebracht wird, wie z. B. der Fähigkeit bei 37 °C zu wachsen (Cruz *et al.*, 2000), eine Polysaccharidkapsel zu bilden (Doering, 2000), Melanin zu

produzieren (Polacheck, 1991), sowie Enzyme in die Umgebung zu sekretieren (Chen *et al.*, 1997). All diese Virulenzfaktoren wurden im Rahmen diese Arbeit untersucht und für die meisten konnte festgestellt werden, dass sie durch die Disruption der *PMT* Gene im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert waren. Während im Serotyp D bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bzw. den rekonstituierten Stämmen kein Unterschied im Wachstum bei 37 °C beobachtet werden konnte (Abbildung 17), zeigten die Serotyp A *pmt1* und *pmt4* Mutante bei dieser Temperatur einen leichten Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 16). Dieser Defekt ist allerdings so gering, so dass er für die Virulenz der pathogenen Hefe keine Rolle spielen dürfte.

Es ist weiterhin bekannt, dass alle Mutanten, die keine Kapsel bilden können avirulent sind (Janbon, 2004). In Abbildung 30 erkennt man, dass beide *pmt*-Mutanten in der Lage sind eine Kapsel zu synthetisieren. Eine nähere Analyse der Kapsel-Dicke unter Berücksichtigung der Zellgröße ergab für die *pmt4*-Mutante eine geringfügig verkleinerte Kapsel im Vergleich zum Wildtyp oder der *pmt1*-Mutante, die keinen signifikanten Unterschied aufwies.

Ebenso konnte für die Produktion und Sekretion von extrazellulären Enzymen, sei es Urease (Abbildung 31) oder Phospholipase B (Abbildung 32), bei den *pmt*-Mutanten keine Beeinträchtigung festgestellt werden. Einzig bei der Melanin-Synthese konnte bei zumindest einer Mutante ein signifikanter Defekt nachgewiesen werden. Während die *pmt1*-Mutanten normal Melanin produzieren können, konnte für die *pmt4*-Mutanten ein schwerer Defekt in der Melanin-Synthese nachgewiesen werden (Abbildung 34). Dieses Ergebnis ist deshalb von großem Interesse, da *Cryptococcus*-Mutanten, die kein Melanin synthetisieren können i.d.R. avirulent sind. Dies wäre somit der erste Hinweis darauf, dass bestimmte *pmt*-Mutationen in *C. neoformans* zu einer verringerten Virulenz führen können, wie es schon für *C. albicans* beschrieben wurde (Rouabhia *et al.*, 2005). Es gibt mehrere mögliche Erklärungen dafür, dass die *pmt4*-Mutante kein Melanin mehr produzieren kann. Wie man aus Abbildung 37 entnehmen kann, haben die Proteine Pkc1p, Mkk2p und Ppg1p des Pkc1 Signaltransduktionsnetzwerks einen direkten Einfluss auf die Melaninproduktion, indem sie die Struktur der Zellwand aufrecht erhalten, und damit die korrekte Assoziierung der Phenoloxidase Laccase an die Zellwand gewährleisten (Heung *et al.*, 2005). Laccase ist wie erwähnt das einzige Enzym, das an der Produktion von Melanin beteiligt ist und ist damit der limitierende Faktor der Synthese. Wie in Abbildung 38 gezeigt, wird der Ausgangsstoff Dopamin (DOPA) durch Laccase in Dopaquinon umgewandelt, woraus autokatalytisch Dopachrom gebildet wird, das dann zu Melanin polymerisiert. Probleme in diesem Signaltransduktionweg könnten dazu führen, dass die *pmt4*-Mutante entweder aufgrund abweichender Expression, oder aber

Mislokalisierung der Laccase nicht mehr in der Lage ist Melanin zu produzieren. Neben der indirekten Beeinflussung der Laccase Aktivität über den Pkc1-Signalweg besteht auch die Möglichkeit, dass Laccase direkt ein Zielprotein von Pmt4p ist.

Bei der Laccase handelt es sich um ein Zellwand-assoziiertes Protein, das aber keinen GPI-Anker zu besitzen scheint (Zhu *et al.*, 2001). Es konnte weiterhin bereits gezeigt werden, dass die Laccase, wie viele andere Zellwand-assoziierte Proteine, N-glykosyliert wird

(Williamson, 1994). Die Wahrscheinlichkeit, dass Laccase zudem auch O-glykosyliert wird ist daher sehr hoch, da in *S. cerevisiae* für einige Proteine gezeigt werden konnte, dass einer N-Glykosylierung eines Proteins oftmals einer O-Glykosylierung vorausgeht, wodurch das Glykosylierungsmuster teilweise reguliert wird (Ecker *et al.*, 2003). Ob und in welcher Form die Glykosylierung der Laccase in der *pmt4*-Mutante betroffen ist soll in nächster Zeit bestimmt werden.

Die Tatsache, dass nur die *pmt4*-Mutante eine Defekt in der Melanin-Biosynthese aufweist, bestätigt zudem für *C. neoformans*, dass wie aus *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999), *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005) und *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005) bereits bekannt, jedes Pmt-Protein vermutlich auch spezifische Zielproteine haben kann.

Die Analyse der spezifischen Virulenzfaktoren für die *pmt*-Mutanten ließ vermuten, dass die *pmt4*-Mutante avirulent, zumindest aber stark abgeschwächt in ihrer Virulenz ist, wohingegen die Analyse der *pmt1*-Mutante zunächst keinen signifikanten Defekt hinsichtlich der Virulenz erwarten ließ. In dem durchgeführten Makrophagen Test (Abbildung 35) und auch im Maus Model (Abbildung 36) konnte für die *pmt4*-Mutante wie erwartet eine deutlich verringerte Virulenz nachgewiesen werden, womit auch die Ergebnisse von Olsen und Kollegen bestätigt wurden (Olsen *et al.*, 2007), die vor kurzem eine vollständige Deletion von *pmt4* in Serotyp A

