

Detektion und Charakterisierung von Zellwandproteinen in *Candida albicans*

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Ekkehard Hiller

aus Radolfzell

Hauptberichter: Prof. Dr. H. Brunner

Mitberichter: Prof. Dr. P. Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2008

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2008

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
BILDVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN	VII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Candida albicans</i>	1
1.1.1 Die Zellwand	3
1.1.2 Bestandteile der Zellwand	5
1.1.2.1 Chitin	5
1.1.2.2 Glucan	5
1.1.2.3 Proteine	5
1.1.3 Identifikation der Zellwandproteine	6
1.1.3.1 Massenspektrometrie	7
1.1.4 Funktion der Zellwandproteine	9
1.1.4.1 <i>SUN41</i>	9
1.2 Zielsetzung	11
2 MATERIAL & METHODEN	12
2.1 Stämme und Wachstumsbedingungen	12
2.2 Zellwandpräparation	12
2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	13
2.4 Proteinfärbung	13
2.4.1 Silberfärbung	13
2.4.2 Coomassiefärbung	14

2.5	Verdau der Zellwandproteine	14
2.5.1	Trypsin	14
2.5.2	Bromcyan	14
2.5.3	Bromcyan + Trypsin	15
2.5.4	Glu-C	15
2.5.5	Quantazyme + Trypsin	15
2.6	Markierung der Zellwandproteine	15
2.6.1	Biotinylierung	15
2.6.2	Aufreinigung biotinylierter Peptide	16
2.7	Massenspektrometrische Protein Analyse	16
2.7.1	MALDI-TOF MS	16
2.7.2	nano-LC-ESI-MS/MS	17
2.7.3	LC-ESI-MS/MS	17
2.7.4	Analyse der Massenspektrometrischen Daten	18
2.8	Isolation und Identifikation sekretierter Proteine	18
2.9	Deletion von <i>SUN41</i> und Konstruktion der mutierten Stämme	19
2.10	Isolation der chromosomalen DNA und Southern Hybridisierung	20
2.11	Bestimmung der Wachstumsrate	20
2.12	Mikroskopie	20
2.12.1	Lichtmikroskopie	20
2.12.2	Rasterelektronenmikroskopie	20
2.12.3	Transmissionselektronenmikroskopie	21
2.13	Bestimmung der Zell-Größe	21
2.14	Plattentests	22
2.15	Calcofluor-Färbung	22
2.16	Kongorot in Flüssig-Kulturen	22
2.17	Zellwandstabilität	22
2.18	Polysaccharidbestimmung	23
2.19	Waschtest	24

2.20	Adhäsions Assay	24
2.21	Zellkultur	24
2.22	Biofilm-Bildung	24
2.23	XTT Reduktions Assay	25
2.24	Invasionstest	25
2.25	Virulenztest	26
2.26	Isolation der Gesamt-RNS	26
2.27	Real-Time RT PCR	27
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Zellwandproteine	29
3.1.1	Optimierung des proteolytischen Verdaus	29
3.1.2	Zellwandpräparation	30
3.1.3	Feinstruktur der isolierten Zellwände	31
3.1.4	Proteolytische Degradation	32
3.1.5	Größe der Peptide	33
3.1.6	Identifikationen durch MS/MS	35
3.1.6.1	Blastosporen	36
3.1.6.2	Hyphen	39
3.1.7	Effizienz der unterschiedlichen Degradationsverfahren	41
3.1.8	Sequenzabdeckung der identifizierten Proteine	42
3.1.9	Markierung der Zellwandproteine	44
3.1.10	Korrelation von Proteom und Transkriptom	45
3.2	Sekretierte Proteine	47
3.3	SUN41	51
3.3.1	Deletion von <i>SUN41</i>	51
3.3.2	Phänotypische Analyse von <i>sun41Δ</i> Zellen	53
3.3.2.1	<i>SUN41</i> Transkription	53
3.3.2.2	Sekretierte Proteine in <i>sun41Δ</i>	54
3.3.2.3	Verdopplungsrate	55
3.3.2.4	Phänotyp der <i>sun41Δ</i> Blastosporen	56
3.3.2.5	Zellgröße	58

3.3.2.6	Beteiligung an der Zellwand-Biogenese	59
3.3.2.7	Polysaccharidgehalt in der Zellwand	61
3.3.2.8	Hyphenbildung	62
3.3.2.9	Regulation von Genen der Zellwand-Biogenese	64
3.3.2.10	Adhäsion auf Agarplatten	66
3.3.2.11	<i>In vitro</i> Modell der Adhäsion auf Geweben	68
3.3.2.12	Bildung eines Biofilms	69
3.3.2.13	Invasionsassay	72
3.3.2.14	Virulenztest in der Maus	73
4	DISKUSSION	75
4.1	Zellwandproteine	75
4.1.1	Identifikation der Zellwandproteine	76
4.1.2	Unterschiedliche Zusammensetzung des Zellwand-Proteoms in Blastosporen und Hyphen	76
4.1.3	Sekretierte Proteine	80
4.2	SUN41	81
4.2.1	Beteiligung von Sun41p an der Zellwandbiogenese	82
4.2.2	Sun41p beeinflusst die Bildung von Hyphen	84
4.2.3	Sun41p beeinflusst die Adhäsion	86
4.2.4	Sun41p wirkt bei der Bildung eines Biofilms mit	86
4.2.5	Sekretion von Sun41p ins Medium	87
4.2.6	Sun41p ist ein Virulenzfaktor	88
5	LITERATURVERZEICHNIS	91
	DANKSAGUNG	98
	LEBENS LAUF	99
	PUBLIKATIONEN	100
	ERKLÄRUNG	101

Bildverzeichnis

Bild 5.1:	Strukturelle und schematische Darstellung der <i>C. albicans</i> Zellwand-Architektur	4
Bild 5.2:	Schematische Darstellung des proteolytischen Verdau kovalent gebundener Zellwandproteine am Beispiel der GPI-Proteine	7
Bild 5.3:	Schematischer Aufbau der Peptidbindung	8
Bild 8.1:	REM-Aufnahme isolierter Zellwände	31
Bild 8.2:	Aktivität der Protease in Anwesenheit der isolierten Zellwand	32
Bild 8.3:	Durch Trypsin aus der Zellwand freigesetzte Peptide	33
Bild 8.4:	MALDI-TOF Massenspektren der von Zellwandproteinen freigesetzten Peptide	34
Bild 8.5:	Sequenzieller Verdau durch CNBr und Trypsin	35
Bild 8.6:	Sequenzanalyse identifizierter Proteine	43
Bild 8.7:	CID-Fragmentmuster eines biotinylierten Peptides	45
Bild 8.8:	Transkriptmenge identifizierter Proteine im transkriptomweiten Vergleich	47
Bild 8.9:	Massenspektrometrische Analyse der sekretierten Proteine	48
Bild 8.10:	Southern Blot Analyse zur Verifizierung der <i>SUN41</i> Deletion (A) und der Rekonstitution (B)	52
Bild 8.11:	<i>SUN41</i> Transkription	54
Bild 8.12:	Massenspektrometrischer Vergleich der sekretierten Proteine aus Wildtyp und <i>sun41Δ</i>	55
Bild 8.13:	Verdopplungsrate von <i>C. albicans</i> Wildtyp und <i>sun41Δ</i> Mutante in YPD	56
Bild 8.14:	Mikroskopische Untersuchung des Phänotyps von Wildtyp und <i>sun41Δ</i> Blastosporen	57
Bild 8.15:	Zellgröße der <i>sun41Δ</i> Mutante im Vergleich zu Wildtyp und Revertante	59

Bild 8.16:	Einfluss von Kongorot und Calcofluor auf unterschiedliche <i>C. albicans</i> Stämme	60
Bild 8.17:	Zusammensetzung der Polysaccharide in der Zellwand von Blastosporen verschiedener <i>C. albicans</i> Stämme	62
Bild 8.18:	Hyphen von <i>C. albicans</i> Wildtyp und <i>sun41Δ</i> Mutanten	63
Bild 8.19:	Phänotypen verschiedener <i>C. albicans</i> Stämme auf Festmedien	64
Bild 8.20:	Differenzielle Regulation in <i>sun41Δ</i> und Wildtyp	66
Bild 8.21:	Adhäsion auf Agarplatten	68
Bild 8.22:	Adhäsion auf Caco-2 Zell-Monolayer	69
Bild 8.23:	Adhäsion auf Plastikoberfläche	70
Bild 8.24:	Vergleich der Biofilm Bildung verschiedener <i>C. albicans</i> Stämme	71
Bild 8.25:	Ultrastruktur der Biofilme verschiedener <i>C. albicans</i> Stämme	72
Bild 8.26:	Invasion der <i>C. albicans</i> auf einem Epithelial-Modell	73
Bild 8.27:	Virulenztest verschiedener <i>C. albicans</i> Stämme im Mausmodell	74

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
α -MEM	Minimal Essential Medium Alpha nach Eagle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum Albumin
cDNS	copy/complementary Desoxyribonukleinsäure
CID	<i>collision induced decay</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fötales (bovines) Kälberserum
FRT	<i>FLP recognition target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure
HPLC	<i>"High performance liquid chromatography"</i>
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	tandem Massenspektrometrie
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge

ORF	Offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer mit Salz (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSD	<i>post source decay</i>
qTOF	Quadrupol- <i>time of flight</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RP	" <i>Reversed Phase</i> "
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>Sodium dodecylsulfate</i>)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRAP	Ionenfalle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenprozent (<i>volume/volume</i>)
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight/volume</i>)
WT	Wildtyp
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast extract / peptone / dextrose</i>

Zusammenfassung

Candida albicans ist ein weit verbreiteter human pathogener Organismus, der sowohl oberflächliche wie auch systemische Infektionen verursacht. Diese treten vor allem bei Personen mit geschwächtem Immunsystem auf. Bei der Infektion spielen die Zellwand und ihre Bestandteile eine besonders wichtige Rolle. Dieses komplexe Netzwerk aus Glucan, Chitin, Mannan und Proteinen stellt die Nahtstelle der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen dar. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mehrere der in dieses Netzwerk eingebundenen Proteine ausschlaggebend für die Adhäsion und die Interaktion mit dem Wirt und seinem Immunsystem sind. Hinweise auf Änderungen im Zellwand-Proteom während des Übergangs vom Wachstum als Blastosporen hin zu Hyphen wurden zuerst im Microarray Experimenten gefunden, und konnten später in Untersuchungen bestätigt werden, die sich auf die Zellwandproteine konzentrierten.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze der Probenvorbereitung verglichen, um die kovalent an die Zellwand gebundenen Proteine oder deren Peptide durch massenspektrometrische Methoden zu identifizieren. Trypsin, Endoproteinase Glu-C und Bromcyan zur Freisetzung von Proteinfragmenten wurden allein oder in Kombination verwendet und miteinander verglichen. Zusätzlich untersucht wurden die Auswirkungen einer Vorbehandlung der Zellwand durch eine β -1,3-Glucanase. Die Identifikation der Peptide erfolgte mittels zweier verschiedener Massenspektrometer.

Insgesamt konnten 33 Proteine in der Wachstumsform der Blastosporen identifiziert werden, sechs davon mit vorhergesagtem GPI-Anker. Im Gegensatz dazu wiesen 14 der 18 identifizierten Proteine aus Hyphen-Zellen diese spezifische Ankersequenz auf, 12 davon sind in dieser Wachstumsform transkriptionell induziert. Zwischen den verwendeten Methoden wurde eine hohe Varianz in der Zahl identifizierter Proteine, bzw. der Zahl zu einem Protein gehörender Peptide, gefunden.

Zusätzlich wurden die von *C. albicans* in synthetische Flüssigmedien sekretierten Proteine identifiziert. Unter den sowohl von Blastosporen wie auch Hyphen sekretierten Proteinen befand sich Sun41p. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass die Transkription dieses Proteins in Hyphen induziert wird. Die SUN Gen Familie, zu der es gehört, wurde in *S. cerevisiae* definiert und beinhaltet eine für Pilze spezifische Familie von Proteinen die eine hohe Übereinstimmung in ihrer C-terminalen Domäne aufweisen. Gene dieser Familie sind in unterschiedliche zelluläre Prozesse wie DNS-Replikation, Alterung, mitochondriale Biogenese und Cytokinese involviert. In *C. albicans* gehören zwei Gene, *SUN41* und *SIM1*, dieser Familie an. Da Sun41p als potentieller Virulenzfaktor Ziel einer gegen Pilze gerichteten Therapie darstellen kann, wurde seine Funktion durch die Konstruktion einer *SUN41* Deletionsmutante untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* Mutanten ohne *SUN41* ähnliche Defekte aufweisen wie sie auch bei entsprechenden *S. cerevisiae* Mutanten gefunden wurden. Dies beinhaltet unter anderem Defekte bei der Cytokinese. Zusätzlich zeigten die *SUN41* Mutanten eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der die Zellwand schädigende Substanz Kongorot, wohingegen bei der Anwesenheit von Calcofluor Weiß keine Veränderung beobachtbar war. Im Vergleich mit dem Wildtyp wies der *SUN41* Deletionsstamm Defekte bei der Bildung von Biofilmen auf, zeigte eine reduzierte Adhäsion auf einem epithelialen Gewebemodell und konnte unter den getesteten Bedingungen auf Festmedien keine Hyphen bilden. Die Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Sun41p als Glycosidase hin, die an der Zellwand-Biogenese beteiligt ist und dadurch die Cytokinese, die Adhäsion am Wirtsgewebe, die Bildung von Biofilmen und die Virulenz beeinflusst. Dies weist auf eine wichtige Rolle von Sun41p bei der Interaktion des Pathogen mit dem Wirt hin.

Abstract

Candida albicans is a common human pathogen which may cause superficial and systemic infections especially in persons with weakened immune system. During infection, the cell wall and its components plays an important role because this complex network built of glucan, chitin, mannan and proteins is the interface between host and pathogen. It was shown that several of the embedded proteins are crucial for adhesion and interaction with the host. During yeast to hyphal transition significant changes in the cell wall proteome were first suggested by microarray experiments and further confirmed by studies focusing on cell wall proteomics. In this work, the effects of different sample preparations for solubilisation of covalently bound proteins or peptides thereof from isolated cell walls for identification with MS/MS were compared. Trypsin, endoproteinase Glu-C and cyanogen bromide alone or in combination were used for protein fragmentation, and the effects of a pre-treatment of the cell wall with a β -1,3-glucanase tested and compared to each other. Two different types of mass spectrometers were used for identification of the peptides. Overall, 33 proteins were identified in yeast growth form, 6 with a predicted GPI-anchor. In contrast, 14 of the identified 18 proteins in hyphal cells carry this specific anchor sequence. Based on the level of transcripts, 12 of these proteins are up regulated under hyphal inducing conditions. A large variance in the identification of proteins and the number of peptides corresponding to one protein depending on the method used was found.

Additionally, proteins secreted from *C. albicans* growing in liquid synthetic media were identified. Among these proteins, Sun41p was found to be secreted to the media of cells growing as blastospores as well as hyphae. The transcription of this protein was found to be up regulated in hyphae in previous work. The SUN gene family, it belongs to, has been defined in *S. cerevisiae* and comprises a fungal specific family of proteins which show high similarity in their C-terminal domain. Genes of this family are involved in different cellular processes like DNA replication, ageing, mitochondrial biogenesis and

cytokinesis. In *C. albicans* the SUN-family comprises two genes, *SUN41* and *SIM1*. Being of interest as potential virulence factor and therefore potential target in an anti-fungal therapy, the function of Sun41p was examined by construction of a *SUN41* deletion mutant. Using this, it could be demonstrated that *C. albicans* mutants lacking *SUN41* show similar defects as found for *S. cerevisiae* including defects in cytokinesis. In addition, the *SUN41* mutant showed a higher sensitivity towards the cell wall disturbing agent Congo red, whereas no difference was observed in the presence of Calcofluor white. Compared to the wild type *SUN41* deletion strains exhibited a defect in biofilm formation, a reduced adherence on epithelial tissue models and are unable to form hyphae on solid media under the conditions tested. The results support a function of Sun41p as glycosidase involved cell wall biogenesis affecting cytokinesis, adhesion to host tissue, biofilm formation and virulence indicating an important role in host-pathogen interaction.

1 Einleitung

1.1 *Candida albicans*

Die Gattung *Candida* gehört zum Stamm der Ascomykota (Sprosspilze), zur Klasse der Endomyzeten und der Ordnung der Saccharomycetales. *C. albicans* ist ein obligat diploider Hefepilz mit 2 x 8 Chromosomen, bei dem bisher keine sexuelle Vermehrung beobachtet wurde (Magee und Magee 2000). Als pleomorpher Organismus kommt *C. albicans* in unterschiedlichen Wachstumsformen vor, entweder als einzellige Blastosporen (Hefeform), mehrzellige Pseudohyphen, Chlamydosporen oder Hyphen. Die morphologischen Veränderungen sind reversibel. Die Proliferation der Hefeform von *C. albicans* erfolgt durch apikale Sprossung und Teilung der Zellen. In dieser Form haben die Zellen einen Durchmesser von 3 - 6 µm. Durch unipolares Wachstum entstehen Pseudohyphen, wobei jede Zelle des Filaments durch Sprossung aus der vorherigen Zelle entsteht. Diese Zellen trennen sich nicht mehr und bilden dabei Ketten. Im Unterschied zu Hyphen weisen diese Pseudohyphen Einschnürungen an den Septen auf. Durch von einzelnen Zellen ausgehendes kontinuierliches apikales Wachstum bilden sich Hyphen. Die Filamente werden durch Septen ohne Konstriktionen in mononukleare Zellen geteilt und verzweigen sich (Odds 1994). Änderungen in der Morphologie erfolgen reguliert als Reaktion auf diverse äußere Faktoren. So wird beispielsweise hyphales Wachstum durch Temperaturen von über 30°C, einen neutralen pH-Wert oder Blutserum induziert. Ebenso können Stress-Situationen, wie z. B. die Limitierung von verfügbarem Stickstoff die Bildung von Hyphen auslösen (Ernst 2000). Als weitergehende Anpassung an Nährstoffmangel oder andere lebensfeindliche Bedingungen können Chlamydosporen gebildet werden. Diese treten meist am Ende von Hyphen auf und dienen vermutlich als Überdauerungsform.