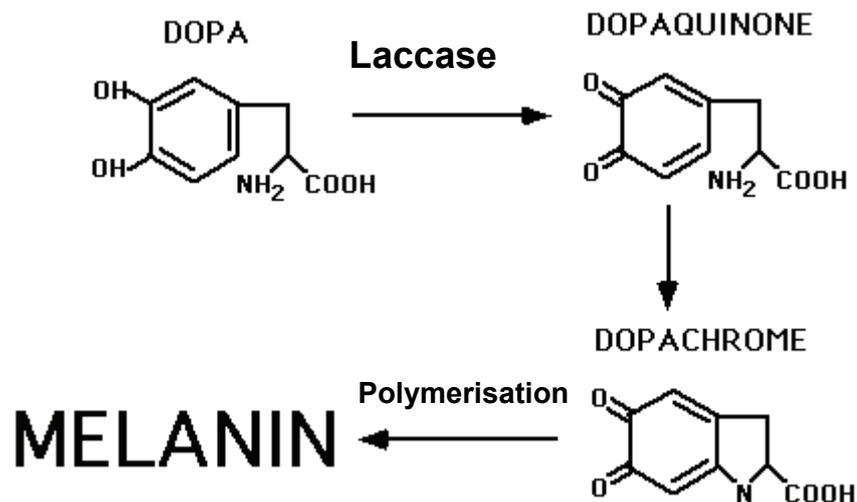


Abbildung 38: Angenommener Melanin Synthese Weg in *C. neoformans*

Model des Melanin Synthese Wegs in *C. neoformans*. (modifiziert nach (Buchanan und Murphy, 1998))

hergestellt und analysiert haben, und ebenfalls eine stark verringerte Virulenz feststellen konnten. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt sind Mutanten, die kein Melanin herstellen können normalerweise komplett avirulent. Da die *pmt4*-Mutante, trotz einer deutlich verringerten Virulenz, immer noch in der Lage ist, die infizierten Mäuse zu töten, kann der Melaninsynthese-Defekt nicht vollständig sein. Weiterführende Experimente sollen in Zukunft unter anderem klären, ob die Melanin-Synthese in den *pmt4*-Mutanten eventuell nur deutlich verlangsamt ist.

Völlig unerwartet erwies sich die *pmt1*-Mutante sowohl im Makrophagen Test, aber vor allem auch im Maus Model als nahezu avirulent. Für dieses Verhalten gibt es zunächst einmal keine befriedigende Erklärung, da die *pmt1*-Mutante bei den Untersuchungen der einzelnen Virulenzfaktoren keine offensichtlichen Unterschiede zum Wildtyp zeigte. Allerdings könnte natürlich die veränderte Zellmorphologie und die damit in Verbindung gebrachten Defekte im Pkc1-Weg dafür verantwortlich sein, dass die *pmt1*-Mutante avirulent ist. Da die Melaninproduktion im Gegensatz zu der *pmt4*-Mutante nicht betroffen ist, müsste Pmt1p aber andere spezifische Zielproteine haben, die für die Virulenz von *C. neoformans* essentiell sind. Hierzu könnten z. B. bestimmte Mannoproteine gehören, die von Levitz und Specht 2006 aufgelistet und identifiziert wurden. Darunter sind Proteine, die die Kapsel modifizieren können oder an deren Ablösung von der Zelle involviert sind. Auch die *pmt1*-Mutante ist offensichtlich nicht völlig avirulent, da nach Ablauf des Virulenztest immer noch *Cryptococcus*-Zellen in den Mäusen nachgewiesen werden konnten, diese also im Versuchszeitraum nicht vollständig aus dem System bereinigt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Charakterisierung der gesamten Pmt Proteinfamilie in dem humanpathogenen Pilz *C. neoformans* sowohl für den Serotyp A als auch D durchgeführt, wobei die Virulenz aus praktischen Gründen nur für den Serotyp A bestimmt werden konnte. Vor kurzem wurde bereits eine Charakterisierung der *pmt4*-Mutante des Serotyps A veröffentlicht (Olson *et al.*, 2007), deren Ergebnisse hinsichtlich morphologischen und Wachstums-Defekten soweit überlappend bestätigt werden konnten. Auch die verringerte Virulenz im Maus Model konnte in unseren Versuchen bestätigt werden. Interessanterweise widerspricht allerdings der von uns beobachtete Defekt in der Melanin-Synthese den Ergebnissen, die von Olson *et al.* 2007 publiziert wurden, die eine annähernd normale Melanin-Synthese nachweisen konnten. Der Grund für die abweichenden Ergebnisse ist unklar, da Olson *et al.* 2007 bei ihrer Untersuchung den identischen Stammhintergrund verwendet haben. Der wesentliche Unterschied zwischen der hier präsentierten Arbeit und Olsen *et al.* besteht in der Art der Mutation. Während hier eine Insertions-Mutagenese

gewählt wurde, wurde von Olsen und Kollegen eine vollständige Deletion des PMT4 ORFs durchgeführt. Weshalb dies aber zu den, nur zum Teil abweichenden Ergebnisse führt ist weiterhin offen.

Um die Bedeutung der Protein-*O*-Mannosyltransferasen für die Virulenz von *C. neoformans* noch spezieller bestimmen zu können, wäre es für die Zukunft wichtig, einige spezifische Zielproteine der Pmt-Proteine zu identifizieren und entsprechend zu analysieren. Ein möglicher Kandidat für Pmt4 wäre wie oben beschreiben z. B. das Enzym Laccase. Olsen und Kollegen konnten zum anderen zeigen, dass die Deletion von Pmt4 große Unterschiede im Proteom der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach sich ziehen. Eine weitere Analyse dieser Unterschiede könnte ebenfalls zu Zielproteinen der Pmt-Proteine führen, was insbesondere für Pmt1 eine gute Alternative darstellt, da dort, wie gezeigt, keine offensichtlichen Defekte bei den wichtigsten Virulenzfaktoren nachgewiesen wurden.

Neben der Grundlagenforschung könnten die gezeigten Ergebnisse auch für die anwendungsbezogene Forschung in Zukunft von Nutzen sein. Wie eingangs erwähnt ist die Protein-*O*-Mannosylierung vor allem typisch für Pilze, und daher wäre die Entwicklung von Medikamenten, die direkt gegen einzelne Pmt Proteine gerichtet sind, ein attraktives Ziel. Interessanterweise kommen in den bislang sequenzierten Genomen von Säugern generell nur Homologe von Pmt2p und Pmt4p vor (Abbildung 8) (Willer *et al.*, 2003), wodurch sich insbesondere Pmt1p, welches eine eigene Subklasse unter den Pmt-Proteinen bildet, als Ziel für die Entwicklung von Antimykotika anbietet. Aber auch für die anderen beiden Klassen sollte es trotz der Ähnlichkeit der humanen Pomt Proteine zu den Pmt-Proteinen der Pilze möglich sein spezifische Medikamente zu entwickeln, da zwischen den Pmt-Proteinen bzw. Pomts eine relativ große phylogenetische Distanz besteht (Abbildung 8).

Neben dem medizinischen Aspekt könnte für die praxisbezogene Forschung auch die Tatsache von großer Bedeutung sein, dass in den bisher sequenzierten Pflanzen-Genomen bislang keine Homologe der Pmt-Proteine identifiziert werden konnten. Dies macht die Pmt-Proteine zu einem exzellenten Ziel für die Entwicklung von Fungiziden für die Landwirtschaft, die gegen pflanzenpathogene Pilze wie z. B. *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea* oder *Ustilago maydis* eingesetzt werden könnten (Prill, 2004).

6. Zusammenfassung

Die Protein-*O*-Mannosylierung, das spezifische Anhängen von Mannosen an Zielproteine, ist eine der wichtigsten Protein-Modifikationen, die hauptsächlich bei sekretierten und Zellmembran-assoziierten Proteinen von Eukaryoten sowie einigen Bakterienarten vorkommt. Dieser Prozess wird von der hoch konservierten Proteinfamilie der Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert, die aufgrund ihrer Proteinsequenzen in drei Subfamilien unterteilt werden.

Im Genom des humanpathogenen Pilzes *Cryptococcus neoformans* konnten mit *PMT1*, *PMT2* und *PMT4* jeweils ein Mitglied der drei entsprechenden Subfamilien identifiziert werden, während bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* sieben bzw. fünf *PMT*-Gene vorkommen. In dieser Arbeit wurden die *PMT*-Gene von *C. neoformans* einzeln und in Kombinationen disruptiert. Es konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie bei *Schizosaccharomyces pombe* das *PMT2* Gen bei *C. neoformans* essentiell ist, während die *pmt1*- bzw. *pmt4*-Einzelmutanten lebensfähig sind. Die *pmt1 pmt4*-Doppelmutante war außerdem wie in *S. pombe* und *C. albicans* nicht lebensfähig. Sowohl die *pmt1*- als auch die *pmt4*-Einzelmutante wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich veränderte Zellmorphologie und Biogenese von intrazellulären Vesikeln auf. Zusätzlich zeigten beide Mutanten einen Wachstumsdefekt unter hyperosmolaren Bedingungen.

Die Virulenz des pathogenen Pilzes *Cryptococcus neoformans* wird wesentlich durch Oberflächenstrukturen bestimmt, wie z. B. die Polysaccharidkapsel oder das Melanin. Aus diesem Grund ist die Protein-*O*-Glykosylierung bei *C. neoformans* möglicherweise für die Biosynthese, Lokalisierung und Funktion dieser Virulenzfaktoren wichtig. Während die *pmt4*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine dünnere Polysaccharid-Kapsel besaß und einen deutlichen Melanin-Defekt aufwies, konnte für die *pmt1*-Mutante bei keinem der untersuchten Virulenzfaktoren ein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Überraschenderweise zeigten aber sowohl die *pmt4*- als auch die *pmt1*-Mutante in einem Makrophagen-Phagozytose/Tötungstest bzw. in einem Maus-Virulenz-Model eine signifikante Reduktion der Infektivität.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Pmt-katalysierte Protein-*O*-Glykosylierung eine bedeutende Rolle für die Zellmorphologie und Zellintegrität von *C. neoformans* hat. Die Pmt-Proteine beeinflussen direkt oder indirekt, durch die Glykosylierung noch unbekannter Zielproteine, spezifische Virulenzfaktoren und dadurch die Pathogenität von *C. neoformans*.

7. Summary

The protein mannosyltransferases (Pmt's) catalyse the initial step of protein *O*-glycosylation, the addition of mannose to serine or threonine residues of target proteins. Based on protein similarities, this highly conserved protein family can be separated into three subfamilies: the Pmt1 sub-family, the Pmt2 sub-family and the Pmt4 sub-family. In contrast to *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, but similar to other filamentous fungi, three putative members of the *PMT* gene family, *PMT1*, *PMT2*, and *PMT4*, could be identified in the genome of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*, one member of each subfamily. Similar to *Schizosaccharomyces pombe*, *C. neoformans* *PMT2* is an essential gene. Also, the *pmt1* and *pmt4* mutations are synthetically lethal. In contrast, the *pmt1* and *pmt4* single mutants were viable, each exhibiting abnormal cell morphology and altered vacuole formation compared to the wild type. The *pmt1* mutant cells were enlarged and were also more susceptible to osmotic stress (sorbitol) than wild type. The *pmt4* mutant grew poorly on high salt medium, and this strain demonstrated abnormal septum formation and cytokinesis.

Investigations focussed on the virulence factors of *C. neoformans* revealed that the *pmt4* mutant has a thinner capsule compared to the wild type, and that it has lost the ability to produce melanin. Both of these phenotypes are predicted to adversely affect virulence. The *pmt1* mutation did not result in any change of the known inducible virulence factors compared to the wild type. The *pmt1* and *pmt4* mutants demonstrated reduced ability to survive co-incubation with macrophages in cell culture, suggesting reduced virulence. The result of the macrophage assay was confirmed in the murine inhalation model of cryptococcosis in which both *pmt* mutants showed attenuated virulence compared to both the wild type and the reconstituted *PMT* strains.

These findings suggest that *O*-glycosylation initiated by Pmt's plays a crucial role in maintaining cell morphology, and that lack of *O*-glycosylation leads to an altered cell wall composition and cell integrity. The results also suggest that Pmt's control virulence of *C. neoformans* either directly by post-translational modification of virulence-associated proteins or as an indirect effect mediated by the Pmt target proteins.