C. albicans ist ein fakultatives Pathogen das kommensalisch mukosale Epithelien im oralen, gastrointestinalen und im urogenitalen Bereich kolonisiert, sowie auf der Haut vorkommt (Odds 1994). Er ist verantwortlich für ca. 50 % aller Candidosen. Deren Spektrum reicht von leichten, oberflächlichen Infektionen

der Haut und der Schleimhäute bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen mit der Besiedlung von Organen. Dabei ist die Ausbreitung des Pilzes über das Blutgefäßsystem des Wirtes im Wesentlichen vom Status des Immunsystems abhängig. Besonders anfällig für systemische Candidosen sind Menschen mit supprimiertem Immunsystem, wobei Mortalitätsraten von bis zu 40 % beobachtet werden (de Pauw und Meunier 1999). Im Zusammenhang mit der steigenden Anzahl von immungeschwächten Patienten auf Intensivstationen hat *C. albicans* unter den häufigsten nosokomialen Blutbahninfektionen als erster eukaryontischer Erreger den Platz vier inne (Center for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/candidiasis_t.htm, Oktober 2005).

Zur Behandlung von Candidosen werden vorwiegend Präparate mit einem fungiziden Wirkstoff aus einer der drei folgenden Gruppen eingesetzt: Polyene, Triazole und Echinocandine.

Die Wirkung der Polyene, zu denen Amphotericin B gehört, erfolgt durch die hoch affine Bindung an einen Baustein der Pilzzellmembran, das Ergosterol. Dadurch wird die Zellmembran destabilisiert (Haynes et al. 1996). Allerdings kann die Behandlung mit Amphotericin B mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sein, die durch die Nephrotoxizität des Wirkstoffes ausgelöst werden.

Fluconazol, Ketoconazol und Itraconazol sind die wichtigsten Vertreter der Gruppe der Triazole. Eingesetzt werden sie sowohl zur Behandlung lokal begrenzter wie auch systemischer Candidosen. Von diesen Triazolen wird Erg11p, die P450-abhängige Lanosterol-14- α -Demethylase, inhibiert. Erg11p ist ein Schlüsselenzym im Biosyntheseweg des Ergosterols, dessen Hemmung zur Verknappung von Ergosterol führt, welches somit nicht mehr für den Aufbau der Zellmembran zur Verfügung steht (Pierson et al. 2004). Triazole wirken deshalb in der Regel fungistatisch. Vorteile der Triazole sind eine gute Verträglichkeit und Wasserlöslichkeit als auch eine geringe Resistenzbildung bei *C. albicans*. (Pfaller et al. 2005).

Die Echinocandine bilden die dritte Wirkstoffgruppe. Sie wirken inhibierend auf den Glukan-Synthase-Komplex und führen zur Lyse der Zellen. Caspofungin, der erste Glukansynthase-Hemmer, wurde 2002 als Medikament zugelassen. Neue

Therapieansätze sehen den Einsatz von Antikörpern und Kombinationstherapien aus Fungiziden und Immunmodulatoren vor (Matthews et al. 2003). Antikörper gegen das lösliche Zellwandprotein Hsp90p werden bereits in der klinischen Phase getestet (Matthews und Burnie 2005).

1.1.1 Die Zellwand

Unterschiedliche Virulenzfaktoren tragen zur Pathogenität von *C. albicans* bei. Unter diesen Faktoren nimmt die Zellwand eine besonders wichtige Rolle ein. Zum einen dient sie der Zelle als Schutz gegen chemische, physikalische oder biologische Gefährdungen. Zum anderen bildet die Zellwand als äußerstes Zellkompartiment die Struktur des Pilzes welche: [1] als erste Kontakt zu den Zellen des Wirtes hat; [2] verantwortlich ist für die Adhäsion des Pilzes an den Untergrund; [3] wichtige Antigene beinhaltet und [4] für die Interaktion mit dem Wirt verantwortlich ist. Als Reaktion des Pilzes beinhalten diese Interaktionen Modifikationen in der Zusammensetzung der Zellwand wie auch der Verknüpfungen der Polysaccharide die das strukturgebende Gerüst bilden (Ruiz-Herrera et al. 2006).

Die Zellwand ist aus verschiedenen Bestandteilen in spezifischer Anordnung aufgebaut. Diese sind entweder kovalent verknüpft, oder durch ionische bzw. hydrophile/ hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden. Durch mikroskopische Untersuchungen von Zellwand-Dünnschnitten wurde die Existenz mehrerer Schichten aufgedeckt (siehe Bild 1.1 A). In der äußeren oberflächennahen Schicht sind nicht-kovalent gebundene Mannoproteine angereichert. Diese sind zwar auch in weiter innen gelegenen Schichten anzutreffen, allerdings in geringerer Menge (Marcilla et al. 1991; Kapteyn et al. 2000). Weitere Zellwandproteine sind durch eine Bindung der β -1,6-Glucan-Seitenketten an die β -Glucan/Chitin Schichten gekennzeichnet.

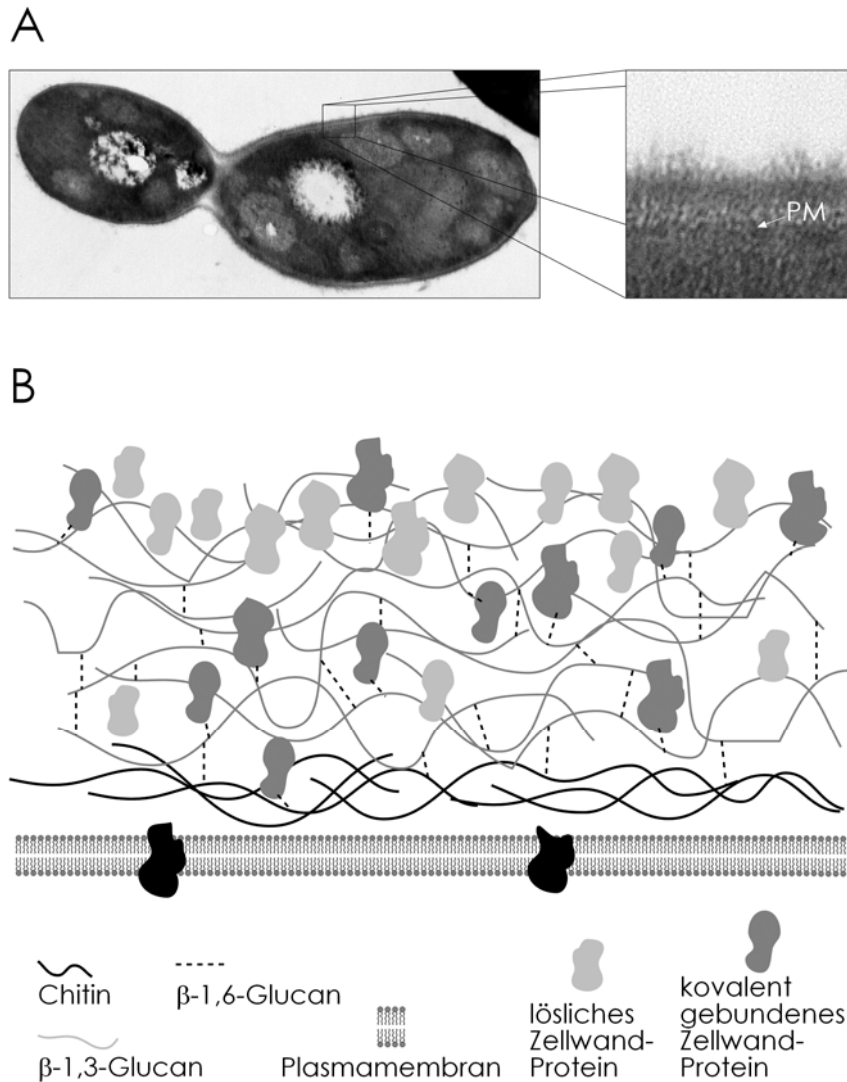


Bild 1.1: Strukturelle und schematische Darstellung der *C. albicans* Zellwand-Architektur

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellwand. Die elektronendurchlässige innere Schicht besteht hauptsächlich aus Polysacchariden (β -Glucan und Chitin) mit einem kleinen Anteil an Proteinen. Die elektronendichte äußere Schicht beinhaltet insbesondere Mannoproteine. (B) Schema der Zellwand. Mikrofibrillen aus β -1,3-Glucan und β -1,6-Glucan-Ketten sind durch kovalente Bindungen an Chitin-Mikrofibrillen geknüpft und stellen zusammen mit einigen weiteren Proteinen die Basis der Zellwand dar. An der äußeren Oberfläche sind unterschiedliche Typen von Proteinen angereichert, die entweder durch nicht-kovalente oder durch eine Reihe unterschiedlicher kovalenter Bindungen verankert sind. Dabei sind die Zellwandproteine hauptsächlich über kurze Ketten aus β -1,6-Glucan an β -1,3-Glucan oder Chitin gebunden. Nach (Ruiz-Herrera et al. 2006)

1.1.2 Bestandteile der Zellwand

1.1.2.1 Chitin

Chitin ist ein lineares Polysaccharid, bestehend aus mehr als 2000 *N*-Acetylglucosamin-Monomeren. Zwischen 20 und 400 Chitin-Ketten formen eine Mikrofibrille. Aufgrund seines kristallinen Aufbaus ist das Chitin kaum löslich und bildet in Verbindung mit dem β -1,3-Glucan das Hauptgerüst der Zellwand, an das sich die Zellwandproteine anlagern.

1.1.2.2 Glucan

Der Hauptanteil der Polysaccharide in der Zellwand wird aus Glucan Untereinheiten gebildet. Im Gegensatz zu anderen Pilzen enthält die Zellwand von *C. albicans* nur β -Glucan. Diese Polymere bestehen aus β -1,3- oder β -1,6-glycosidisch verknüpften Glucose-Monomeren. Einzelne β -1,3-Glucan-Ketten formen Helices, die sich zu einem Komplex zusammenlagern können. Die dabei entstehende dreifache Helix bildet die Grundlage der Mikrofibrillen des unverzweigten β -1,3-Glucans (Kreger und Kopecka 1976). β -1,6-Glucan, teilweise in einer stark verzweigten Form, bildet die Verbindung von Glucan und Chitin (Surarit et al. 1988).

1.1.2.3 Proteine

Die Zellwandproteine werden in zwei Klassen eingeteilt: [1] Lösliche Proteine, die nicht kovalent an das Polysaccharid-Netzwerk gebunden und durch ionische Detergenzien oder chaotrope Agenzien aus der Zellwand extrahierbar sind; [2] Kovalent gebundene Proteine die erst durch Degradation des strukturgebenden Netzwerkes oder unter Spaltung spezifischer Verknüpfungen freigesetzt werden. Dieser werden auch in „echte“ und „atypische“ Zellwandproteine unterteilt, bei letzteren ist die Verbindung zur Zellwand bisher unbekannt (Sentandreu et al. 2004). Die Gruppe der kovalent verknüpften Zellwandproteine weist als Charakteristika eine Domäne auf, die reich an potentiellen Glycosylierungsstellen (N- oder O-Glycosylierung) ist. In dieser Gruppe sind drei verschiedene Typen kovalent verknüpfter Proteine vertreten:

- Die mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Restes über β -1,6-Glucan an β -1,3-Glucan (90 %) oder Chitin (10 %) gekoppelten GPI-Proteine, welche eine sekretorische Domäne aufweisen (Marcilla et al. 1991; de Nobel und Lipke 1994; De Groot et al. 2005). Mittels *in-silico* Untersuchungen des Genoms von *C. albicans* wurden bis zu 234 Proteine gefunden, die entsprechende Charakteristika aufweisen (De Groot et al. 2003; Garcera et al. 2003; Eisenhaber et al. 2004).
- Die PIR-Proteine (proteins with internal repeats), deren Charakteristikum eine Sequenzwiederholung ist. Sie sind über unbekannte alkali-sensitive Bindungen an das β -1,3-Glucan gekoppelt und besitzen eine C-terminale Sequenz, innerhalb derer vier Cysteine an festen Positionen vorkommen. Wie die GPI-Proteine weisen sie eine sekretorische Domäne auf (Toh-e et al. 1993).
- Den PIR-Proteinen vergleichbare Sequenzeigenschaften weist der letzte Typ kovalent verknüpfter Zellwandproteine, die RAE-Proteine (reducing agents and extractable), auf. Diese werden allerdings nicht unter alkalischen Bedingungen aus isolierten Zellwänden freigesetzt, sondern durch reduzierend wirkende Agenzien (Toh-e et al. 1993; Castillo et al. 2003).

1.1.3 Identifikation der Zellwandproteine

Die Untersuchung der Transkriptionsprofile von als Zellwandproteinen annotierten Genen zeigt starke Unterschiede in deren Expression je nach Umweltbedingung und Wachstumsform (Sohn et al. 2003). Für die einfacher zugänglichen löslichen Zellwandproteine ist diese unterschiedliche Expression auch auf Protein-Ebene nachgewiesen (Chaffin und Stocco 1983; Chaffin et al. 1998; Pitarch et al. 2002; Urban et al. 2003). Die Untersuchung der kovalent gebundenen Zellwandproteine wird durch ihre Verknüpfung mit dem strukturgebenden Netzwerk aus Glucan und Chitin und ihre starke Glycosylierung erschwert. Bisherige Untersuchungen basieren auf der Degradation des Netzwerkes, bzw. der Bindungen an das Netzwerk um die Proteine freizusetzen (de Groot et al. 2004). Ein alternativer Ansatz beruht auf einem proteolytischen Verdau der Zellwand-

proteine direkt auf den isolierten und extrahierten Zellwänden (Schwenk 2003; Sohn et al. 2006; de Groot et al. 2007) (Bild 1.2). Ihm liegt die Vorstellung zugrunde, dass diese Proteine mit ihrem hoch-glycosylierten Bereich innerhalb der Zellwand liegen. Ein nicht modifizierter N-terminaler Teil, der möglicherweise eine funktionelle Domäne beinhaltet, ist außerhalb der Zellwand für die Protease zugänglich. Die durch die Protease freigesetzten Peptide können anschließend aufgereinigt werden, und unter Verwendung massenspektrometrischer Methoden sequenziert und den zugehörigen Proteinen zugeordnet werden.

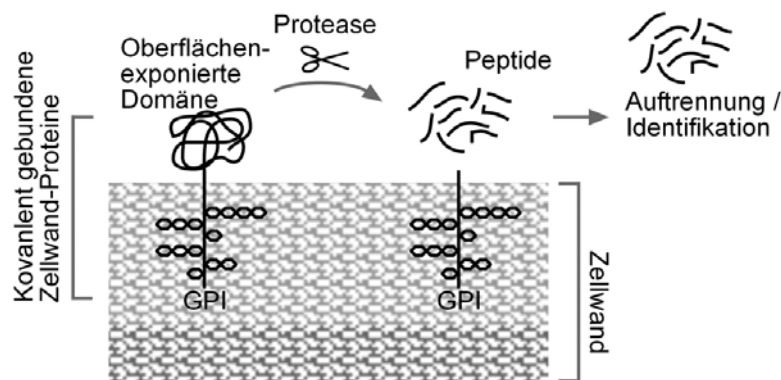


Bild 1.2: Schematische Darstellung des proteolytischen Verdauens kovalent gebundener Zellwandproteine am Beispiel der GPI-Proteine

Das Protein ist über den GPI-Anker an das Polysaccharid-Netzwerk gebunden. Der hoch-glycosylierte Teil des Proteins liegt in der Zellwand, während die potentielle funktionelle Domäne zugänglich auf der Oberfläche liegt. Dieser Teil des Proteins wird durch die Protease in Peptide geschnitten, die in die Lösung des umgebenden Puffers übergehen. Daraus können sie aufgereinigt und durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Nach (Sohn et al. 2006)

1.1.3.1 Massenspektrometrie

Die Masse eines Proteins oder Peptides ist ein charakteristischer Parameter, der hauptsächlich durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird. Experimentell lässt sich diese Masse mit einer hohen Nachweisempfindlichkeit durch die Massenspektrometrie nachweisen. Die dabei verwendete *Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization* (MALDI) und die *Elektrospray-Ionisation* (ESI) stellen schonende Ionisationsverfahren dar, mit deren Hilfe die thermisch labilen Biomoleküle als intakte Moleküle ionisiert und ihre Masse bestimmt werden kann.

Für die Identifikation von Proteinen werden vorwiegend die nachfolgend erläuterten beiden Methoden eingesetzt: Beim *Peptide-Mass-Fingerprint* (PMF) wird ein Protein durch die Massenbestimmung seiner durch proteolytischen Verdau entstandenen charakteristischen Peptide identifiziert. Dazu wird das zu identifizierende Protein unter Verwendung einer Protease spezifisch in Peptide geschnitten. Deren Masse wird bestimmt und mit den bei dem Verdau zu erwartenden Produkten aus einer Proteindatenbank verglichen. Übereinstimmungen werden von dem Programm statistisch bewertet und erlauben die Identifizierung eines Proteins mit einer definierten Wahrscheinlichkeit. Dieses Verfahren wird hauptsächlich bei isolierten Proteinen angewendet. Es wird durch die häufig auftretenden post-translationalen Modifikationen erschwert, da diese zu nicht bekannten Massenänderungen führen können.