8. Literaturverzeichnis

- Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. (1987) Subcellular site of synthesis of the *N*-acetylgalactosamine (alpha 1-0) serine (or threonine) linkage in rat liver. *J Biol Chem*, **262**, 4153-4159.
- Akasaka-Manya, K., Manya, H., Nakajima, A., Kawakita, M. und Endo, T. (2006) Physical and functional association of human protein *O*-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem*, **281**, 19339-19345.
- Alspaugh, J.A., Davidson, R.C. und Heitman, J. (2000) Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contrib Microbiol*, **5**, 217-238.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Kato, J., Ninomiya, K. und Vidotto, V. (1994) Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, **128**, 143-150.
- Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J. und Howard, D. (1984) Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.*, **105**, 582-586.
- Bertout, S., Renaud, F., Swinne, D., Mallie, M. und Bastide, J.M. (1999) Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: taxonomy and genetic structure. *J Clin Microbiol*, **37**, 715-720.
- Bhattacharjee, A.K., Bennett, J.E. und Glaudemans, C.P. (1984) Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.*, **6**, 619-624.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Boekhout, T. und van Belkum, A. (1997) Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet*, **32**, 203-208.
- Brandt, M.E., Bragg, S.L. und Pinner, R.W. (1993) Multilocus enzyme typing of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, **31**, 2819-2823.
- Brueske, C.H. (1986) Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, **23**, 631-633.
- Buchanan, K.L. und Murphy, J.W. (1998) What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis*, **4**, 71-83.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, **5**, 376-378.
- Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J., Odds, F.C. und Gow, N.A. (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *chan*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7670-7675.
- Casadevall, A. und Perfect, J.R. (1998) *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington.
- Chang, Y.C., Cherniak, R., Kozel, T.R., Granger, D.L., Morris, L.C., Weinhold, L.C. und Kwon-Chung, K.J. (1997) Structure and biological activities of acapsular *Cryptococcus neoformans* 602 complemented with the *CAP64* gene. *Infect Immun*, **65**, 1584-1592.
- Chang, Y.C. und Kwon-Chung, K.J. (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*, **14**, 4912-4919.
- Chang, Y.C. und Kwon-Chung, K.J. (1998) Isolation of the third capsule-associated gene, *CAP60*, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, **66**, 2230-2236.
- Chang, Y.C. und Kwon-Chung, K.J. (1999) Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, **181**, 5636-5643.

- Chang, Y.C., Penoyer, L.A. und Kwon-Chung, K.J. (1996) The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, *CAP64*, is essential for virulence. *Infect Immun*, **64**, 1977-1983.
- Chen, L.C., Blank, E.S. und Casadevall, A. (1996) Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **3**, 570-574.
- Chen, S.C., Wright, L.C., Santangelo, R.T., Muller, M., Moran, V.R., Kuchel, P.W. und Sorrell, T.C. (1997) Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, **65**, 405-411.
- Cherniak, R. und Sundstrom, J.B. (1994) Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, **62**, 1507-1512.
- Chu, G., Hayakawa, H. und Berg, P. (1987) Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res*, **15**, 1311-1326.
- Costigan, C., Gehrung, S. und Snyder, M. (1992) A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1162-1178.
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A. und Perfect, J.R. (2001) Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **39**, 166-175.
- Cox, G.M., Mukherjee, J., Cole, G.T., Casadevall, A. und Perfect, J.R. (2000) Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*, **68**, 443-448.
- Cruz, M.C., Sia, R.A., Olson, M., Cox, G.M. und Heitman, J. (2000) Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, **68**, 982-985.
- Davidson, R.C., Moore, T.D., Odom, A.R. und Heitman, J. (2000) Characterization of the MFalpha pheromone of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **38**, 1017-1026.
- Doering, T.L. (2000) How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol*, **8**, 547-553.
- Dromer, F., Mathoulin, S., Dupont, B. und Laporte, A. (1996) Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis*, **23**, 82-90.
- Ecker, M., Mersa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. und Tanner, W. (2003) O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep*, **4**, 628-632.
- Edman, J.C. (1992) Isolation of telomere-like sequences from *Cryptococcus neoformans* and their use in high-efficiency transformation. *Mol Cell Biol*, **12**, 2777-2783.
- Endo, T. (2004) Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J*, **21**, 3-7.
- Ernst, J.F. und Prill, S.K. (2001) O-glycosylation. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 67-74.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Franzot, S.P., Fries, B.C., Cleare, W. und Casadevall, A. (1998) Genetic relationship between *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* strains of serotypes A and D. *J Clin Microbiol*, **36**, 2200-2204.
- Fraser, J.A., Diezmann, S., Subaran, R.L., Allen, A., Lengeler, K.B., Dietrich, F.S. und Heitman, J. (2004) Convergent evolution of chromosomal sex-determining regions in the animal and fungal kingdoms. *PLoS Biol*, **2**, e384.
- Fraser, J.A., Subaran, R.L., Nichols, C.B. und Heitman, J. (2003) Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*:

- implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryot Cell*, **2**, 1036-1045.
- Freeze, H.H. und Westphal, V. (2001) Balancing *N*-linked glycosylation to avoid disease. *Biochimie*, **83**, 791-799.
- Gentzsch, M., Immervoll, T. und Tanner, W. (1995) Protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein *O*-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Lett*, **377**, 128-130.
- Gentzsch, M. und Tanner, W. (1996) The *PMT* gene family: protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *Embo J*, **15**, 5752-5759.
- Gentzsch, M. und Tanner, W. (1997) Protein-*O*-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology*, **7**, 481-486.
- Gerik, K.J., Donlin, M.J., Soto, C.E., Banks, A.M., Banks, I.R., Maligie, M.A., Selitrennikoff, C.P. und Lodge, J.K. (2005) Cell wall integrity is dependent on the *PKCI* signal transduction pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **58**, 393-408.
- Girrbach, V. und Strahl, S. (2003) Members of the evolutionarily conserved *PMT* family of protein *O*-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem*, **278**, 12554-12562.
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. und Strahl-Bolsinger, S. (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem*, **275**, 19288-19296.
- Goldman, D.L., Lee, S.C., Mednick, A.J., Montella, L. und Casadevall, A. (2000) Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. *Infect Immun*, **68**, 832-838.
- Golub, E.I. (1988) 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1641.
- Grahl, N. (2006) Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Protein-*O*-Mannosyltransferasen in *Cryptococcus neoformans*. *Diplomarbeit*.
- Gueho, E., Improvisi, L., Christen, R. und de Hoog, G.S. (1993) Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **63**, 175-189.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Clover, D.M. (ed.), *DNA cloning. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Vol. I, pp. 109-114.
- Hanisch, F.G. (2001) *O*-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*, **382**, 143-149.
- Haselbeck, A. und Tanner, W. (1983) *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, **158**, 335-338.
- Hayette, M.P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D.W. und Poulain, D. (1992) Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* *O*-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol*, **30**, 411-417.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P. und Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **32**, 671-680.
- Heitman, J., Allen, B., Alspaugh, J.A. und Kwon-Chung, K.J. (1999) On the origins of congeneric *MATalpha* and *MATa* strains of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*, **28**, 1-5.
- Herscovics, A. und Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *Faseb J*, **7**, 540-550.