Bei der zweiten Methode zur Identifikation wird die Fragmentierung der Peptide gezielt genutzt (*Post-Source Decay*, PSD) oder induziert (*Collision-Induced Dissociation*, CID). Die Peptide werden vor allem entlang der Hauptkette an der Peptid-Bindung fragmentiert (Johnson et al. 1987) (Bild 1.3).

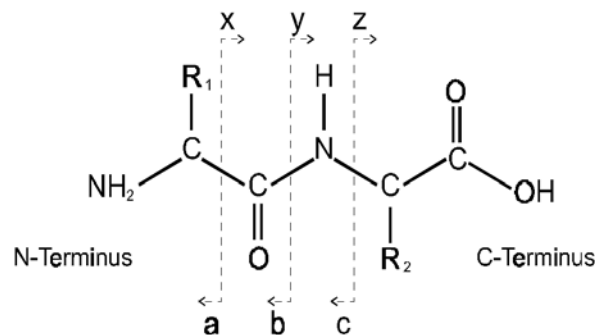


Bild 1.3: Schematischer Aufbau der Peptidbindung

Dadurch sind die Massen der Fragment-Ionen einer bekannten Peptid-Sequenz durch die Inkrementmassen der Aminosäuren berechenbar. Die experimentell ermittelten Massen der Fragment-Ionen werden mit den zu erwartenden Fragment-Massen von Peptiden aus einer Proteindatenbank verglichen. Wie beim PMF werden die Übereinstimmungen statistisch bewertet und die Identifizierung mit einer definierten Wahrscheinlichkeit angegeben.

Bei Verwertung der Fragment-Daten reicht eine deutlich kleinere Zahl an gemessenen Peptiden aus, um ein Protein mit hoher Sicherheit zu identifizieren. Problematisch sind wie beim PMF post-translationale Modifikationen. Auch hat die Sequenz des untersuchten Peptides einen starken Einfluss auf seine Fragmentierung und die Nutzbarkeit der generierten Spektren (Wenschuh et al. 1998; Nold et al. 1999).

1.1.4 Funktion der Zellwandproteine

Die in die Zellwand integrierten Proteine sind an vielen Prozessen beteiligt. Durch die Degradation von Makromolekülen ermöglichen einige deren Nutzung als Nährstoffe, bzw. wirken als Chitinasen oder Glucanasen an der Modulation der Zellwandarchitektur mit (Chaffin et al. 1998; Pedreno et al. 2004). Andere Proteine sind an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt (Tokunaga et al. 1990), oder wie die Adhesine der ALS-Gen-Familie an der Adhäsion an die Wirts-Oberfläche (Sheppard et al. 2004). Ebenfalls sind einige in die Antwort der *C. albicans* Zellen auf die Reaktion des Wirtes während des invasiven Prozesses eingebunden (Fradin et al. 2005).

1.1.4.1 *SUN41*

Die Gene der SUN-Familie kodieren für eine auf Pilze beschränkte Familie von Proteinen. Definiert wurde sie in *S. cerevisiae* durch eine Gruppe von vier Proteinen, *Sim1p*, *Uth1p*, *Nca3p* und *Sun4p*, die im C-terminalen Bereich eine hohe Übereinstimmung zeigen (Camougrand et al. 2000). Mitglieder dieser Gen-Familie sind an diversen zellulären Prozessen wie DNS-Replikation, Alterungsprozessen, mitochondrialer Biogenese und Cytokinese beteiligt. Aufgrund der Charakterisierung des zur SUN-Familie Homologien zeigenden BglBp aus *Candida wickerhamii* als β -Glycosidase wird diese Aktivität auch den restlichen Mitgliedern dieser Familie zugesprochen (Skory und Freer 1995). In *C. albicans* gehören nur zwei Gene der SUN-Familie an, *SUN41* -das Orthologe zu *SUN4*- und *SIM1* -das Orthologe von *UTH1*. Beide waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht im Detail charakterisiert.

Die Transkription von *SUN41* wird unter Hyphen induzierenden Bedingungen hoch reguliert, was auf eine Rolle in der Morphogenese schließen lässt (Sohn et

al. 2003). Des Weiteren kann der Umstand, dass es sich bei Sun41p um ein potentielles Substrat von Kex2p handelt, als Hinweis auf eine mögliche Sekretion von Sun41p angesehen werden. Die zur Kexin-Superfamilie gehörende Serin-Protease Kex2p ist sowohl am konstitutiven wie auch am regulierten sekretorischen Weg beteiligt (Newport et al. 2003).

Das zu *SUN41* orthologe *SUN4* aus *S. cerevisiae* ist in die Zellteilung involviert (Mouassite et al. 2000). Das entsprechende Protein Sun4p wurde als glycosyliertes lösliches Zellwandprotein identifiziert, das durch reduzierende Agenzien extrahierbar ist (Cappellaro et al. 1998; Velours et al. 2002 20). Zusätzlich wurde Sun4p in den Mitochondrien gefunden (Velours et al. 2002).

1.2 Zielsetzung

Die Zellwand von Pilzen stellt ein bevorzugtes Ziel für die Entwicklung von fungiziden Wirkstoffen dar. Speziell die darin enthaltenen Proteine werden zu diesem Zweck intensiv untersucht. Jedoch wird insbesondere die Untersuchung der kovalent an das Polysaccharidgerüst gebundenen Proteine, die zusätzlich noch post-translationalen Modifikationen tragen können, gerade durch diese Bindung sehr erschwert.

In dieser Arbeit sollte eine Methode zur Freisetzung von Fragmenten der kovalent gebundenen Zellwandproteine von *C. albicans* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, als auch die Identifikation der Proteine über die massenspektrometrische Analyse der Fragmente optimiert werden. Die Resultate unterschiedlicher Varianten dieser Methode sollten miteinander verglichen werden und die Plausibilität der Identifikation über den Abgleich mit bereits vorliegenden Transkriptom-Daten geprüft werden. Zudem sollte untersucht werden welcher Anteil an Zellwandproteinen ins Medium sekretiert wird. Ein aus diesen Arbeiten hervorgehendes, für die Biogenese der Zellwand relevantes Protein, sollte weitergehend charakterisiert werden.

Dazu sollte ein entsprechender *C. albicans* Stamm konstruiert werden, bei dem das entsprechende Gen deletiert war. Dieser Stamm sollte dazu genutzt werden, um die Funktion des Proteins unter diversen Wachstums- und Stressbedingungen mit mikrobiologischen und mikroskopischen Techniken zu untersuchen.

2 Material & Methoden

2.1 Stämme und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten *C. albicans* Stämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Stämme wurden über Nacht in YPD (10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g/l Glucose) bei 30°C kultiviert, und anschließend für 6 h in frischem Medium auf einem Rotations-Schüttler inkubiert. Hyphenbildung wurde in YPD + 10% hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) oder in Minimum Essential Medium α (α -MEM) + 2% Glucose bei 37°C induziert. Als synthetisches Medium wurde Difco™ Yeast Nitrogen Base (YNB, ohne Aminosäuren; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) supplementiert mit 75 mM Ammoniumsulfat und 2% Glucose verwendet. Spider medium enthielt 1% Nährlösung, 0,2% K_2HPO_4 und 1% Mannitol als Kohlenstoff-Quelle (Liu et al. 1994). Für Plattentests wurde dem Medium 1,5% Agar hinzugefügt.

Tabelle 2.1: Verwendete *C. albicans* Stämme

Stammsammlungs- Nummer	Name	Genotyp	Referenz
Can14 (SC5314)	Wildtyp	Klinisches Isolat	(Gillum et al. 1984)
Can417 + Can423	Vorläufer von <i>sun41</i> Δ	<i>sun41</i> Δ ::SAT1-FLIP/ <i>SUN41</i>	Diese Studie
Can418 + Can424	Vorläufer von <i>sun41</i> Δ	<i>sun41-1</i> Δ ::FRT/ <i>SUN41</i>	Diese Studie
Can419 + Can425	Vorläufer von <i>sun41</i> Δ	<i>sun41</i> Δ ::FRT/ <i>sun41</i> Δ ::SAT1-FLIP	Diese Studie
Can420 + Can426	<i>sun41</i> Δ	<i>sun41</i> Δ ::FRT/ <i>sun41</i> Δ ::FRT	Diese Studie
Can421 + Can427	Vorläufer von <i>sun41</i> Δ - <i>SUN41</i>	<i>sun41</i> Δ ::FRT/ <i>SUN41</i> ::SAT1-FLIP	Diese Studie
Can422 + Can428	<i>sun41</i> Δ - <i>SUN41</i>	<i>sun41</i> Δ ::FRT/ <i>SUN41</i> ::FRT	Diese Studie

FRT (flip recombinase target) (Gillum et al. 1984)

2.2 Zellwandpräparation

Die Blastosporen- und Hyphenzellwand-Isolation wurde mit einigen Modifikationen wie bereits beschrieben durchgeführt (Kapteyn et al. 1996; de Groot et al. 2004). Die Zellen wurden mit eiskaltem ddH₂O und 10 mM Tris-HCl, pH

7,5 gewaschen und im Anschluss in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ($\sim 10^7$ Zellen/ μ l) resuspendiert. Mit einem Druck von 2×10^6 hPa zerstörte die French Press (SLM Instruments, Champaign, IL, USA) während dreimaligem Durchlauf die Zellen. Dem Ansatz wurde der Protease Inhibitor Cocktail Complete (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Um nicht kovalent gebundene Proteine sowie intrazelluläre Kontaminationen zu entfernen, wurden die Zellwände einmal mit 1 M NaCl und dreimal mit ddH₂O gewaschen. Die Extraktion erfolgte in drei Schritten für jeweils 15 min bei 100°C in 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, mit 2% SDS, 100 mM Na-EDTA und 40 mM β -Mercaptoethanol (5 ml pro Gramm Feuchtmasse). Den Abschluss bildeten fünf Waschschriffe in ddH₂O. Die Zellwände wurden gefriergetrocknet und bei -30°C aufbewahrt.

2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das Mini Protean® Cell System (BioRad, München) eingesetzt. Die Gele (nach Laemmli) beinhalteten zwischen 10 und 15% Acrylamid. (Laemmli 1970; Ausubel 1988).

2.4 Proteinfärbung

2.4.1 Silberfärbung

Alle Inkubationen erfolgten bei RT auf einem Orbitalschüttler mit 30 - 40 upm. Zur Fixierung der Proteine/Peptide im Gel wurden diese für eine Stunde in einem Ethanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch (40:10:50) und anschließend für 2 h in Ethanol/Essigsäure/Wasser (5:5:90) inkubiert. Die Gele wurden 5 min in H₂O gewaschen und in 0,5 M Natriumacetat plus 1% Glutaraldehyd (in H₂O) überführt. Anschließend wurde nochmals dreimal 10 min in H₂O gewaschen. Um eine homogene Färbung der Gele zu erreichen, wurden sie zweimal für 30 min in 0,05% wässriger Naphtalindisulfonsäure inkubiert. Überschüssige Naphtalindisulfonsäure wurde durch viermaliges Waschen mit H₂O für je 15 min entfernt. In einer frisch angesetzten ammoniakalischen Silbernitratlösung wurden die Gele 30 min gefärbt. Zur Herstellung dieser Lösung wurden in eine Lösung aus 8,5 ml H₂O, 0,5 ml Ammoniak (25%) und 80 μ l 10 N NaOH 0,32 g in 3 ml H₂O gelöstes Silbernitrat langsam hinzu pipettiert und mit H₂O auf 40 ml aufgefüllt.

Überschüssiges Silbernitrat wurde durch dreimaliges Waschen mit H₂O für je 4 min entfernt. Die Gele wurden ca. 1 - 2 min in eine wässrige Lösung mit 0,1% Formaldehyd und 0,01% Natriumcitrat gegeben und sobald eine leichte Hintergrundfärbung auftrat in die Stopplösung aus 5% Tris und 2% Essigsäure überführt. Die Gele wurden in H₂O gelagert (Wray et al. 1981).

2.4.2 Coomassiefärbung

Die Polyacrylamidgele wurden für 1 - 2 h in Färbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250) inkubiert und unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure) während 6 - 8 h der Hintergrund entfärbt. Anschließend wurden die Gele gewässert (Bramhall et al. 1969).

2.5 Verdau der Zellwandproteine

2.5.1 Trypsin

Zur Zerstörung der Disulfid-Brücken wurden 5 mg getrocknete Zellwand in 100 µl 100 mM Tris-HCl pH 8 + 7,5 mM DTT resuspendiert und bei 60°C für 1 h inkubiert. Es folgte die Alkylierung mittels Iodacetamid in einer Endkonzentration von 15 mM und eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln. Der Ansatz wurde mit 100 mM Tris-HCl pH 8 and 10 µl Acetonitril auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Es folgte eine ü.N. Inkubation bei 37°C mit 5 µg Trypsin (sequencing grade, modified; Promega, Mannheim, Deutschland). Nach Enzyminaktivierung durch Zugabe von Essigsäure folgte eine zehninütige Zentrifugation bei 16000 × g um die Zellwand zu entfernen. Der Überstand, der die löslichen Peptide enthielt, wurde aufgefangen und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert.

2.5.2 Bromcyan

5 mg der getrockneten Zellwand wurden in 200 µl 70%iger Trifluoressigsäure (TFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 10 mg CNBr (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) resuspendiert und für 16 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach zehninütiger Zentrifugation bei 16000 × g wurde der Überstand in einer Speed-Vac (UniEquip, Planegg, Deutschland) angetrocknet und vor der endgültigen

Trocknung zweimal mit kaltem (-30°C) Aceton gewaschen. Für die Analyse wurden die Peptide in 0,1% wässriger Trifluoressigsäure resuspendiert.

2.5.3 Bromcyan + Trypsin

Das Pellet aus dem CNBr-Verdau wurde in 20 µl 70% TFA aufgenommen, anschließend mit 180 µl 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 gepuffert und mit 5 µg Trypsin für 16 h bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung durch Zugabe von Essigsäure und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und analysiert.

2.5.4 Glu-C

5 mg der getrockneten Zellwand wurden in 200 µl 50 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert und mit 5 µg Glu-C (Protease V8, sequencing grade; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 16 h bei RT inkubiert. Nach Hitze-Inaktivierung und Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und analysiert.

2.5.5 Quantazyme + Trypsin

5 mg der getrockneten Zellwand wurden in 200 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und mit 100 Unit β-1,3-Glucanase (Quantazyme™; MP Biomedicals) für 16 h bei RT inkubiert. Nach Hitze-Inaktivierung und Zentrifugation der restlichen Zellwand bei 16000 × g wurden 5 µg Trypsin zum Überstand gegeben und für 16 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Essigsäure wurde die Reaktion gestoppt.

2.6 Markierung der Zellwandproteine

2.6.1 Biotinylierung

Die Zellwandproteine von *C. albicans* aus Kulturen die in YPD oder in α-MEM gewachsen waren wurden mit Biotin markiert (Urban et al. 2003). Die Zellen aus 1000 ml Kultur wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 3500 × g geerntet und dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Zellen in Markierungspuffer (50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 8,5) resuspendiert. Dazu wurden pro Milliliter Zellpellet 0,2 ml Markierungspuffer mit 10 mg/ml Sulfo-

NHS-LC-Biotin verwendet und die Zellen 1 h auf einem Überkopf-Rotierad inkubiert. Zur Inaktivierung des Sulfo-NHS-LC-Biotins wurde das doppelte Volumen 100 mM Tris-HCl pH 8 zugegeben und unter gleichen Bedingungen für 30 min inkubiert. Die markierten Zellen wurden dreimal in PBS gewaschen, bevor sie aufgeschlossen wurden (2.2). Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4°C ausgeführt.

2.6.2 Aufreinigung biotinylierter Peptide

Zur Affinitätsaufreinigung der markierten Peptide aus dem Verdau (2.5) biotinylierter Zellwände wurden diese über Neutravidinsepharose (Pierce) gebunden. Das Protein Neutravidin bindet spezifisch Biotin, wobei die Aufreinigung biotinylierter Peptide durch an unlösliche Sepharose-Kügelchen gekoppeltes Neutravidin mit anschließender Elution erfolgt. 200 µl der Peptidgemische wurden zu 50 µl Neutravidinsepharose gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopf-Rotierad inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit kaltem H₂O gewaschen und mit 8 M Guanidine-HCl pH 1,5 eluiert.

2.7 Massenspektrometrische Protein Analyse

2.7.1 MALDI-TOF MS

Die Peptide des Verdau (2.8, 2.5, 2.5) wurden mittels ZipTipC₁₈TM (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) aus einem Volumen von 10 µl nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und direkt auf vorbeschichtete MALDI Probenräger (Prespotted AnchorChip-Target; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) eluiert. Die monoisotopische Molekülmasse der Peptide wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie in einem ultraflex II TOF/TOF 200 (Bruker) bestimmt. Es wurden die Massen im Bereich von 700-4000 Da im Reflektor Modus unter Verwendung der FlexControl und FlexAnalysis Software (Bruker) aufgenommen und verarbeitet. Die Fragmentanalyse (post-source decay; PSD) der stärksten Peaks wurden herangezogen um Informationen über die Sequenz der Peptide zu erhalten.

2.7.2 nano-LC-ESI-MS/MS

Die *reversed phase* nano-LC-MS/MS wurde mit einem Ultimate nanoflow LC System (LC Packings) durchgeführt. Das LC System war mit einem QSTAR Pulsar hybrid qTOF Massenspektrometer (Applied Biosystems / MDS Sciex, Darmstadt, Deutschland) verbunden, ausgestattet mit einer NanoElektrospray-Quelle (Column Adapter (ADPC-PRO) und distal beschichteten SilicaTips (FS360-20-10-D-20) (beide von New Objective, Woburn, USA)).

Mit einer Flußrate von 30 µl/min wurde die in 0,1% wässriger Trifluoressigsäure gelöste Peptidmischung durch einen PepMap C₁₈ Fangfilter (LC Packings) entsalzt. Mit Hilfe eines linearen Gradienten von 7-50% Acetonitril (84% in 0,1% Ameisensäure (v/v)) an der analytischen Säule (PepMap C₁₈, 75 µm Durchmesser x 15 cm; LC Packings) wurden die aufgefangenen Peptide für 27 min mit einer Flussrate von 200 nl/min eluiert und separiert und bei einer Spannung von 2200 kV ionisiert. Das Massenspektrometer wurde in einem datenabhängigen Erfassungsmodus verwendet, um einen automatischen Wechsel zwischen MS und MS/MS zu ermöglichen. MS-Spektren wurden für eine Sekunde erfasst. Die drei stärksten Ionen (zwei- oder dreifach geladen) wurden isoliert und sequentiell für 1,5 s durch niederenergetischen kollisionsinduzierten Zerfall (CID) fragmentiert. Alle MS und MS/MS Spektren wurden mit eingeschalteter Q2-Puls Funktion erfasst und für die erweiterte Ionentransmission im MS (m/z 400–1000) und MS/MS (m/z 75–1300) Massenspektrum optimiert. Für die Datenaufbereitung wurde die Analyst QS Software (AB /MDS Sciex) verwendet.

2.7.3 LC-ESI-MS/MS

Für die Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Elektrosprayionisation tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) wurde ein Surveyor LC System (Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland) verwendet, das über eine Elektrospray Ionen Quelle mit einem Finnigan LCQ^{DECA} Massenspektrometer (Thermo) verbunden war. Die in 0,1% TFA vorliegenden Peptidgemische wurden auf der analytischen Säule (Jupiter, C₁₈, 1 mm Durchmesser x 10 cm; Phenomenex) durch einen linearen Gradienten mit 7-100% Acetonitril in 0,1% (v/v) Ameisensäure über

einem Zeitraum von 44 min aufgetrennt. Die Flußrate betrug 50 µl/min, die während der Ionisation am Emitter angelegte Spannung 5 kV. Das Massenspektrometer wurde mit einem Daten-abhängigen Aufnahme Modus verwendet, um automatisch zwischen MS und MS/MS zu wechseln. Übersichtsspektren wurden für 1 s aufgenommen, die intensivsten Ionen isoliert und während 1,5 s durch niederenergetischen kollisionsinduzierten Zerfall (CID) fragmentiert. Das Massenspektrometer nahm Daten zwischen 300 und 2000 Da auf, die Spektren wurden unter Verwendung der Xcalibur Software (Thermo) aufgenommen und verarbeitet.

2.7.4 Analyse der Massenspektrometrischen Daten

Zur Proteinidentifikation wurden die MS/MS Spektren an das Datenbank-Suchprogramm MASCOT (Matrix Science, Großbritannien) übermittelt. Es wurde eine *C. albicans* Protein-Datenbank verwendet. Diese basierte auf dem assembly 19 der translatierten offenen Leserahmen der Nukleotidsequenz des Stanford Genom Technologie Zentrums. Als Suchparameter in MASCOT wurden gewählt: bis zu einem fehlenden Schnitt, eine Toleranz von 1,5 Da für Peptidmassen und 1 Da während MS/MS (MALDI-TOF MS: 100 ppm für Peptidmassen und 0,5 Da während MS/MS). Um die Protein-Identifikationen zu bewerten wurden wahrscheinlichkeitsbasierte MASCOT Auswertungen verwendet. Es wurden nur Peptide verwertet, deren Wahrscheinlichkeit (p) für eine zufällig aufgetretene Zuordnung kleiner-gleich als 0,05 war.

2.8 Isolation und Identifikation sekretierter Proteine

Nach zwei Waschschriffen in H₂O wurden die *C. albicans* Zellen aus der ü.N. Kultur in die frischen synthetischen Medien YNB oder a-MEM übertragen und für 7 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus einem Kulturvolumen von 10 ml durch drei Zentrifugationsschritte (3500 × g, 3500 × g und 12000 × g) entfernt. Die im Medium enthaltenen Proteine wurden mittels eines Methanol/Chlorophorm-Gemisches (Wessel und Flugge 1984) präzipitiert. Anschließend wurden die Protein-Pellets in 100 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat gelöst. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde 10 mM Dithiothreitol (DTT) zugegeben und die Probe für 15 min bei 65°C inkubiert. Die nach Abkühlung

folgende Zugabe von Iodacetamid auf eine Endkonzentration von 20 mM führte während der 15minütigen Inkubation im Dunkeln zur Alkylierung der Cysteine. Daraufhin wurde die Probe mit 1 µg Trypsin (sequencing grade, modified; Promega, Mannheim, Deutschland) versetzt und für 5 h bei 37°C inkubiert bevor der Verdau durch Zugabe von Trifluoressigsäure (1% Endkonzentration) gestoppt wurde. Zur massenspektrometrischen Analyse der entstandenen Peptide wurde *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI-TOF, siehe 2.7.1) oder Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelte Elektrosprayionisation (ESI, siehe 2.7.2 und 2.7.3) verwendet.

2.9 Deletion von **SUN41** und Konstruktion der mutierten Stämme

SUN41 wurde im *C. albicans* Stamm SC5314 durch FLP vermittelte, Seiten spezifische Rekombination nach Reuß et al. deletiert (Reuss et al. 2004; Heine 2007). Die flankierenden Regionen (FLR) der kodierenden Sequenz für Sun41 wurde mittels PCR amplifiziert. Hierfür fanden die folgenden Primerpaare Verwendung: orf6.2071_FLR1a_Apa1 (5'-gctggggcccaaccactgtggcatatgaa-3') und orf6.2071_FLR1a_Xho1 (5'-ccgctcgagtgctggaagtactgcacataat-3') für die FLR1; orf6.2071_FLR2_Not1 (5'-ataagaatgcgccgcacccctttctcttctt-3') und orf6.2071_FLR2_Sac2 (5'-tccccgcgaccgaaaaatcttggcaga-3') für die FLR2. Um die flankierenden Regionen in das Plasmid pSFS2A ligieren zu können, wurden einfach vorhandene Schnittstellen in die Primer Sequenzen integriert. Das neue Plasmid pSFS2A-sun1a-2 entstand durch die Klonierung der FLR1 (nach Apa1- und Xho1-Verdau) und der FLR2 (nach NotI- and SacII-Verdau) in den Vektor pSFS2A. Die Herstellung der rekonstruierten Mutanten fand in gleicher Weise statt. Das 1031 bp enthaltende offene Leseraster von *SUN41* wurde mit den Primern orf6.2071_FLR1a_Apa1 (s.o.) und 2071_end_rev_Xho1 (5'-ccgctcgaggggaagaagagaaaaaggggtatc-3') durch PCR amplifiziert und nach vorhergehendem ApaI/XhoI-Verdau zusammen mit der NotI/SacII-verdauten FLR2 in den Vektor pSFS1A kloniert. Alle *C. albicans* Stämme wurden mittels Elektroporation transformiert. Sowohl die Deletionen als auch die Rekonstruktionen wurden mittels Southern Blot und *Real-Time* RT PCR nachgewiesen.

2.10 Isolation der chromosomalen DNA und Southern Hybridisierung

Chromosomale DNA aus *C. albicans* wurde nach der Methode von Hoffman und Winston (Hoffman und Winston 1987) isoliert. Analyse mittels Southern Blot wurde nach Standard Protokollen durchgeführt (Sambrook und Russell 2001). Hierfür wurden 25 µg *Bcl*I verdaute genomische DNS verwendet. Zum Nachweis der Gen-Deletion wurden die Blots mit einem ³²P markierten DNA Fragment hybridisiert. Dieses wurde unter Verwendung der Primer für FLR2 (siehe oben) mittels PCR amplifiziert. Die Rekonstitution wurde mittels einer Sonde detektiert, die mit den Primern SUN41_Rev_4 (5'-accggtgttgagggtgtag-3') und 2071_end_rev_XhoI amplifiziert wurde. Die Southern Blots wurden nach der Hybridisierung für 24 h auf Phosphorschirmen (Fujifilm, Duesseldorf, Deutschland) exponiert. Anschließend wurden die Schirme mit einem FLA-5100 Scanner (Fujifilm) gescannt.

2.11 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Wachstumsrate der *C. albicans* Stämme wurde während des Wachstums in YPD Medium bei 30°C auf einem Rotationsschüttler bestimmt. Mit einem Intervall von einer Stunde wurden Aliquots entnommen, kurz sonifiziert, und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

2.12 Mikroskopie

2.12.1 Lichtmikroskopie

Die *C. albicans* Stämme wuchsen unter Standardbedingungen (2.1) in der exponentiellen Wachstumsphase. Zur mikroskopischen Betrachtung wurde ein Olympus BX 60 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.12.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die *C. albicans* Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen oder deren isolierte Zellwände (2.2) wurden zwei Mal mit H₂O gewaschen, auf Deckgläser getropft und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden sie in einer Lyophylle gefriergetrocknet und nach Standardprotokollen gesputtert. Für die

Rasterelektronenmikroskopie wurde ein 1530 VP Elektronenmikroskop (LEO) verwendet.

2.12.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden nach einem von Reinhard et al. (Reinhard et al. 2003) beschriebenen Protokoll vorbereitet. Nach sechsstündigem Wachstum in YPD Medium wurden 3×10^7 Blastosporen jedes Stammes durch die Zugabe von 2,5% Glutaraldehyd zu den Medien fixiert. Nach einstündiger Inkubation folgten drei Waschschriffe in YPD à 15 Minuten. Zur weiteren Fixierung und Kontrastierung wurden die Ansätze mit 1% OSO_4 eine Stunde inkubiert und danach dreimal in YPD gewaschen. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte in sechs Waschschriffen à 15 Minuten mittels Aceton in steigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 90% und 100%). Zur Einbettung in Kunstharz wurden die zuvor zwei Mal in Aceton gewaschenen Zellen in Spurr's Harz (33% in Aceton) überführt und für eine Stunde in einem geschlossenen Eppendorfgefäß bei RT inkubiert. Nach Öffnung des Gefäßes verdunstete das Aceton über Nacht. Das Zellpellet wurde daraufhin in frischem Spurr (100%) zwei Mal für je eine Stunde bei RT inkubiert. Währenddessen setzten sich die Zellen am Gefäßboden ab. Anschließend wurden die Proben bis zum völligen Aushärten des Harzes zwei Tage bei 80°C gebacken. Die Gefäße wurden entfernt und die Proben mit Hilfe der Leica EM Trim spitz zugeschliffen. Unter Verwendung des Leica Ultracut UCT wurden Dünnschnitte angefertigt. Zur Kontrastierung der Zellen erfolgte durch Inkubation in 1%igem Uranylacetat (3 min) und Bleicitrat (1 min). Zur Visualisierung wurde ein Elektronenmikroskop Zeiss EM 10 verwendet.

2.13 Bestimmung der Zell-Größe

C. albicans Zellen wurden unter Standardbedingungen (2.1) in YPD kultiviert und nach kurzer Sonifizierung durch Zentrifugation geerntet. Um den Kontrast der Zellen zum Hintergrund während der Mikroskopie zu erhöhen, wurde das Zellpellet in Coomassie Brilliant Blau Färbelösung (2.4.2) inkubiert. Nach zwei Waschschriffen in PBS wurden lichtmikroskopische Bilder angefertigt. Der Kontrast der Zellen auf den Bildern wurde unter Verwendung von Adobe Photoshop erhöht. Danach wurde die Fläche einzelner Zellen mit der Software

Scion Image (Scion Corporation) bestimmt. Für die Datenanalyse wurde die Software Origin (OriginLab Corporation) verwendet. Die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ereignisses wurde durch einen two sample independent t-test überprüft.

2.14 Plattentests

Die Kulturen der *C. albicans* Stämme wurden aus ü.N. Kulturen angeimpft, und wuchsen bis zu einer OD_{600} von 1 bevor sie kurz sonifiziert wurden um Zellaggregate zu trennen. Die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe jeweils um den Faktor 10 verdünnt, und etwa 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Zellen in einem Volumen von jeweils 5 μ l auf die Platten ausgebracht und für bis zu 5 Tage bei 30°C (Blastosporen) bzw. 37°C (Hyphen) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (Easyshare Z7590, Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland) oder einem Flachbettscanner (Epson Expression 1680 Pro).

2.15 Calcofluor-Färbung

C. albicans Stämme wurden aus ü.N. Kulturen angeimpft und 6 h in flüssigem Medium (2.1) als Blastosporen oder als Hyphen kultiviert. Nach Ernte der Zellen aus 1 ml Kulturmedium durch Zentrifugation ($16000 \times g$, 5 s) wurden die Zellen mit in PBS gelöstem, 0,5%igem Calcofluor Weiß (Sigma-Aldrich) gefärbt. Nach dreiminütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen und durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Olympus BX60-Mikroskop, UV-Filter Olympus U-MWBV2, Anregung bei 395 nm, Emission bei 455 nm).

2.16 Kongorot in Flüssig-Kulturen

C. albicans Stämme wurden aus ü.N. Kulturen angeimpft und in flüssigem, mit 300 mg/ml Kongorot supplementiert YPD Medium bis in die exponentielle Phase kultiviert.

2.17 Zellwandstabilität

In YPD exponentiell wachsende Zellen wurden mit der rekombinant hergestellten β -1,3-Glucanase QUANTAZYME ylg™ (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) nach

Anleitung des Herstellers behandelt. Sowohl vor als auch jede Minute nach Zugabe von 500 Units/ml Enzym wurde die OD_{600} gemessen. Die Messwerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und der Zeitpunkt bestimmt, bei dem die OD_{600} um die Hälfte abgenommen hatte.

2.18 Polysaccharidbestimmung

Die Zellwände von exponentiell in YPD wachsenden *C. albicans* Blastosporen wurden nach dem in 2.2 beschriebenen Protokoll isoliert. Die Bestimmung der Polysaccharide Menge erfolgte nach einer bereits beschriebenen Methode (Francois 2006). 10 mg trockener isolierter Zellwand wurden in Reacti-Vials (Pierce) mit 75 μ l einer 72%igen Schwefelsäure versetzt, gemischt, und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 950 μ l einer Galactose-Lösung (1 mg/ml in H_2O) hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 4 h bei $100^\circ C$ inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 2,5 ml H_2O und der Transfer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner). Das Reacti-Vial wurde mit weiteren 2,5 ml H_2O gespült die ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt wurden. Der Ansatz wurde durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten $Ba(OH)_2$ -Lösung (40 g/l) neutralisiert und ü.N. bei $4^\circ C$ gelagert. Der pH wurde nochmals geprüft und gegebenenfalls mit $Ba(OH)_2$ - oder H_2SO_4 -Lösung auf einen Wert zwischen 6 und 8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit H_2O auf ein Volumen von 22,5 ml aufgefüllt und das Bariumsulfat-Präzipitat abzentrifugiert (15 min, $4000 \times g$, $4^\circ C$). 1 ml des Überstandes wurde entnommen, nochmals für 5 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und wiederum der Überstand abgenommen. Dessen Auftrennung und Messung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer CarboPac PA1 Anionen-Austausch Säule (Dionex GmbH, Idstein, Deutschland) durch isokratische Elution mit 18 mM NaOH bei einer Flussrate von 1 ml/min während 20 min und gekoppelter Puls-Amperometrischer Detektion. Zur Beurteilung der Menge und Identität der Monomere wurden Retentionszeit und Peakfläche der Spektren mit zuvor gemessenen Standardkurven aus Verdünnungsreihen von Glucosamin, Glucose, Mannose und Galactose verglichen.

2.19 Waschtest

Die *C. albicans* Stämme wurden auf YPD Platten ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen am nächsten Tag auf frische Platten übertragen und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde die Oberfläche mit Wasser bedeckt und für 2 min auf einem Rotationsschüttler bei 75 upm gewaschen.

2.20 Adhäsions Assay

Das Adhäsionsverhalten von *C. albicans* auf verschiedenen Untergrundmaterialien wurde wie bereits beschrieben (Dieterich et al. 2002) mit der Hilfe von 24-well Mikrotiterplatten untersucht. Die quantitativ ermittelten Daten basierten auf 4 unabhängigen Experimenten.

2.21 Zellkultur

Die humane Epithelzelllinie Caco-2 (ATCC HTB-37) wurde in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 1% Gentamycin (10 mg/ml) supplementiertem DMEM bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei einer Dichte von ca. 80% wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 passagiert. Dazu wurde der annähernd konfluente Zellrasen mit PBS- gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,53 mM EDTA; Gibco) für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml supplementierten DMEM gestoppt. Nach dreiminütiger Zentrifugation mit 1700 x g bei RT wurden die Zellen in supplementiertem DMEM aufgenommen und auf die entsprechende Anzahl neuer Flaschen verteilt.

2.22 Biofilm-Bildung

Die Biofilmproduktion verschiedener *C. albicans* Stämme wurde, wie bereits beschrieben (Jin et al. 2003), mit leichten Modifikationen auf sterilen Polystyren-96-well Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) mit flachem Boden induziert. 100 µl einer standardisierten Zellsuspension (3×10^7 Zellen/ml) wurden in jede Kammer (achtmal wiederholt) überführt und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Zellen an den Kammerboden adhären. Als Kontrollen

wurden 8 Kammern verwendet, die in gleicher Weise behandelt wurden, aber keine *Candida* Zellen enthielten. Im Anschluss an die Adhäsionsphase wurde die Zellsuspension wieder abgenommen und die Kammern zwei mal mit je 150 µl PBS gewaschen um die lose adhärenierten Zellen zu entfernen. Nach Zugabe von je 100 µl YNB (+ 2% Glucose) Medium folgte eine weitere Inkubationsphase bei 37°C. Während der nächsten 48 Stunden entwickelte sich der Biofilm woraufhin die Hefezellen mittels des XTT Reduktions Assays quantifiziert wurden (2.23).