- Heung, L.J., Kaiser, A.E., Luberto, C. und Del Poeta, M. (2005) The role and mechanism of diacylglycerol-protein kinase C1 signaling in melanogenesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*, **280**, 28547-28555.
- Hull, C.M. und Heitman, J. (2002) Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet*, **36**, 557-615.
- Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T. und Nishihara, S. (2004) The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J Biol Chem*, **279**, 42638-42647.
- Jacobson, E.S., Tingler, M.J. und Quynn, P.L. (1989) Effect of hypertonic solutes upon the polysaccharide capsule in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*, **32**, 14-23.
- Janbon, G. (2004) *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res*, **4**, 765-771.
- Jurado, L.A., Coloma, A. und Cruces, J. (1999) Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein *O*-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics*, **58**, 171-180.
- Klutts, J.S., Yoneda, A., Reilly, M.C., Bose, I. und Doering, T.L. (2006) Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. *FEMS Yeast Res*, **6**, 499-512.
- Knoke, M. und Schwesinger, G. (1994) One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. *Mycoses*, **37**, 229-233.
- Kozel, T.R. und Gotschlich, E.C. (1982) The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J. Immunol.*, **129**, 1675-1680.
- Kozel, T.R., Pfrommer, G.S., Guerlain, A.S., Highison, B.A. und Highison, G.J. (1988) Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis*, **10 Suppl 2**, S436-439.
- Kwon-Chung, K.J. (1975) A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, **67**, 1197-1200.
- Kwon-Chung, K.J. (1976) Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, **68**, 821-833.
- Kwon-Chung, K.J. (1980) Nuclear genotypes of spore chains in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). *Mycologia*, **72**, 418-422.
- Kwon-Chung, K.J. und Bennett, J.E. (1978) Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol*, **108**, 337-340.
- Kwon-Chung, K.J., Wickes, B.L., Stockman, L., Roberts, G.D., Ellis, D. und Howard, D.H. (1992) Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect Immun*, **60**, 1869-1874.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-132.
- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. und Ghannoum, M.A. (1998) Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26078-26086.
- Lengeler, K.B., Cox, G.M. und Heitman, J. (2001) Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect Immun*, **69**, 115-122.
- Lengeler, K.B., Fox, D.S., Fraser, J.A., Allen, A., Forrester, K., Dietrich, F.S. und Heitman, J. (2002) Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes. *Eukaryot Cell*, **1**, 704-718.

- Lengeler, K.B. und Heitman, J. (2002) *Cryptococcus neoformans as a Model Fungal Pathogen*. CRC Press, New York, N.Y.
- Levitz, S.M. und Specht, C.A. (2006) The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Res*, **6**, 513-524.
- Littman, M.L. (1958) Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **20**, 623-648.
- Lommel, M., Bagnat, M. und Strahl, S. (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol*, **24**, 46-57.
- Lyalin, D., Koles, K., Roosendaal, S.D., Repnikova, E., Van Wechel, L. und Panin, V.M. (2006) The twisted gene encodes Drosophila protein O-mannosyltransferase 2 and genetically interacts with the rotated abdomen gene encoding Drosophila protein O-mannosyltransferase 1. *Genetics*, **172**, 343-353.
- Mahne, M., Tauch, A., Puhler, A. und Kalinowski, J. (2006) The *Corynebacterium glutamicum* gene pmt encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-O-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett*, **259**, 226-233.
- Manya, H., Chiba, A., Margolis, R.U. und Endo, T. (2006) Molecular cloning and characterization of rat Pomt1 and Pomt2. *Glycobiology*, **16**, 863-873.
- Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R.U. und Endo, T. (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 500-505.
- Martin-Cuadrado, A.B., Duenas, E., Sipiczki, M., Vazquez de Aldana, C.R. und del Rey, F. (2003) The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **116**, 1689-1698.
- Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z. und Vilgalys, R. (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*, **31**, 2274-2280.
- Mitchell, T.G. und Perfect, J.R. (1995) Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 515-548.
- Moore, T.D. und Edman, J.C. (1993) The alpha-mating type locus of *Cryptococcus neoformans* contains a peptide pheromone gene. *Mol Cell Biol*, **13**, 1962-1970.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Neilson, J.B., Ivey, M.H. und Bulmer, G.S. (1978) *Cryptococcus neoformans*: Pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect. Immun.*, **20**, 262-266.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J*, **1**, 841-845.
- Nielsen, K., Cox, G.M., Litvintseva, A.P., Mylonakis, E., Malliaris, S.D., Benjamin, D.K., Jr., Giles, S.S., Mitchell, T.G., Casadevall, A., Perfect, J.R. und Heitman, J. (2005) *Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. *Infect Immun*, **73**, 4922-4933.
- Nishimura, H., Yamashita, S., Zeng, Z., Walz, D.A. und Iwanaga, S. (1992) Evidence for the existence of O-linked sugar chains consisting of glucose and xylose in bovine thrombospondin. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 460-464.
- Oka, T., Hamaguchi, T., Sameshima, Y., Goto, M. und Furukawa, K. (2004) Molecular characterization of protein O-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, **150**, 1973-1982.

- Oka, T., Sameshima, Y., Koga, T., Kim, H., Goto, M. und Furukawa, K. (2005) Protein *O*-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in *O*-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology*, **151**, 3657-3667.
- Olson, G.M., Fox, D.S., Wang, P., Alspaugh, J.A. und Buchanan, K.L. (2007) Role of protein *O*-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, **6**, 222-234.
- Orlean, P. (1990) Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, *O* mannosylation, and *N* glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 5796-5805.
- Orlean, P., Albright, C. und Robbins, P.W. (1988) Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J Biol Chem*, **263**, 17499-17507.
- Perfect, J.R., Ketabchi, N., Cox, G.M., Ingram, C.W. und Beiser, C.L. (1993) Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol*, **31**, 3305-3309.
- Perfect, J.R., Magee, B.B. und Magee, P.T. (1989) Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infect Immun*, **57**, 2624-2627.
- Polacheck, I. (1991) The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence. *Zentralbl Bakteriol*, **276**, 120-123.
- Polacheck, I. und Kwon-Chung, K.J. (1988) Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Gen Microbiol*, **134**, 1037-1041.
- Prill, S.K. (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. *Dissertation*.
- Prill, S.K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppel, K. und Ernst, J.F. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol*, **55**, 546-560.
- Proszynski, T.J., Simons, K. und Bagnat, M. (2004) *O*-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell*, **15**, 1533-1543.
- Raper, J.R. (1966) *Genetics of sexuality in higher fungi* Ronald Press, New York, N.Y.
- Reese, A.J., Yoneda, A., Breger, J.A., Beauvais, A., Liu, H., Griffith, C.L., Bose, I., Kim, M.J., Skau, C., Yang, S., Sefko, J.A., Osumi, M., Latge, J.P., Mylonakis, E. und Doering, T.L. (2007) Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol Microbiol*, **63**, 1385-1398.
- Reiss, E., White, E.H., Cherniak, R. und Dix, J.E. (1986) Ultrastructure of acapsular mutant *Cryptococcus neoformans cap 67* and monosaccharide composition of cell extracts. *Mycopathologia*, **93**, 45-54.
- Rosas, A.L. und Casadevall, A. (1997) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett*, **153**, 265-272.
- Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S.K., Giasson, L. und Ernst, J.F. (2005) Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun*, **73**, 4571-4580.
- Salas, S.D., Bennett, J.E., Kwon-Chung, K.J., Perfect, J.R. und Williamson, P.R. (1996) Effect of the laccase gene *CNLAC1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*, **184**, 377-386.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sia, R.A., Lengeler, K.B. und Heitman, J. (2000) Diploid strains of the pathogenic basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are thermally dimorphic. *Fungal Genet Biol*, **29**, 153-163.
- Sorrell, T.C. (2001) *Cryptococcus neoformans variety gattii*. *Med Mycol*, **39**, 155-168.

- Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12**, 43R-56R.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta*, **1426**, 297-307.
- Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A. (1999) Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem*, **274**, 9068-9075.
- Tanner, W. und Lehle, L. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta*, **906**, 81-99.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J.F. (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **273**, 20837-20846.
- Toffaletti, D.L. und Perfect, J.R. (1994) Biolistic DNA delivery for *Cryptococcus neoformans* transformation. In Maresca, B. and Kobayashi, G.S. (eds.), *Molecular Biology of Pathogenic Fungal: A Laboratory Manual*. Telos Press, New York, pp. 303-308.
- Toffaletti, D.L., Rude, T.H., Johnston, S.A., Durack, D.T. und Perfect, J.R. (1993) Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol*, **175**, 1405-1411.
- Torres-Guererro, H. und Edman, J.C. (1994) Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol*, **32**, 303-313.
- Tscharke, R.L., Lazera, M., Chang, Y.C., Wickes, B.L. und Kwon-Chung, K.J. (2003) Haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* is not mating type alpha-specific. *Fungal Genet Biol*, **39**, 230-237.
- VanderVen, B.C., Harder, J.D., Crick, D.C. und Belisle, J.T. (2005) Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science*, **309**, 941-943.
- Vartivarian, S.E., Anaissie, E.J., Cowart, R.E., Sprigg, H.A., Tingler, M.J. und Jacobson, E.S. (1993) Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis*, **167**, 186-190.
- Vida, T.A. und Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779-792.
- Wang, P., Perfect, J.R. und Heitman, J. (2000) The G-protein beta subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Cell Biol*, **20**, 352-362.
- Wang, Y. und Casadevall, A. (1994) Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 3864-3866.
- Wang, Y.X., Zhao, H., Harding, T.M., Gomes de Mesquita, D.S., Woldringh, C.L., Klionsky, D.J., Munn, A.L. und Weisman, L.S. (1996) Multiple classes of yeast mutants are defective in vacuole partitioning yet target vacuole proteins correctly. *Mol Biol Cell*, **7**, 1375-1389.
- Wickes, B.L., Edman, U. und Edman, J.C. (1997) The *Cryptococcus neoformans* STE12alpha gene: a putative *Saccharomyces cerevisiae* STE12 homologue that is mating type specific. *Mol Microbiol*, **26**, 951-960.
- Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U. und Edman, J.C. (1996) Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the alpha-mating type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7327-7331.
- Wickes, B.L., Moore, T.D. und Kwon-Chung, K.J. (1994) Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, **140 (Pt 3)**, 543-550.
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S. (2002) Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family

- specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology*, **12**, 771-783.
- Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. und Strahl, S. (2005) Protein *O*-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol*, **57**, 156-170.
- Willer, T., Prados, B., Falcon-Perez, J.M., Renner-Muller, I., Przemeck, G.K., Lommel, M., Coloma, A., Valero, M.C., de Angelis, M.H., Tanner, W., Wolf, E., Strahl, S. und Cruces, J. (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14126-14131.
- Willer, T., Valero, M.C., Tanner, W., Cruces, J. und Strahl, S. (2003) *O*-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 621-630.
- Williamson, P.R. (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol*, **176**, 656-664.
- Williamson, P.R. (1997) Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci*, **2**, e99-e107.
- Wilson, I.B., Gavel, Y. und von Heijne, G. (1991) Amino acid distributions around *O*-linked glycosylation sites. *Biochem J*, **275 (Pt 2)**, 529-534.
- Wolfe, K.H. und Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **387**, 708-713.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-3478.
- Xu, J., Vilgalys, R. und Mitchell, T.G. (2000) Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol*, **9**, 1471-1481.
- Zakrzewska, A., Migdalski, A., Saloheimo, M., Penttila, M.E., Palamarczyk, G. und Kruszevska, J.S. (2003) cDNA encoding protein *O*-mannosyltransferase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*; functional equivalence to *Saccharomyces cerevisiae* *PMT2*. *Curr Genet*, **43**, 11-16.
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. und Williamson, P.R. (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun*, **69**, 5589-5596.

9. Anhang

9.1. Daten zu Wachstumsanalysen

Experimentelle Rohdaten zu Abbildung 18, Abbildung 25 und Abbildung 28:

min	YPD			YPD + 1 M NaCl			YPD + 0,01 % SDS		
	JEC21	1D Ura	4D Ura	JEC21	1D Ura	4D Ura	JEC21	1D Ura	4D Ura
0	0,076	0,135	0,057	0,078	0,141	0,078	0,054	0,110	0,032
60	0,109	0,110	0,087	0,085	0,114	0,074	0,116	0,119	0,041
120	0,151	0,160	0,126	0,107	0,132	0,097	0,138	0,141	0,052
180	0,229	0,237	0,184	0,110	0,119	0,091	0,192	0,202	0,086
240	0,301	0,319	0,249	0,127	0,132	0,098	0,209	0,216	0,071
300	0,436	0,433	0,347	0,149	0,145	0,096	0,251	0,259	0,084
360	0,561	0,558	0,451	0,176	0,166	0,102	0,304	0,304	0,082
420	0,701	0,688	0,597	0,226	0,197	0,111	0,371	0,358	0,095
480	0,808	0,786	0,706	0,284	0,230	0,113	0,451	0,415	0,111
540	0,902	0,890	0,847	0,315	0,271	0,112	0,542	0,461	0,124
600	0,989	0,976	0,944	0,403	0,317	0,120	0,621	0,491	0,136
660	1,082	1,074	1,043	0,494	0,374	0,125	0,700	0,506	0,155
720	1,148	1,136	1,123	0,558	0,423	0,134	0,727	0,534	0,170
780	1,212	1,200	1,183	0,659	0,483	0,135	0,762	0,563	0,182
840	1,252	1,246	1,226	0,725	0,526	0,139	0,797	0,590	0,200
900	1,290	1,291	1,280	0,787	0,584	0,143	0,844	0,619	0,219
1440	1,507	1,462	1,543	1,150	1,101	0,146	1,118	0,927	0,567
1500	1,512	1,481	1,574	1,169	1,149	0,152	1,141	0,968	0,625

9.2. Daten zur *pmt1 pmt4*-Doppeldisruption

Experimentelle Rohdaten zu Abbildung 15C:

Auswertung der Sporen bzgl. des Paarungstyps, *PMT* Gens und Auxotrophiemarkers.