2.23 XTT Reduktions Assay

Bei der verwendeten XTT Reduktionsuntersuchungsmethode handelte es sich um die Abwandlung von bereits beschriebenen Methoden (Kuhn et al. 2002). Sowohl die XTT- (Sigma-Aldrich, 1 mg/ml in PBS) wie auch die Menadione-Lösung (Sigma, 1 M in Aceton) wurden immer frisch vor jedem Versuch hergestellt. Die XTT- wurde mit der Menadione-Lösung in einem Volumen-Verhältnis von 1000 zu 1 gemischt. Nach einer zweifachen Wäsche des Biofilms mit je 200 µl PBS wurden je 100 µl der XTT-Menadione-Lösung in die Kammern gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Dunkeln bei 37°C. Je 80 µl Lösung wurden in frische Kammern überführt. Mit Hilfe eines Mikrotiter Platten Lesegeräts (SPECTRAMax PLUS Microplate Spectrophotometer; Molecular Devices Ltd., Sunnyvale, Calif.) konnten Farbänderungen in den Lösungen bei 490 nm gemessen werden. Um den Hintergrund zu eliminieren wurden die Adsorptionswerte der Kontrollkammern von denen der Testkammern abgezogen.

2.24 Invasionstest

Die Konstruktion der humanen rekonstituierten Epithelien erfolgte nach bereits beschriebenen Protokollen (Dieterich et al. 2002; Hernández in press). Aus Rattenschwänzen präpariertes Kollagen wurde in Zellkultureinsätzen ausgebracht und mit 1×10^5 Caco-2 Zellen besiedelt. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt und die Zellen weitere 48 inkubiert während der sie ein konfluentes Monolayer ausbildeten. Anschließend wurde das Medium durch Gentamicin-freies DMEM ersetzt und 45×10^3 *C. albicans* Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen

zugefügt. 22 Stunden nach der Infektion erfolgte die Fixierung nach Entfernung des Mediums durch 50minütige Inkubation in Bouin's Lösung (Crosslinker). Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung entfernt und die Proben in einem Gewebeeinbettautomat (Shandon Citadel™ 1000) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2145, Leica Instruments, Nussloch) in 3 µm dicke Scheiben geschnittenen Proben wurden auf Objektträger überführt und nach der PAS Methode und der Methode von McManus gefärbt und anschließend mikroskopisch (Zeiss Axiovert M200) untersucht (McManus 1989; Papanicolaou 1989). Bei der Färbung werden Cellulose, Mucopolysaccharide, Muco- und Glycoproteine, Glycolipide, ungesättigte Fettsäuren und Phospholipide aus der Pilz-Zellwand magentarot gefärbt. Die Kerne der Epithelzellen erscheinen blau und das Kollagen hellblau.

2.25 Virulenztest

Um die Fähigkeit zur Manifestation einer Candidose von *Candida*-Stämmen *in vivo* zu testen, wurden Virulenzstudien am Versuchstier in Kooperation mit Prof. K. Kuchler an der Medizinischen Universität Wien durchgeführt. Je sechs Mäusen wurden 10^8 Zellen einer *sun41Δ* -Mutante intraperitoneal appliziert. Als Kontrollstamm diente die rekonstituierte *sun41Δ*-Mutante. Der Infektionsverlauf wurde anhand der Mortalitätsrate der infizierten Versuchstiere dokumentiert und gegen die Versuchsdauer aufgetragen.

2.26 Isolation der Gesamt-RNS

C. albicans wurde wie zuvor beschrieben in Suspension kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei $1600 \times g$ gesammelt und in flüssigen Stickstoff getropft um Zellperlen zu erhalten. Diese wurden bei -80°C gelagert. Um die RNS zu isolieren wurden die Zellperlen mechanisch in einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Retschmühle (Retsch, Haan, Deutschland) aufgebrochen. Daraufhin wurde die RNS unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt. Die Qualität der isolierten RNS wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.27 Real-Time RT PCR

1 µg Gesamt-RNS wurde unter Verwendung des QuantiTec Reverse Transcription Kit (Quiagen) in cDNS transkribiert. 2 ng dieser cDNS wurden als Matrize in der real-time PCR eingesetzt, welche in einem LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt wurde. Das LightCycler® 480 Probes Master Kit (Roche) wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurde das in Tabelle 2.2 beschriebene PCR-Programm angewendet. Die verwendeten Sonden (Nummern vermerkt) stammten aus der human Universal ProbeLibrary (Roche), die Gen-spezifischen Primer (TIB MOLBIO, Berlin, Deutschland) sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Zur Analyse der Daten wurde die LightCycler® Software (Roche) verwendet.

Tabelle 2.2: PCR-Programm LightCycler® 480

Programm-Name	Temperatur (°C)	Dauer (hh:mm:ss)	Temp.-Gradient (°C/s)
Prä-Inkubation	95	00:05:00	4,4
Amplifikation (45-55 Zyklen)	95	00:00:10	4,4
	60	00:00:15	2,2
	72	00:01:00	4,4
Kühlung	40	00:00:30	1,5

Tabelle 2.3: Primer für die real-time RT PCR

GEN	ORF-Nummer	Primer 1 Primer 2	Sonden-Nummer
ACE2	orf19.6124	5'-tcatcgccagaaccacatt-3' 5'-ggatatctgtgcggtggtt-3'	60
ACF2	orf19.3417	5'-tcaaacatcagcaacaaccaa-3' 5'-tgtatggattggggcatctt-3'	89
BGL2	orf19.4565	5'-tgaagctgaaaaggaagctttg-3' 5'-gcttcagaaccaaccaagaaa-3'	22
CBK1	orf19.4909	5'-aaccacaacagcagcaacaa-3' 5'-gctgctgctggaatatttgc-3'	5
CHT3	orf19.7586	5'-ggtgctgctggatcttatgg-3' 5'-cccaaagagtatgagcaaattgt-3'	59
ENG1	orf19.3066	5'-caccaacagtttcgcaaga-3' 5'-ttggttaccggtgtgtcg-3'	18
PHR1	orf19.3829	5'-tctggtggaagctccaaatc-3' 5'-ggtgctgctgcttgatgat-3'	6
PHR2	orf19.6081	5'-gtttcattagccgactactttgc-3' 5'-tgtttataccgaaaagtcagcag-3'	9
SCW11	orf19.3893	5'-accacacaatcaccttccact-3' 5'-ttgactagagggttgagggtgag-3'	11
SIM1	orf19.5032	5'-ccagttgttttgggatctgg-3' 5'-tgggttggaaatcaatgaca-3'	131
SUN41	orf19.3642	5'-caggtactgaaaatattggtattcca-3'	10

<i>TDH3</i>	orf19.6814	5'-tgatcaacaacggtaatgacaga-3' 5'-gccgtcaacgatccattc-3'	50
<i>XOG1</i>	orf19.2990	5'-agaatcgtatttgaacatgtaagca-3' 5'-tgctaaatggttgaatggtgtc-3' 5'-gcattatcgtaagcaccctca-3'	82

3 Ergebnisse

3.1 Zellwandproteine

Die Zellwand der pathogenen Pilze stellt ein bevorzugtes Ziel für die Entwicklung von fungiziden Wirkstoffen dar, da diese Struktur im Wirt nicht vorhanden ist. Somit werden bei einer auf sie abzielenden Behandlung weniger Nebenwirkungen erwartet. Speziell die in der Zellwand enthaltenen Proteine werden zu diesem Zweck untersucht. Jedoch wird insbesondere die Untersuchung der kovalent an das Polysaccharidgerüst gebundenen Proteine gerade durch diese Bindung sehr erschwert. Lösungsansätze für dieses Problem bei der Untersuchung beinhalten eine Degradation der Polysaccharidstruktur der Zellwand oder der Verknüpfungen der Proteine an diese, um die Proteine freizusetzen. Daraufhin kann eine PAGE basierte Isolierung der freigesetzten Proteine erfolgen, in deren Anschluss die Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert werden (Pitarch et al. 2002; de Groot et al. 2004). Die teilweise an den Proteinen verbleibenden post-translationalen Modifikationen (PTM) erschweren dabei allerdings sowohl die saubere Auftrennung im Gel wie auch deren Identifikation. Deshalb ist es mit dieser Methode kaum möglich, einen umfassenden Überblick über die kovalent verknüpften Zellwandproteine zu erhalten. Ein alternativer Ansatz beruht auf einer spezifischen proteolytischen Degradation der Proteine direkt in der isolierten Zellwand (siehe 1.1.3) (Schwenk 2003; Sohn et al. 2006). Die dabei freigesetzten Peptide werden aufgefangen und nach einer massenspektrometrischen Sequenzanalyse ihren Ausgangs-Proteinen zugeordnet. Bei Verwendung dieser Methode wird die Problematik der PTM's weitgehend umgangen. Diese Technik sollte in dieser Arbeit optimiert und zur Identifikation von Proteinen eingesetzt werden, die kovalent an die Zellwand von *C. albicans* gebunden sind.

3.1.1 Optimierung des proteolytischen Verdaus

Die oben beschriebene Technik des direkten Verdaus wurde unter Verwendung der Protease Glu-C (Endoproteinase V8 aus *Staphylococcus aureus*) etabliert

(Schwenk 2003). Diese Serin-Protease schneidet Peptidbindungen C-terminal von Glutaminsäure (Glu; E) (Drapeau et al. 1972). Mit einer etwa 100-300fach geringeren Häufigkeit wird nach Asparaginsäure (Asp; D) geschnitten (Birktoft und Breddam 1994).

Zur Optimierung des Assays sollten weitere Proteasen getestet werden. Diese wurden allein oder in Kombination eingesetzt. Ebenso sollte der Effekt der zusätzlichen enzymatischen Degradation des Glucan-Gerüsts durch eine β -1,3-Glucanase getestet werden (Kapteyn et al. 2000).

Um eine möglichst hohe Identifikationsrate zu gewährleisten, musste sichergestellt werden, dass die eingesetzte Protease nicht durch die Zellwand inhibiert wird. Auch durften die freigesetzten Peptide nicht in größerem Umfang durch die Zellwand gebunden werden. Darüber hinaus sollte die Proteasen so gewählt werden, dass die durch sie erzeugten Peptide die für die massenspektrometrische Identifikation notwendige Länge und Zusammensetzung haben (Wenschuh et al. 1998; Nold et al. 1999).

Neben Glu-C wurden die Protease Trypsin und die Chemikalie Bromcyan getestet. Die Serin-Endopeptidase Trypsin schneidet die Peptidbindungen C-terminal von Lysin (Lys; K) und Arginin (Arg; R) (Northrop und Kunitz 1931). Bromcyan (CNBr) spaltet Peptidbindungen C-terminal von Methionin (Met; M) (Gross und Witkop 1962; Morrison et al. 1990).

3.1.2 Zellwandpräparation

Die unterschiedlichen Varianten des Verdau wurden an isolierten Zellwänden von *C. albicans* Blastosporen getestet. Dadurch konnten die erzielten Identifikationen mit aus der Literatur bekannten Zellwandproteinen verglichen werden. Die Zellwände der Blastosporen wie auch der Hyphen wurden nach dem von de Groot et al. beschriebenen Protokoll isoliert (de Groot et al. 2004) (2.5). Dabei wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen und die Zellwände durch mehrere Wasch- bzw. Extraktionsschritte von allen nicht kovalent verknüpften Proteinen befreit. Die isolierten Zellwände konnten im gefriergetrockneten Zustand gelagert, und für den Verdau in der für die jeweilige Protease geeigneten Lösung resuspendiert werden.

3.1.3 Feinstruktur der isolierten Zellwände

Die Effizienz des proteolytischen Verdaus war abhängig von der guten Zugänglichkeit der in den isolierten Zellwänden verbliebenen Proteine. Um einen Eindruck der Oberflächenstruktur der Zellwände zu erhalten, wurden raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Diese Aufnahmen zeigten, dass die Hyphen während des Zellaufschlusses hauptsächlich an den Septen brachen (Bild 3.1 A). Dabei blieb die schlauchförmige Form der Fragmente erhalten. Bei hoher Vergrößerung stellte sich die Zellwand als schwammartige Struktur dar, die deutlich erkennbare Hohlräume in einem dreidimensionalen Netz enthielt (Bild 3.1 B und C).

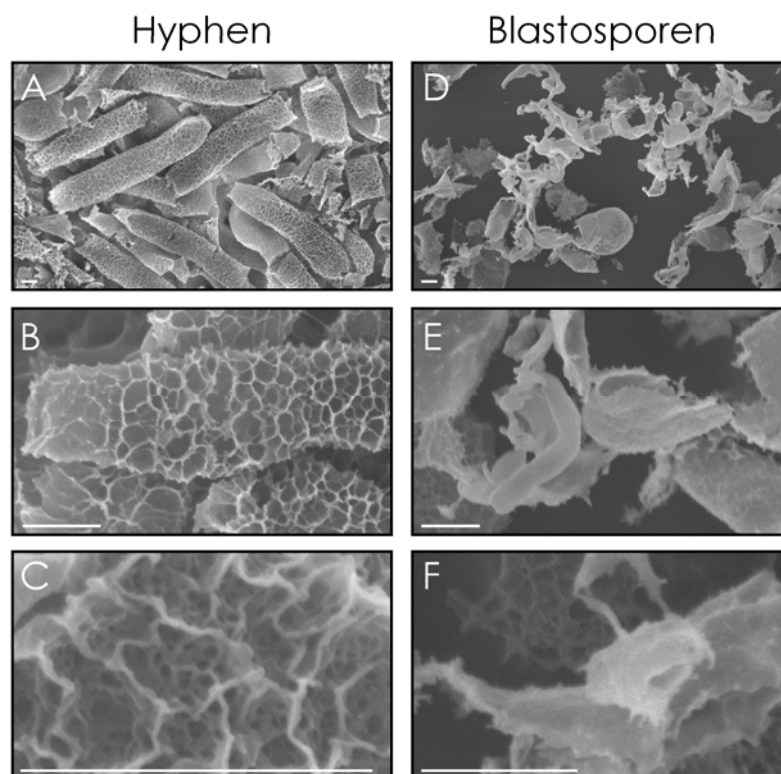


Bild 3.1: REM-Aufnahme isolierter Zellwände

C. albicans Blastosporen (D, E u. F) und Hyphen (A, B u. C) wurden mechanisch aufgeschlossen, die Zellwände durch Zentrifugation gesammelt. Mehrere Wasch- und Extraktionsschritte entfernten cytosolische und lösliche Zellwandproteine. Die isolierten Zellwände wurden nach entsprechender Präparation durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Der Balken entspricht 1 μm .

Die Fragmente der Blastosporen waren weniger klar strukturiert (Bild 3.1 D und E). Zwar waren teilweise aufgeplatzte Zellen zu erkennen, die meisten Strukturen

zeigten jedoch keine Ähnlichkeit mehr mit Blastosporen (Bild 3.1 E). Die Oberfläche war weniger stark strukturiert als bei den Hyphen, die tiefe schwammartige Struktur weniger stark ausgeprägt (Bild 3.1 F).

3.1.4 Proteolytische Degradation

In den Versuchen zur Etablierung der Technik gab es Hinweise darauf, dass die Protease Trypsin durch die Anwesenheit der Zellwand inhibiert wird (Schwenk 2003). Um eine mögliche Hemmung der verwendeten Proteasen durch die Zellwand zu überprüfen, wurde bovines Serum-Albumin (BSA) zusammen mit der Zellwand in einem Verdauungsansatz inkubiert. Die dabei entstandenen Peptide wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung untersucht. Ein Vergleich des Bandenmusters mit einer Probe bei der BSA ohne die Anwesenheit von Zellwand verdaut wurde ergab keinen Unterschied, der auf eine Hemmung des Enzyms schließen ließ (Bild 3.2).

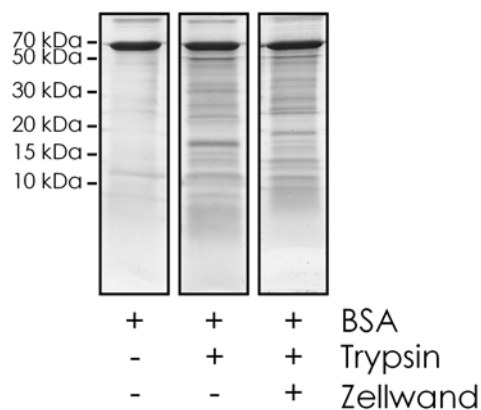


Bild 3.2: Aktivität der Protease in Anwesenheit der isolierten Zellwand

Bovines Serum-Albumin wurde allein oder in Kombination mit aus *C. albicans* Blastosporen isolierter Zellwand zusammen mit Trypsin inkubiert. Nach Entfernung der der Zellwand durch Zentrifugation wurde das Gemisch durch SDS-PAGE (16%) aufgetrennt und die Proteine silbergefärbt.

Die Zellwand hatte also keinen inhibitorischen Effekt auf die Proteasen. In Folge wurde wiederum durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft ob durch Anwesenheit der Proteasen in den Ansätzen Peptide aus isolierten Zellwänden freigesetzt werden. Beispielhaft ist in Bild 3.3 das Ergebnis eines tryptischen Verdauungs gezeigt. Dabei wurde die isolierte Zellwand von exponentiell

wachsenden Blastosporen verwendet. Nur bei Kombination von Enzym und Zellwand in einem Ansatz war ein signifikantes Bandenmuster zu erkennen (Bild 3.3). Der im Verdau eingesetzte Puffer allein führte nicht zu Freisetzung von Proteinen oder Peptiden. Trypsin allein zeigte nur drei schwache Banden.

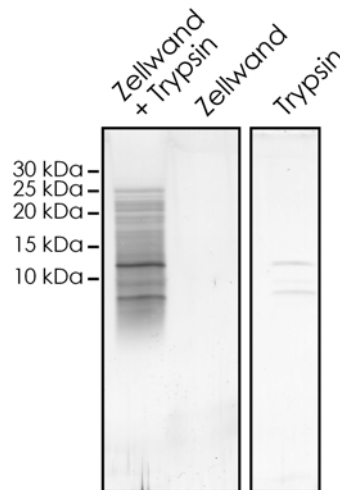


Bild 3.3: Durch Trypsin aus der Zellwand freigesetzte Peptide

Von exponentiell wachsenden *C. albicans* Blastosporen isolierte Zellwand wurde tryptisch verdaut. Nach Entfernung der Zellwand durch Zentrifugation folgte die Auftrennung der Proteine/Peptide im Überstand auf einem 16%igen SDS-PAGE. Dieses wurde anschließend silbergefärbt. Als Kontrolle dienten unter gleichen Bedingungen allein inkubierte Zellwand bzw. Enzym.

3.1.5 Größe der Peptide

Bei der Gel-basierten Auswertung der Verdauprodukte zeigte sich, dass ein Großteil der freigesetzten Peptide größer als 10 kDa war (siehe Bild 3.3). Für eine massenspektrometrische Identifikation mittels der Fragmentierungsmuster sind aber nur Peptide mit Massen zwischen 700 und 4000 Da geeignet. Dabei werden die besten Resultate gewöhnlich im Bereich zwischen 1000 und 2500 Da erreicht. Um zu untersuchen ob sich in dem Peptidgemisch eine ausreichende Zahl Peptide dieser Größe befanden, wurden die Proben mit MALDI-TOF MS analysiert. Dazu wurden isolierte Zellwände von exponentiell wachsenden Blastosporen in unterschiedlichen Verdau-Ansätzen eingesetzt. Die Aufreinigung der Peptide nach dem Stopp der proteolytischen Reaktion erfolgte mittels ZipTip_{C18} Pipettenspitzen. Anschließend wurden die Peptide auf MALDI-Proben-

träger mit vorgelegter Matrix (HCCA) aufgetragen und das Massenspektrum zwischen 700 und 6000 Da aufgenommen. Dabei zeigte es sich, dass die Proteasen aus den Zellwandproteinen auch viele Peptide mit Massen unter 4000 Da freisetzen. Je nach eingesetzter Protease wurden Peptide eines unterschiedlichen Größenbereichs gewonnen. CNBr führte im Schnitt zu einer geringeren Anzahl und größeren Peptiden als Trypsin und Glu-C. Dies erklärt sich durch die geringere Anzahl potentieller Schnittstellen. Beispielhaft sind in Bild 3.4 die Spektren bei Verwendung von Trypsin, CNBr und Glu-C dargestellt.

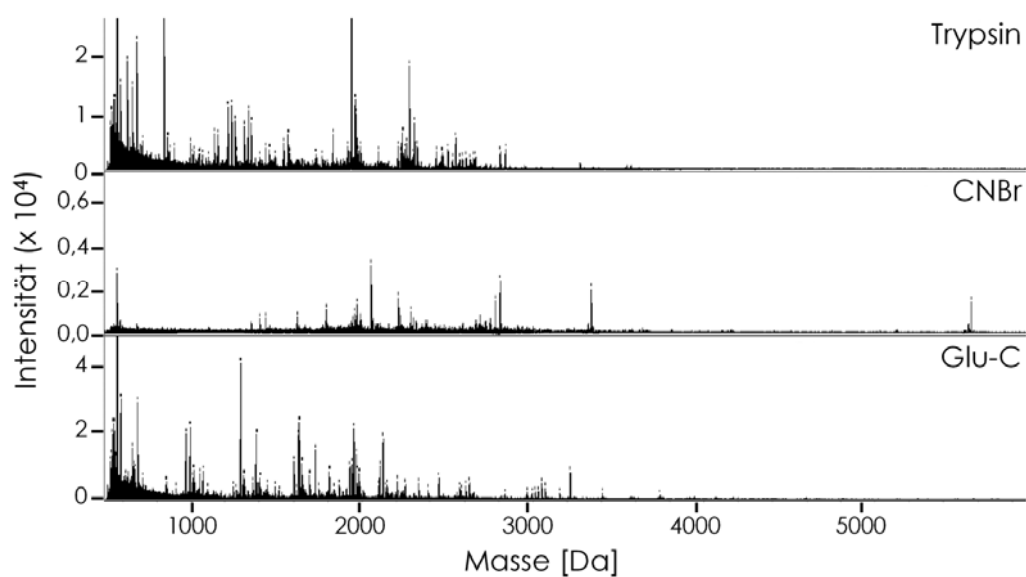


Bild 3.4: MALDI-TOF Massenspektren der von Zellwandproteinen freigesetzten Peptide

Isolierte Zellwand aus exponentiell wachsenden Blastosporen wurde mit Trypsin, CNBr bzw. Glu-C inkubiert. Die freigesetzten Peptide wurden mittels ZipTip_{C18} aufgereinigt und die Massen durch MALDI-TOF MS bestimmt.

Die durch CNBr frei werdenden Peptide wurden einem zweiten Verdau durch Trypsin unterzogen um kleinere Peptide zu erhalten. Die MALDI-TOF MS Analyse der dabei entstandenen Peptide zeigte dass dadurch eine größere Anzahl Peptide im optimalen Massenbereich entstand (Bild 3.5).

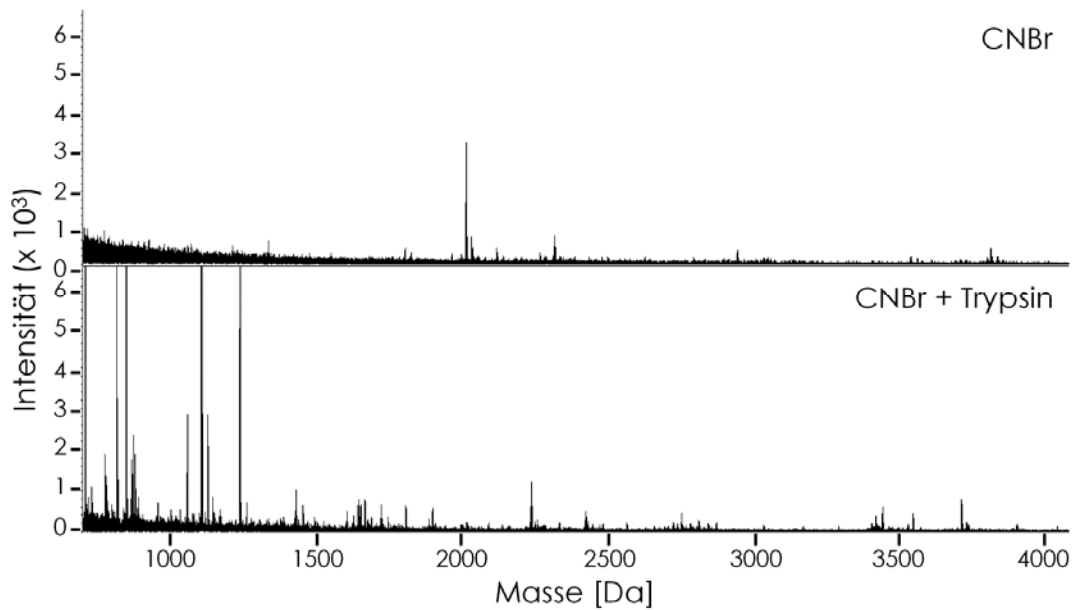


Bild 3.5: Sequenzieller Verdau durch CNBr und Trypsin

Isolierte Zellwand aus *C. albicans* Hyphen wurde mit CNBr inkubiert. Die freigesetzten Peptide wurden durch Acetonfällung aufgereinigt und tryptisch verdaut. Vor und nach der Inkubation mit Trypsin wurden Peptide mittels ZipTip_{C18} aufgereinigt und die Massen durch MALDI-TOF MS bestimmt.

Eine Identifikation von Proteinen durch den *peptide-mass-fingerprint* (PMF) mittels des Datenbank-Suchprogrammes MASCOT lieferte bei keinem der aufgenommenen Massenspektren signifikante Ergebnisse.

3.1.6 Identifikationen durch MS/MS

Um die Peptide dieser komplexen Gemische zu identifizieren, war es notwendig sie aufzutrennen. Für diesen Zweck wurde die *reversed-phase* Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (rp-HPLC) verwendet. Um den Verlust an Peptiden möglichst gering zu halten wurde ein experimenteller Aufbau gewählt bei dem sich die von der Chromatographiesäule eluierten Peptide direkt in einem Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometer messen und fragmentieren ließen (2.7). Alle Messungen mit dem QSTAR Pulsar hybrid qTOF wurden dabei vom Proteom Centrum Tübingen durchgeführt.

3.1.6.1 Blastosporen

Als Ausgangsmaterial dienten isolierte Zellwände von in YPD bei 30°C exponentiell wachsenden *C. albicans* Blastosporen. Diese Zellwände wurden den Proteasen Glu-C und Trypsin, bzw. CNBr ausgesetzt. Die aus dem Verdau durch Glu-C und CNBr gewonnenen Peptide wurden zum Teil noch zusätzlich mit Trypsin nachbehandelt. Ein weiterer Versuchsansatz beinhaltete die im Vorfeld zum tryptischen Verdau der Zellwandproteine ablaufende Degradation des Glucan-Netzwerkes durch eine β -1,3-Glucanase. Im Anschluss an den Verdau folgte die Aufreinigung der freigesetzten Peptide und ihre Bindung an eine C18 Chromatographiesäule. Von dieser wurden sie durch einen Gradienten mit organischem Lösungsmittel eluiert. Auf die Elektrospray-Ionisation folgte die Bestimmung ihrer Masse bzw. die ihrer durch Kollision mit einem inerten Gas entstandenen Fragmentmassen in einem qTOF Massenspektrometer. Nach Auswertung der Spektren wurde die Sequenzanalyse und die Zuordnung der Peptide zu ihren Ausgangsproteinen mit Hilfe des Programms MASCOT vorgenommen.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Gewertet wurden nur Proteine die in mindestens zwei unabhängigen Experimenten gefunden wurden. Zusätzlich ist in der Tabelle vermerkt, welche der identifizierten Proteine die für GPI-Zellwandproteine charakteristische Aminosäure-Sequenz beinhalten.

Insgesamt wurden 33 Proteine identifiziert. Davon sind sechs potentiell über GPI-Anker an die Zellwand gebunden. Bei vier Identifikationen (Nr. 2, 5, 6 und 13) ließen sich die gefundenen Peptide mehreren Proteinen gleichermaßen zuordnen. Diese wurden jeweils nur als ein Protein gewertet. Kar2p oder Hsp70p wurde durch nur ein Peptid identifiziert, welches nur durch die Kombination von CNBr und Trypsin frei wurde. Ebenfalls nur bei dieser Variante des Verdau wurden Hxt5p und Hxt3p gefunden. Alle weiteren Proteine wurden in mindestens zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen durch mehrere Peptide identifiziert. Die meisten Identifikationen (25) wurden durch den kombinierten Einsatz von CNBr und Trypsin erreicht, gefolgt von einzeln verwendetem CNBr und Trypsin mit je 21 gefundenen Proteinen. Die Vorbehandlung der Zellwand mit einer β -1,3-

Glucanase führte im Vergleich zum direkten tryptischen Verdau zu einer geringeren Zahl identifizierter Proteine. Allerdings wurden durch die Degradation des Glucan-Netzwerkes die drei Proteine Phr2p, Als1-2p und Rps31p/Ubi4p gefunden, die sich bei der direkten Trypsinierung nicht detektiert ließen.

Tabelle 3.1: Identifizierte Proteine in isolierten Blastosporen Zellwänden

Nummer	ORF-Nummer (Assembly19)	Name	Protein-Funktion	GPI-Anker prognostiziert*	Analyse Art (+ Anzahl zur Identifikation verwendeter Peptide)						
					A	B	C	D	E	F	
1	orf19.1065	Ssa2p	Chaperonin der HSP70 Familie	-	5	-	-	-	10	10	-
2	orf19.1435/orf19.382/orf19.5119	Tef1p/Tef2p/Tef3p	Translatios-Elongations Faktor EF-1 alpha	-	3	1	1	10	5	3	-
3	orf19.1601	Rpl3p	60S große Untereinheit des ribosomalen Proteins L3.e	-	-	1	3	8	6	-	-
4	orf19.1779	MP65p	Mannoprotein bei 65kDa	-	6	-	1	-	4	3	-
5	orf19.2013/orf19.4980	Kar2p/Hsp70p	dnaK/HSP70/ BiP Familie ATPase und Chaperon beteiligt an der Translokation entstehender Polypeptide durch die ER-Membran	-	-	-	-	-	1	-	-
6	orf19.2020/orf19.2021/orf19.2023	Hxt6p/Hxt5p/Hxt3p	Hexose-Transporter	-	-	-	2	3	1	2	-
7	orf19.2021	Hxt5p	Hexose-Transporter	-	-	-	2	-	-	-	-
8	orf19.2023	Hxt3p	Hexose-Transporter	-	-	-	4	-	-	-	-
9	orf19.2551	Met6p	Methionin Synthetisierende 5-Methyltetrahydropteroylglutamat-Homocystein Methyltransferase	-	3	-	1	-	-	-	-
10	orf19.2706	Grn1p	Zellwand-Protein einer Familie möglicher Glycosidasen	+	-	-	1	1	9	6	-
11	orf19.2877	Pdc1p	Pyruvat-Decarboxylase	-	5	1	1	7	11	3	-
12	orf19.3010.1	Ecm33p	GPI verankertes Oberflächen-Protein	+	3	-	-	1	5	4	-
13	orf19.3087/orf19.6771	Rps31p/Ubi4p	kleine Untereinheit eines ribosomalen Proteins	-	-	1	-	-	-	2	-
14	orf19.3575	Cdc19p	Pyruvate-Kinase	-	4	-	1	10	6	3	-
15	orf19.3651	Pgk1p	Phosphoglycerat-Kinase	-	3	1	2	12	8	1	-
16	orf19.3888	Pgi1p	Phosphoglucosomerase	-	3	-	1	-	-	-	-
17	orf19.3895	Cht2p	Chitinase 2 Vorläufer	+	5	4	-	4	7	7	-
18	orf19.395	Eno1p	Enolase I	-	2	-	1	12	11	4	-
19	orf19.3997	Adh1p	Alkoholdehydrogenase 1	-	-	-	-	1	1	-	-
20	orf19.4152	Eff3p	Translatios-Elongations Faktor	-	7	1	8	9	13	5	-
21	orf19.4618	Fba1p	Fructose-Bisphosphat Aldolase	-	-	-	2	5	-	-	-
22	orf19.4980	Hsp70p	Hitzeschock Protein 70	-	4	-	-	8	8	5	-
23	orf19.5024	Gnd1p	6-Phosphogluconat Dehydrogenase	-	-	-	1	4	-	-	-
24	orf19.5305	Rhd3p	während Hyphenbildung reprimiertes konserviertes Protein	+	-	-	-	4	7	7	-
25	orf19.5383	Pma1p	Plasmamembran H+-ATPase	-	-	-	2	15	16	3	-
26	orf19.5741	Als1-2p	Agglutinin ähnliches Protein 1	+	-	-	-	1	-	2	-
27	orf19.5788	Eff2p	Translatios-Elongations Faktor 2 (EF-2)	-	4	1	4	13	15	-	-
28	orf19.5949	Fas2p	Fettsäure-Synthetase alpha Untereinheit	-	1	-	3	-	-	-	-
29	orf19.6081	Phr2p	pH reguliertes Zellwand Protein	+	-	-	-	3	-	3	-
30	orf19.6367	Ssb1p	Hitzeschock Protein der HSP70 Familie	-	4	-	-	9	11	3	-
31	orf19.6515	Hsp90p	Hitzeschock Protein 90	-	1	-	2	4	-	-	-
32	orf19.6814	Tdh3p	Glyceralddehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	-	1	-	-	5	5	-	-
33	orf19.979	Fas1p	fatty-acyl-CoA Synthase, beta-Kette	-	-	-	5	-	1	-	-

A: Glu-C; B: Glu-C+Trypsin; C: CNBr; D: CNBr+Trypsin; E: Trypsin; F: Quantazyme+Trypsin

* Sequenzanalyse mit GPI-SOM (Fankhauser et al. 2005)

3.1.6.2 Hyphen

In den Versuchen mit der isolierten Zellwand von Blastosporen hatte sich gezeigt, dass keine der eingesetzten Analysevarianten allein einen umfassenden Überblick über die Proteine in den Zellwänden ermöglicht. Deshalb wurden auch bei der Detektion der Proteine in der hyphalen Zellwand mehrere unterschiedliche Ansätze gewählt. Es wurden dabei isolierte Zellwände von *C. albicans* verwendet, die in α -MEM unter Hyphen induzierenden Bedingungen bei 37°C gewachsen waren. Des Weiteren wurde das in 3.1.6.1 beschriebene Verfahren eingesetzt. Ein Teil der Peptidgemische wurde zusätzlich zum QSTAR Pulsar Hybrid qTOF Massenspektrometer in einem Finnigan LCQ^{DECA} Massenspektrometer analysiert, um die Auswirkungen unterschiedlicher Analysetechniken auf die Identifikationsrate beurteilen zu können (2.7.2, 2.7.3). Insgesamt wurden 18 Proteine identifiziert, davon wiesen 14 die für GPI-Anker typische Sequenz auf (Tabelle 3.2). Die Kombination von CNBr und Trypsin ergab die meisten Identifikationen. Das Aufbrechen des Glucan-Netzwerkes mit einer β -1,3-Glucanase vor der Inkubation mit Trypsin erhöhte die Zahl identifizierbarer Proteine von 10 auf 15. Durch Glu-C allein ließen sich 9 Proteine identifizieren, durch Kombination mit Trypsin verringerte sich diese Zahl auf 7. Als4p und Csa2p wurden als einzige Proteine nur in einer Analyseart (CNBr+Trypsin) und jeweils nur durch ein Peptid identifiziert.