Spore	<i>MATα</i>	<i>MATα</i>	<i>PMT1</i>	<i>PMT4</i>	<i>ADE2</i>	<i>URA5</i>
1	-	+	+	-	+	-
2	-	+	+	-	+	-
3	+	-	-	+	-	+
4	-	+	+	+	-	-
5	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	-	+	-
7	-	+	-	+	-	+
8	-	+	+	+	-	-
9	-	+	-	+	-	+
10	+	-	+	+	-	-

11	+	-	-	+	-	+
12	-	+	+	-	+	-
13	-	+	+	-	+	-
14	+	-	+	-	+	-
15	+	-	-	+	-	+

9.3. Daten zum Melanintest

Experimentelle Rohdaten zu Abbildung 34C:

Stamm	OD ₄₈₀		Mittelwert	STABW
	1	2		
H99	0,298	0,312	0,305	0,010
<i>pmt1A</i>	0,238	0,264	0,251	0,018
<i>pmt4A</i>	0,092	0,089	0,091	0,002
<i>pmt4A+PMT4A</i>	0,318	0,301	0,310	0,012

9.4. Daten zum Makrophagen-Phagozytose/Tötungstest

Experimentelle Rohdaten zu Abbildung 35:

Stamm	aktivierte Makrophagen								Mittelwert	STABW
	1	2	3	4	5	6	7	8		
H99	133	74	138	93	137	(270	104	114	113	25
<i>pmt1A</i>	12	11	9	14	(50	14	18	36	16	9
<i>pmt4A</i>	6	8	2	2	2	1	2	3	3	2

9.5. Daten zum Maus Experiment

Experimentelle Rohdaten zu Abbildung 36:

Dargestellt ist die relative Anzahl überlebender Mäuse nach der Infektion.

Tag	H99	<i>pmt1</i>	<i>pmt1+PMT1</i>	<i>pmt4</i>	<i>pmt4+PMT4</i>
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100
8	100	100	100	100	100
9	100	100	100	100	100
10	100	100	100	100	100
11	100	100	100	100	100

12	100	100	100	100	100
13	100	100	100	100	100
14	100	100	100	100	100
15	90	100	100	100	100
16	70	100	80	100	90
17	40	100	30	100	60
18	10	100	0	100	30
19	0	100	0	100	30
20	0	100	0	100	20
21	0	100	0	100	0
22	0	100	0	100	0
23	0	100	0	100	0
24	0	100	0	100	0
25	0	100	0	100	0
26	0	100	0	100	0
27	0	100	0	100	0
28	0	100	0	100	0
29	0	100	0	100	0
30	0	100	0	100	0
31	0	100	0	100	0
32	0	100	0	100	0
33	0	100	0	100	0
34	0	100	0	90	0
35	0	100	0	90	0
36	0	100	0	70	0
37	0	100	0	60	0
38	0	100	0	60	0
39	0	100	0	50	0
40	0	100	0	40	0
41	0	100	0	40	0
42	0	100	0	20	0
43	0	100	0	0	0

9.6. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DER LEBENSZYKLUS VON *C. NEOFORMANS*

ABBILDUNG 2: KAPSEL

ABBILDUNG 3: MELANINPRODUKTION

ABBILDUNG 4: PROTEIN-O-GLYKOSYLIERUNG IN *S. CEREVISIAE* UND *C. ALBICANS*

ABBILDUNG 5: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER PMT-PROTEINE

ABBILDUNG 6: AUFBAU DER MIKROPARTIKELKANONE

ABBILDUNG 7: SEQUENZVERGLEICH DER *C. NEOFORMANS* PMT-PROTEINE UND PMT1P AUS *S. CEREVISIAE*

ABBILDUNG 8: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER PMT-PROTEINFAMILIE

ABBILDUNG 9: GENSTRUKTUR DER *PMT*-GENE

ABBILDUNG 10: TOPOLOGIE EINES PMT PROTEINS

ABBILDUNG 11: HERSTELLUNG DER INSERTIONSMUTAGENESE-KASSETTEN AM BEISPIEL VON *PMT4*

ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES *PMT1* LOCUS AUF DEM SEROTYP A *C. NEOFORMANS* GENOM

ABBILDUNG 13: SOUTHERNBLOT ANALYSE VERSCHIEDENER *C. NEOFORMANS* STÄMME

ABBILDUNG 14: EXEMPLARISCHES KLONIERUNGSSCHEMA FÜR PLASMIDE ZUR REKONSTITUIERUNG DER *PMT*-MUTANTEN

ABBILDUNG 15: EINE *PMT1 PMT4* DOPPELDELETION IST LETAL

ABBILDUNG 16: TEMPERATURABHÄNGIGES WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN DES SEROTYPS A

ABBILDUNG 17: TEMPERATURABHÄNGIGES WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN DES SEROTYPS D

ABBILDUNG 18: WACHSTUMSKURVE DER *PMT*-MUTANTEN DES SEROTYPS D

ABBILDUNG 19: MORPHOLOGIE DER *PMT*-DISRUPTIONSSTÄMME

ABBILDUNG 20: ULTRASCHALL

ABBILDUNG 21: CALCOFLUOR WHITE-FÄRBUNG DES WILDSTYPS H99 UND DER *PMT*-MUTANTEN

ABBILDUNG 22: VAKUOLEN-FÄRBUNG MIT FM4-64 DES WILDSTYPS H99 UND DER *PMT*-MUTANTEN

ABBILDUNG 23: DAPI-FÄRBUNG DES WILDSTYPS H99 UND DER *PMT*-MUTANTEN

ABBILDUNG 24: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTE AUF SDS-HALTIGEN AGARPLATTEN

ABBILDUNG 25: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN IN 0,01 % SDS-HALTIGEM YPD-FLÜSSIGMEDIUM

ABBILDUNG 26: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN DES SEROTYPS A AUF SALZHALTIGEN AGARPLATTEN

ABBILDUNG 27: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN DES SEROTYPS D AUF SALZHALTIGEN AGARPLATTEN

ABBILDUNG 28: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN IN YPD-FLÜSSIGMEDIUM MIT 1 M NaCl

ABBILDUNG 29: WACHSTUM DER *PMT*-MUTANTEN BEIDER SEROTYPEN AUF AGARPLATTEN MIT SORBITOL

ABBILDUNG 30: KAPSELINDUKTION

ABBILDUNG 31: UREASE PRODUKTION

ABBILDUNG 32: PHOSPHOLIPASE B PRODUKTION

ABBILDUNG 33: UNI- UND BILATERALE PAARUNG DER SEROTYP D *PMT*-MUTANTEN

ABBILDUNG 34: ANALYSE DER MELANIN PRODUKTION IN VERSCHIEDENEN MEDIEN

ABBILDUNG 35: MAKROPHAGEN PHAGOZYTOSE/TÖTUNGSTEST

ABBILDUNG 36: DIE *PMT*-MUTANTEN IM MURINEN INHALATIONS-MODEL

ABBILDUNG 37: PKC1 WEG IN *S. CEREVISIAE* UND *C. NEOFORMANS*

ABBILDUNG 38: ANGENOMMENER MELANIN SYNTHESE WEG IN *C. NEOFORMANS*

9.7. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: RESTRIKTIONSENZYME MIT ERKENNUNGSSEQUENZ

TABELLE 2: *ESCHERICHIA COLI*-STÄMME

TABELLE 3: *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* SEROTYP A

TABELLE 4: *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* SEROTYP D

TABELLE 5: TESTSUBSTANZEN UND IHRE KONZENTRATIONEN

TABELLE 6: PLASMIDE

TABELLE 7: OLIGONUKLEOTIDE ZUR HERSTELLUNG UND ÜBERPRÜFUNG VON PLASMIDEN SOWIE SOUTHERN BLOT SONDEN

TABELLE 8: STANDARD PCR-ANSATZ FÜR DIE TAQ POLYMERASE

TABELLE 9: STANDARD PCR-ANSATZ FÜR DIE PHUSION DNA POLYMERASE

TABELLE 10: PCR-BEDINGUNGEN FÜR DIE TAQ POLYMERASE

TABELLE 11: PCR-BEDINGUNGEN FÜR DIE PHUSION DNA POLYMERASE

TABELLE 12: SEQUENZIDENTITÄT IN PROZENT DER PROTEINMANNOsylTRANSFERASEN AUS *C. NEOFORMANS* UND *S. CEREVISIAE*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst und Dr. Klaus B. Lengeler für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung sowie ihrer ständigen Diskussionsbereitschaft. Stets standen sie mir bei Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite und inspirierten mich mit ihrem Ideenreichtum zu neuen Ansätzen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. R. Freudl für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich bei Britta Busse bedanken, die mich im Labor tatkräftig unterstützt hat, von Beginn an, durch ihre offene Art, ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen hat und unsere „Männerwirtschaft“ erfolgreich organisierte. Trotz des Verlusts, den er uns beschert hat, kann ich Dennis alias Hubschi nicht böse sein, dass er uns seine Mama, durch sein plötzliches Auftreten, „entführt“ hat. Auch bei Brittas Nachfolgerin, Agnes Kowalski möchte ich mich für die Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gebührt Dr. Klaus Lengeler. Vielen Dank dafür, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, unter deiner Regie meine Promotion zu absolvieren. Vielen Dank auch dafür, dass du mir wirklich jederzeit geholfen, und dir sogar die Nächte bei der Korrektur dieser Arbeit um die Ohren geschlagen hast. Ich weiß gar nicht, wie ich dir dafür danken soll, dass ich durch dich Nora kennengelernt habe und die Möglichkeit hatte, einen Teil meiner Arbeit an der Duke University durchführen zu können, an der ich viele Freunde gefunden habe und auch eine Anstellung sowohl für mich als auch Nora organisieren konnte.

Bei Nora Grahl möchte ich mich dafür bedanken, dass du mir so verständnisvoll bei der Anfertigung diese Arbeit, sowohl im Labor, als auch beim Zusammenschreiben zur Seite gestanden hast. Schätzelein, weisse bescheid?! Danke dafür, dass du immer für mich da bist.

Ich möchte mich auch bei Fabien Cottier, Dr. Carsten Amuel, Inga Schmidt, Nico Bernsmeier, Dr. Leni Setiadi, Dr. Sven Kluge, Pilar Dominguez Cantero, Dr. Christian Lengsfeld, Catrin Stichernoth, Michael Bußman, Dr. Chritine Noffz, Dagmar Kurtz, Eva Szafranski, Jessica Hilbig, Steve Misselwitz, Theresia Walke, Claudia Rymkuß, den Kellerkindern, die mich schon während meiner Diplomarbeit ertragen haben, Katja Mölleken und Eleni Georgoudis und allen die ich vergessen habe persönlich aufzuzählen, bedanken, für die fachliche Unterstützung, die sehr unterhaltsame Zeit sowohl im Labor als auch in der

Mittagsrunde. Ich werde auch die Grillabende, die Badmintonrunde, die Altstadtbesuche und die vielen weiteren privaten Unternehmungen vermissen.

Ein Dankeschön gilt auch der technischen Abteilung, besonders Anna Nagy, ohne die kein reibungsloses Arbeiten im Institut möglich ist.

Special thanks goes to Dr. James A. Alspaugh and his team I had the honour to work with. Andy, I really appreciate that I could work in your lab and that you made it possible that I could finish my dissertation. I want to thank also Dr. Connie Nichols, Dr. Michael Price, Kari Cramer, Merdith Clements and Daniel Wilson for the support in the lab. Furthermore I want to thank John Perfect, Dena Toffaletti, Wiley Schell, Gary Cox, Zack Perfect and Christina Henn who introduced me into the American life and made my stay at Duke University unforgettable. I have to thank Robb Cramer that he became a good friend and that he offered me and Nora a position in his new lab so that we can stay together and let our dreams come true.

Ein ganz großer Dank gilt meiner Familie. Besonders danken möchte ich meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben, Verständnis beim Anfertigen dieser Arbeit entgegengebracht haben und mir immer zur Seite stehen. Vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Willger'. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

(Sven Willger)