Tabelle 3.2: Identifizierte Proteine in isolierten Hyphen Zellwänden

QSTAR Pulsar Hybrid qTOF		Finnigan LCQ ^{DECA}								
Nummer	ORF-Nummer (Assembly19)	Name	Protein-Funktion	GPI-Anker prognostiziert*	Analyse Art (+ Anzahl zur Identifikation verwendeter Peptide)					
					A	B	C	D	E	F
1	orf19.1327	Rbt1p	Reprimiert durch Tup1, verwandt mit HWP1	+	-	-	n/a	1	-	1
2	orf19.1435/orf19.382/orf19.5119	Tef1p/Tef2p/Tef3p	translational elongation factor EF-1 alpha	-	-	1	n/a	4	-	-
3	orf19.1690	Tos1p	Konserviertes hypothetisches Protein	-	-	1	n/a	1	-	-
4	orf19.1779	MP65p	Mannoprotein bei 65kDa	-	-	1	n/a	1	-	1
5	orf19.1816	Als3p	Agglutinin ähnliches Protein 3	+	1	3	n/a	5	6	4
6	orf19.2060	Sod5p	Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase	+	5	-	n/a	7	4	4
7	orf19.2706	Crh11p	Zellwand-Protein einer Familie möglicher Glycosidasen	+	1	1	n/a	5	4	4
8	orf19.3010.1	Ecm33p	GPI verankertes Oberflächen-Protein	+	2	-	n/a	2	-	1
9	orf19.3829	Phr1p	für die Morphogenese benötigtes pH reguliertes GPI-verankertes Membran-Protein	+	2	-	n/a	3	1	2
10	orf19.3895	Cht2p	Chitinase 2 Vorläufer	+	3	2	n/a	5	2	3
11	orf19.4035	Pga4p	GPI verankertes Oberflächen-Protein	+	1	-	n/a	2	-	-
12	orf19.4555	Als4p	Agglutinin ähnliches Protein 4	+	-	-	n/a	1	-	-
13	orf19.4975	Hyr1p	Hyphal reguliertes Protein	+	-	1	n/a	2	-	-
14	orf19.5305	Rhd3p	Konserviertes Protein, während Hyphen-Entwicklung reprimiert	+	1	-	n/a	6	-	3
15	orf19.5636/orf19.5674	Rbt5p/Pga10p	Reprimiert durch TUP1 Protein 5/ Glycosyl-Phosphatidylinositol Protein ähnlich wie RBT5	+	2	-	n/a	-	1	1
16	orf19.5741	Als1-2p	Agglutinin ähnliches Protein 1	+	-	-	n/a	2	-	2
		Name	Protein-Funktion	GPI-Anker prognostiziert*	Analyse Art (+ Anzahl zur Identifikation verwendeter Peptide)					
					A	B	C	D	E	F
1	orf19.1816	Als3p	Agglutinin ähnliches Protein 3	+	n/a	n/a	n/a	4	3	3
2	orf19.2060	Sod5p	Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase	+	n/a	n/a	n/a	3	3	3
3	orf19.3117	Csa2p	Mycel Oberflächen Antigen ähnlich wie RBT5	-	n/a	n/a	n/a	1	-	-
4	orf19.5636/orf19.5674	Rbt5p/Pga10p	Reprimiert durch TUP1 Protein 5/ Glycosyl-Phosphatidylinositol Protein ähnlich wie RBT5	+	n/a	n/a	n/a	-	1	1
5	orf19.7030	Ssr1p	Zellwand-Mannoprotein sekretorisches Stress-Antwort Protein	+	n/a	n/a	n/a	-	1	1

* Sequenzanalyse mit GPI-SOM (Fankhauser et al. 2005)

A: Glu-C; B: Glu-C+Trypsin; C: CNBr; D: CNBr+Trypsin; E: Trypsin; F: Quantazyme+Trypsin

Bei Verwendung des an ein QSTAR Pulsar Hybrid qTOF Massenspektrometer gekoppelten Systems ließen sich 16 Proteine identifizieren (Tabelle 3.2 A). Das Finnigan LCQ^{DECA} Massenspektrometer lieferte 5 Identifikationen (Tabelle 3.2 B). Darunter befinden sich die zwei nicht durch das QSTAR detektierten Proteine Cas2p und Ssr1p. Bei einem Vergleich der Massenspektrometer muss beachtet werden dass sich beide Systeme zusätzlich durch die jeweils gekoppelte rp-HPLC unterscheiden.

3.1.7 Effizienz der unterschiedlichen Degradationsverfahren

Zur Beurteilung der Effizienz der unterschiedlichen Degradationsverfahren und der damit verbundenen Zahl an Identifikationen wurde ausgewertet wie viele Proteine bei der jeweils verwendeten Analyseart gefunden wurden. Dazu parallel wurde die durchschnittlich pro Protein gefundene Zahl an Peptiden berechnet (Tabelle 3.3). Wie schon oben (3.1.6.1, 3.1.6.2) erwähnt, ergab die sequenzielle Verwendung von CNBr und Trypsin die höchste Identifikationsrate. Gefolgt wurde sie von allein verwendetem Trypsin bzw. CNBr. Bei der Zahl durchschnittlich pro Proteinidentifikation verwendeter Peptide zeigte sich, dass hier die Verwendung von Trypsin allein oder gefolgt auf eine CNBr vermittelten Spaltung die höchsten Werte ergab. Bei Blastosporen lag sowohl die Zahl identifizierter Proteine wie die der pro Identifikation verwendeten Peptide deutlich höher als bei Hyphen.

Tabelle 3.3: Identifikationseffizienz bei unterschiedlicher Degradation

	Wachstumsform	Gerät	Analyse Art *					
			A	B	C	D	E	F
Anzahl identifizierter Proteine	Blastosporen	QSTAR Pulsar Hybrid qTOF	18	8	21	25	21	18
	Hyphen	QSTAR Pulsar Hybrid qTOF	9	7	n/a	15	6	11
	Hyphen	Finnigan LCQ ^{DECA}	n/a	n/a	n/a	3	4	4
Mittlere Zahl Peptide pro identifiziertem Protein	Blastosporen	QSTAR Pulsar Hybrid qTOF	3,6	1,4	2,3	6,4	7,6	3,7
	Hyphen	QSTAR Pulsar Hybrid qTOF	2,0	1,4	n/a	3,1	3,0	2,4
	Hyphen	Finnigan LCQ ^{DECA}	n/a	n/a	n/a	2,7	2,0	2,0

* A: GluC; B: GluC+Trypsin; C: CNBr; D: CNBr+Trypsin; E: Trypsin; F: Quantazyme+Trypsin

3.1.8 Sequenzabdeckung der identifizierten Proteine

Aufgrund des in 1.1.3 dargestellten Modells zur Analyse von GPI-Zellwandproteinen ist davon auszugehen, dass durch die starke Glycosylierung nur ein Teil der Sequenz für die Proteasen zugänglich ist, oder durch die Massenspektrometrie identifiziert werden kann. Um zu überprüfen aus welchen Regionen der identifizierten Proteine die gefundenen Peptide stammten, wurde deren Lokalisation unter Berücksichtigung der potentiellen Glycosylierungsstellen in der gesamten Proteinsequenz analysiert.

Dazu wurden die Aminosäuresequenzen mit den im Internet frei zugänglichen Programmen NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) und NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) auf wahrscheinliche O- und N-Glycosylierungsstellen hin untersucht. Anschließend wurden die in allen Experimenten gefundenen Peptide der jeweiligen Proteine in der Sequenz markiert. Die Ergebnisse sind beispielhaft für Crh11p, Als3p und Pgk1p in Bild 3.6 dargestellt. In den potentiell GPI verankerten Proteinen Crh11p und Als3p findet sich im Gegensatz zu Pgk1p ein C-terminaler Bereich, der viele mögliche Glycosylierungsstellen aufweist. Alle die für die Identifikation dieser Proteine verwendeten Peptide stammen aus dem N-terminalen Bereich, der diese Stellen nicht beinhaltet. Dahingegen sind die von Pgk1p gefundenen Peptide über die gesamte Sequenz verteilt und lassen keinen größeren Bereich aus. Die hier dargestellten Ergebnisse spiegeln die Resultate aller auf diese Art durchgeführten Analysen wider.

>orf19.2706 Assembly 19, Contig19-10158 (92919, 94280) CDS, translated using codon table 12 (453 residues)

MKFTTLATIASTLLFAANANADTCNPLKSSDCSPVPALGSSFLEKFDNGLGPHFESLKKQGTID
 SGSNGLSLTMKKRFDNPSFKSNFYIMFGRVEVVLKGAEGKGIVSSFYLSDDLDEIDIEMFG
 GDPYQWQSNFYIKGNTATYDRGGYHDIANPLKDYHTYVIDWTKDAVTWSVDGSVIRTIPKD
 NAQGFQSPMAIYAGIWAGGDPSNQPGTIDWAGGITDYSQAPFTMGIKSVLVADYSSG
KQYSYSDQSGSWESIKADGGKVNGRYDQAQDDIKKLESGQSVDSNDSSSSPSASSDSSS
TSSASSSSSSSPSSTTSSSSSSSSSSSSSSSSSEKSNVPSASVIVFIGTKGGDKTTVTSSSGVSV
TSASVSTAAGTTSGSANSAPASAASSTASTVFISTGDAAPSSSASEKPSVSTTENNGAVSVAKT
 TSLFGFVALIGFLFV

>orf19.1816 Assembly 19, Contig19-10129 (15287, 17932) CDS, translated using codon table 12 (882 residues)

MLQQYTLIIYLSVATAKITGVFNSFNLSLWSNAATYNYKPGTPTWNAVLGWSLDGTSAS
 PGDTFTLNMPCVFKFTTSQTSVDLTAHGKYATCQFQAGEEFMTFSTLTCTVSNLTPSIKALG
TVTLPLAFNVGGTGSVDLEDSKCFTAGTNTVTFNDGGKKISINVDNFERSNVDPKGYLTD
SRVIPSLNKVSTLFVAPQCANGYTSGMTGFANTYGDVQIDCSNIHVGITKGLNDWNYPVSS
ESFSYTKTCSSNGIFITYKNVPAGYRPFVDAISATDVNSYTLSYANEYTCAGGYWQRAPFTLRW
 TGYRNSDAGSNGIVIVATRTVTDSTAVTTLPFDPNRDKTKTIEILKPIPTTTTITSYVGVTTSTYTKT
 APIGETATVIVDIPYHTTTVTSTKWTGTTTSTHTNPTDSIDTVIVQVPSNPNTVTTTEYWSQSFAT
 TTTITGPPGNTDTVLIREPPNHTVTTTEYWSSEYTTTSTFTAPPGGTDVVIKEPPNPTVTTTEYWS
 TTTTITVAPPGGTDTVIIREPPNHTVTTTEYWSQSYTTTTVIAPPGGTDSVIIREPPNPTVTTTEYWS
 QSYATTTTITAPPGETDTVLIREPPNHTVTTTEYWSQSYATTTTITAPPGETDTVLIREPPNHTVTTTE
 YWSQSYTTTTVIAPPGGTDSVIKEPPNPTVTTTEYWSQSYATTTTITAPPGETDTVLIREPPNHTV
 TTTEYWSQSYATTTTITAPPGETDTVLIREPPNHTVTTTEYWSQSFATTTTITVAPPGGTDTVIIREPP
 NHTVTTTEYWSQSFATTTTITVAPPGGTDTVLIREPPNPTVTTTEYWSQPYTTTTVIAPPGGTDTVI
 IYDTMSSSEISSFRPHYTNH

>orf19.3651 Assembly 19, Contig19-10185 (29063, 30316) CDS, translated using codon table 12 (417 residues)

MSLSNKLKSLVDLDVAGKRVFIRVDFNVPLDGKTITNNQRIVAALPTIKYVEEHKPKYIVLASHL
 GRPNGERNDKYS LAPVATELEKLLGQKVTFLNDCVGPVTKAVENAKDGEIFLLENLRYHIE
EEGSSKDKDGKKVKADPEAVKKFRQELTSLADVINDAFGTAHRAHSSMVGLEVPQRAA
GFLMSKELEYFAKALENPERPFLAILGGAKVSDKIQLIDNLLDKVDMLIVGGGMAFTFKILN
KMPIGDSLDFEAGAKNVEHLVEKAKKNNVELILPVDFVTADKFDKDAKTSSATDAEGIPDN
 WMGLDCGPKSVELFQQAVAKAKTIVWNGPPGVFEFEKFAANGTKSLDAAVKSAENGNIV

Bild 3.6: Sequenzanalyse identifizierter Proteine

Die in isolierten Zellwänden gefundenen Proteine wurden mit den Programmen NetOGlyc und NetNGlyc nach potentiellen Glycosylierungsstellen durchsucht und diese in der Aminosäuresequenz durch Fettdruck markiert. Durch identifizierte Peptide abgedeckte Bereiche sind unterstrichen. Dargestellt sind Crh11p (orf19.2706, Hyphen-Zellwand), Als3p (orf19.1816, Hyphen-Zellwand) und Pgl1p (orf19.3651, Blastosporen-Zellwand).

3.1.9 Markierung der Zellwandproteine

Bei der Identifikation der kovalent an die Zellwand von *C. albicans* gebundenen Proteine hatte sich ein bemerkenswerter Unterschied zwischen Blastosporen und Hyphen gezeigt. Der Anteil Proteine ohne charakteristische GPI-Ankersequenz war in Blastosporen deutlich höher als in Hyphen (Vergleich Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Um zu überprüfen, ob diese „atypischen“ Proteine auf eine, vorwiegend bei Blastosporen auftretende, Kontamination der Zellwand während der Isolation zurückzuführen waren, wurden die Zellwandproteine spezifisch mit Biotin markiert (Urban et al. 2003). Zu diesem Zweck kam ein aktiviertes Biotinderivat zum Einsatz, das aufgrund einer Sulfongruppe die Plasmamembran nicht durchdringen kann (Cole et al. 1987). Von derart markierten Blastosporen und Hyphen wurde die Zellwand isoliert (3.1.2) und anschließend in den unterschiedlichen Verdauen (3.1.4) eingesetzt. Die dabei freigesetzten Peptide ließen sich durch Affinitätschromatographie vom nicht markierten Rest abtrennen. Dafür wurde an Sepharosepartikel gebundenes Neutravidin verwendet. Dieses Biotin/Avidin System zeichnet sich durch seine hohe Spezifität aus (Wilchek und Bayer 1990). Bei der anschließenden massenspektrometrischen Identifikation wurde speziell nach Peptiden gesucht, deren Markierung (Massenzuwachs von 339,162 Da an einem Lysin, Bild 3.7) ihren Ursprung von einem Protein der Zellwand nachwies. Es wurden sowohl Peptidgemische vor als auch nach Affinitätsaufreinigung untersucht. An jeweils zwei Peptiden aus Blastosporen und Hyphen ließ sich die Markierung mit hinreichender Sicherheit ($p \leq 0,05$) detektieren (Tabelle 3.4). Die in den Peptiden markiert vorgefundenen Lysine sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Tabelle 3.4: Biotinylierte Peptide

ORF-Nummer ^a	Protein-Name	Peptid-Sequenz	Modifikation	p-Wert ^b	Wachstumsform
orf19.4097	Hypoth. Protein	VADLSVILK	Biot_LC (K)	$2,40 \times 10^{-2}$	Blastosporen
orf19.3895	Cht2p*	FAKDTSK	Biot_LC (K)	$1,30 \times 10^{-2}$	Blastosporen
orf19.2060	Sod5p*	TSKSNIETIK	Biot_LC (K)	$7,80 \times 10^{-4}$	Hyphen
orf19.1816	Als3-1p*	SNVDPKGYLTDSR	Biot_LC (K)	$3,50 \times 10^{-2}$	Hyphen

* enthält einen durch GPI-SOM prognostizierten GPI-Anker (Fankhauser und Maser 2005)

^a Nummer des offenen Leserahmens (ORF) nach assembly 19

^b Erwartungswert des Peptid-Treffer, kleiner 5×10^{-2} bedeutet Identität oder beträchtliche Homologie

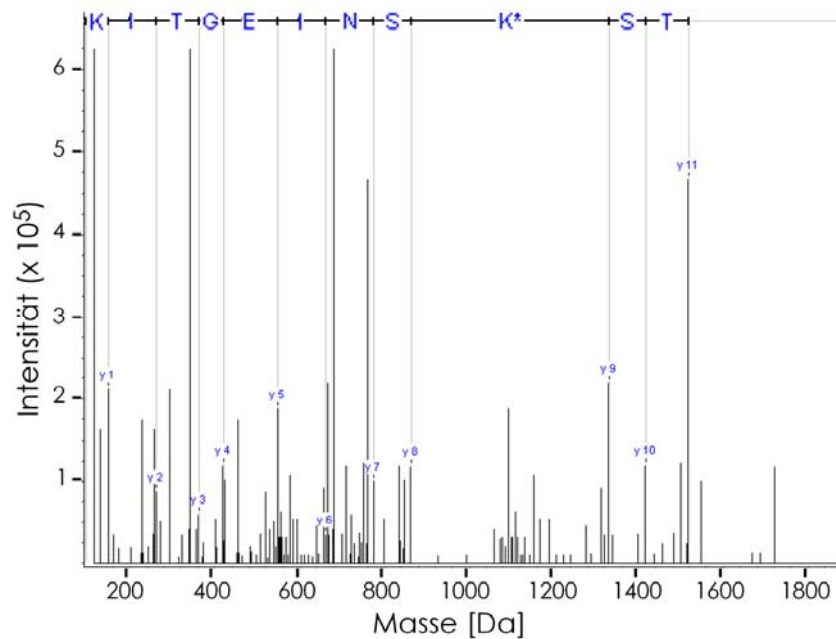


Bild 3.7: CID-Fragmentmuster eines biotinylierten Peptides

C. albicans Zellwandproteine wurden spezifisch mit Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert. Nach Isolation der Zellwand und Extraktion der löslichen Proteine wurden die in der Zellwand verbliebenen Proteine proteolytisch verdaut. Mittels massenspektrometrischer Analyse der dabei freigesetzten Peptide konnte die Markierung nachgewiesen werden. Gezeigt ist das Fragmentmuster des Peptides mit der Aminosäuresequenz TSKSNIEGTIK, die durch MASCOT identifizierte y -Ionen Serie wurde eingezeichnet.

3.1.10 Korrelation von Proteom und Transkriptom

Die Analyse des *C. albicans* Transkriptoms zeigte deutliche Unterschiede in der Expression potentieller Zellwandproteine während des Wachstums als Blastosporen und Hyphen (Sohn et al. 2003). Diese Veränderungen ließen sich auch in den identifizierten Proteinen aus den isolierten Zellwänden nachvollziehen. Dazu wurde für alle in hyphalen Zellwänden gefundenen Proteine geprüft, ob diese auch bei der Untersuchung der Blastosporen-Zellwände auftraten (Tabelle 3.5). 11 der 18 Proteine fanden sich nur in hyphalen Zellwänden, die restlichen sieben sowohl in Blastosporen wie Hyphen (konnte den zur Identifikation verwendeten Peptiden mehr als ein Protein gleichermaßen zugeordnet werden, wurde dies als ein Protein gezählt). Zur weiteren Analyse wurden von Nicole Hauser zur Verfügung gestellte Microarray Daten

hinzugezogen (Nicole Hauser, unveröffentlichte Daten). Aus diesen konnte die Stärke der Transkription der meisten für *C. albicans* beschriebenen Gene ermittelt werden. Deren Transkription wurde während des Wachstums als Blastosporen (YPD, 25°C) und Hyphen (α -MEM, 37°C) betrachtet, und der Unterschied der Transkriptmenge zwischen diesen beiden Wachstumsformen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die nur in Hyphen identifizierten Proteine in dieser Wachstumsform zumeist eine im Vergleich zu Blastosporen verstärkte (Regulation $\geq 1,5$) Transkription aufwiesen (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Korrelation der Identifikation mit der Transkription

Protein-Name	Proteine identifiziert in der Zellwand von:		Signalintensität in Blastosporen*	transkriptionelle Regulation (Hyphen zu Blastosporen)*
	Blastosporen	Hyphen		
Rbt5p**; Pga10p**	-	+	2,16 x 10 ⁴ ; 1,62 x 10 ⁴	85,8; 5,3
Rbt1p**	-	+	2,68 x 10 ⁴	24,1
Tos1p	-	+	1,17 x 10 ⁵	1,4
Als3p**	-	+	n/a	n/a
Sod5p**	-	+	1,61 x 10 ⁴	1,2
Phr1p**	-	+	1,57 x 10 ⁵	3,2
Pga4p**	-	+	2,25 x 10 ⁵	1,6
Hyr1p**	-	+	1,71 x 10 ⁴	2,5
Csa2p	-	+	2,01 x 10 ⁴	6,8
Als4p**	-	+	1,95 x 10 ⁴	1,4
Ssr1p**	-	+	1,13 x 10 ⁵	1,9
MP65p	+	+	2,79 x 10 ⁵	1,9
Crh11p**	+	+	9,97 x 10 ⁴	0,9
Als1-2p**	+	+	6,44 x 10 ⁴	7,7
Tef1p; Tef2p; Tef3p	+	+	5,94 x 10 ⁶ ; n/a; 3,64 x 10 ⁶	1,1; n/a; 38,7
Ecm33**	+	+	1,99 x 10 ⁵	1,7
Cht2p**	+	+	6,49 x 10 ⁵	0,5
Rhd3p**	+	+	1,72 x 10 ⁵	0,9

*: Nicole Hauser, unveröffentlichte Daten

** : durch GPI-SOM prognostizierter GPI-Anker (Fankhauser und Maser 2005)

Zusätzlich wurde die durch die Signalintensität repräsentierte Transkriptmenge der in Tabelle 3.5 gelisteten Proteine analysiert, indem sie im Verhältnis zu der aller mit diesem Microarray untersuchten Gene betrachtet wurde. Zu diesem Zweck wurde jeweils die Anzahl Gene gezählt, deren Signal in einem 50

Intensitätseinheiten (Quantumlevel, QL) umfassenden Bereich lag. Diese Zahl wurde gegen die Intensität (Mittelwert des jeweiligen Bereichs) aufgetragen, und die Transkriptmenge der Proteine in Tabelle 3.5 markiert (Bild 3.8). In dem daraus resultierenden Diagramm ist zu erkennen, dass die Transkriptmengen der ausschließlich in hyphalen isolierten Zellwänden vorgefundenen Proteine (grüne Schrift) vorwiegend in einem den Hintergrund repräsentierenden Bereich ($< 1 \times 10^5$) liegen, oder nur wenig darüber (Bild 3.8). Proteine, die sich in Zellwänden beider untersuchter Wachstumsformen nachweisen ließen (rote Schrift), liegen mit Ausnahme von Als1-2p im Bereich $> 1 \times 10^5$ (Bild 3.8).

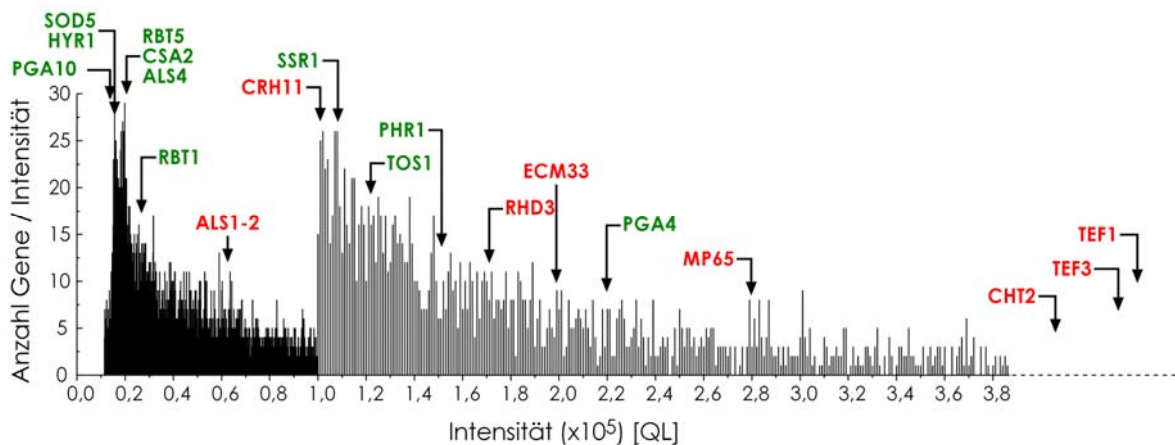


Bild 3.8: Transkriptmenge identifizierter Proteine im transkriptomweiten Vergleich

Gesamt-RNS aus *C. albicans* Blastosporen wurde präpariert und während der Transkription in cDNS mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach der Hybridisierung eines genomweiten *C. albicans* Microarray Chips mit dieser cDNS wurden die Signalintensitäten der jeweiligen Gene als Graustufen ausgelesen. Anschließend wurde die Anzahl Gene in einer jeweils 50 Graustufen umfassenden Gruppe bestimmt und gegen die mittlere Signalintensität der Gruppe aufgetragen. Für die Gene der in Tabelle 3.5 gelisteten Proteine wurde die Signalstärke in das Diagramm eingezeichnet. Dabei wurden die Gene der nur in Hyphen gefundenen Proteine grün markiert, alle anderen rot.

3.2 Sekretierte Proteine

Neben der für die Verankerung typische C-terminale Abfolge von Aminosäuren weisen die potentiell GPI verankerten Zellwandproteine bei der Sequenzanalyse eine für die Sekretion charakteristische N-terminale Signalsequenz auf (De Groot

et al. 2003; Lee et al. 2003). Um zu prüfen, ob in der Zellwand von *C. albicans* identifizierte Proteine auch sekretiert werden, sollten die von den Zellen in das Medium abgegebenen Proteine untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden *C. albicans* Wildtyp Zellen für 7 h in den voll-synthetischen Medien α -MEM und YNB kultiviert. Anschließend wurden die als Hyphen bzw. Blastosporen wachsenden Zellen durch Zentrifugation aus der Flüssigkeit entfernt. Die darin enthaltenen Proteine ließen sich durch eine Methanol/Chloroform-Fällung isolieren. Das Präzipitat von 10 ml Zellüberstand wurde resuspendiert und die Cysteine der nun erneut gelösten Proteine reduziert und alkyliert. Durch die Inkubation mit der Protease Trypsin ließen sich die vollständig denaturierten Proteine in für die massenspektrometrische Identifikation geeignete Peptide schneiden. Das Gemisch wurde mit MALDI-TOF MS untersucht. Dabei zeigte sich, dass es eine große Anzahl unterschiedlicher Peptide enthielt (Bild 3.9).

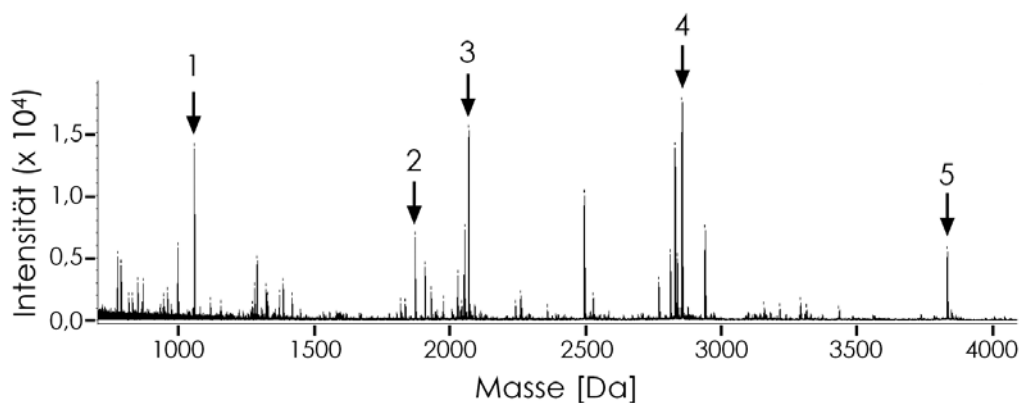


Bild 3.9: Massenspektrometrische Analyse der sekretierten Proteine

In YNB exponentiell wachsende *C. albicans* Wildtyp Zellen wurden durch Zentrifugation aus dem Medium entfernt. Anschließend folgte die Präzipitation der Proteine aus dem Überstand und deren Verdau durch Trypsin. In Folge wurden die Massenspektren im Bereich von 700 bis 4000 Da durch MALDI-TOF MS aufgenommen. Die PSD-Fragmentspektren der gekennzeichneten Peptide wurden analysiert und mittels des MASCOT-Datenbanksuchprogrammes Proteinen zugeordnet. 1 und 5: Sun41p; 2: Sim1p; 3: MP65p; 4: Tos1p.

Die prominentesten Peptide wurden einer Fragmentanalyse unterzogen und durch das MASCOT Datenbanksuchprogramm den Ursprungproteinen zugeordnet. Dabei wurden die Proteine Sun41p, Sim1p, MP65p und Tos1p

identifiziert. Da das Peptidgemische eine für MALDI-TOF MS/MS zu hohe Anzahl an Peptiden aufwies um eine zufriedenstellende Übersicht über die enthaltenen Proteine zu gewährleisten, wurde zur weiteren Analyse ein rp-HPLC gekoppeltes ESI-Massenspektrometer (Finnigan LCQ^{DECA}) verwendet (2.7.3). Dabei konnten die Peptide des komplexen Gemisches durch die HPLC aufgetrennt, und die Massen der einzelnen Peptide bestimmt werden. Anschließend ließen sie sich unter Verwendung der durch CID entstandenen Fragmentmassen mittels MASCOT den Ursprungproteinen zuordnen. Das Ergebnis der Identifikationen ist in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Zusätzlich ist vermerkt, ob das jeweilige Protein ein für die Sekretion charakteristisches Sequenzmotiv trägt (Lee et al. 2003). Bei in α -MEM wachsenden Hyphen ließen sich sechs Proteine identifizieren. Nur eines davon, Dsl1p, weist nicht die auf Sekretion hinweisende Aminosäuresequenz auf. Die Proteine Tos1p, Mp65p und Sod5p wurden auch in hyphalen Zellwänden gefunden. Nur Sod5p zeigt die für einen GPI-Anker charakteristische Sequenz. Im Überstand von Blastosporen wurden insgesamt sieben Proteine entdeckt. Allein das Ywp1p ist ein potentiell GPI verankertes Protein. Bei allen Proteinen wurde eine sekretorische Domäne gefunden. Tos1p, Mp65p und Sun41p wurden auch im Medium von Hyphen identifiziert.

Tabelle 3.6: Durch MS/MS (MALDI-TOF und ESI) identifizierte Proteine im Medium von Wildtyp *C. albicans* Zellen, gewachsen in α -MEM oder YNB

Medium und ORF-Nummer ^a	Name	Sekretion vorher-gesagt ^b	Peptid-Sequenz	p-Wert ^c
a-MEM				
orf19.2060	Sod5p**	Ja	HGNIMGESYK	1,3 x 10 ⁻⁰⁶
			GLPSDIGPPY	5,6 x 10 ⁻⁰³
			AATPAAHEVGDLGK	1,0 x 10 ⁻⁰⁷
orf19.1690	Tos1p	Ja	SGEEYIIFSGSK	2,8 x 10 ⁻⁰⁶
			FGNSLSYANADNSGGSSTPVPLEETIK	6,4 x 10 ⁻⁰⁸
orf19.1779	Mp65p	Ja	YWGIYSN	2,0 x 10 ⁻⁰³
			GDSNGLAVPSK	4,7 x 10 ⁻⁰⁴
			NVLITETGWPSK	1,1 x 10 ⁻⁰⁴
			SNQQAASSIK	3,1 x 10 ⁻⁰⁴
			SESQIASEIAQLSGFDVIR*	4,7 x 10 ⁻¹⁵
			NVLITETGWPSR*	1,3 x 10 ⁻⁰³
			SNYLCEWGVK	4,1 x 10 ⁻⁰⁵
orf19.3642	Sun41p	Ja	LSETVAICR*	7,6 x 10 ⁻⁰⁶
			NDGWAGYWR	1,6 x 10 ⁻⁰²
orf19.3111	Pra1p	Ja	NDGWAGYWR*	2,6 x 10 ⁻⁰⁵
			MEGIGNGGDDSLQEK	2,7 x 10 ⁻⁰²
orf19.2370	Dsl1p	Nein		
YNB				
orf19.1690	Tos1p	Ja	EAGSVATIGY	9,4 x 10 ⁻⁰³
			SGEEYIIFSGSK	1,8 x 10 ⁻⁰⁵
			GCSFEGGNYYCSEK	8,2 x 10 ⁻⁰⁸
			TGCGELDLFEVLSSGSNK	5,2 x 10 ⁻¹¹
			CTQQLYSFSGNLSPLDEELSVHFR*	1,2 x 10 ⁻¹³
orf19.3642	Sun41p	Ja	LSETVAICR	4,1 x 10 ⁻⁰⁷
			SNYLCEWGVK	3,2 x 10 ⁻⁰⁴
			TQWPEDQPSNGVVSIGLLCK	7,0 x 10 ⁻⁰⁷
			LSETVAICR*	9,0 x 10 ⁻⁰⁶
			TDYPGTENMVIPTVVGGGSTSVITVVDQSTYYTWR*	4,3 x 10 ⁻¹⁸
orf19.1779	Mp65p	Ja	YWGIYSN	2,0 x 10 ⁻⁰³
			GDSNGLAVPSK	3,5 x 10 ⁻⁰⁵
			SNQQAASSIK	2,1 x 10 ⁻⁰⁷
			NVLITETGWPSK	6,6 x 10 ⁻⁰⁴
			AFFDGHVAAENSGPWVLQQIQR	3,7 x 10 ⁻⁰³
orf19.3618	Ywp1p**	Ja	NLYGAGAVPFFQVHLEK	1,2 x 10 ⁻⁰⁶
orf19.5032	Sim1p	Ja	APCSVVDGDYFK	2,4 x 10 ⁻⁰⁵
			DVNFVSEISEDVAICR*	8,7 x 10 ⁻⁰⁸
orf19.5063	Hypo-thetisches Protein	Ja	YSCLLDVMK	3,8 x 10 ⁻⁰⁵
orf19.4688	Dag7p	Ja	SVGNNPNHNPLCNK	2,0 x 10 ⁻⁰⁴

^a Nummer des offenen Leserahmens (ORF) nach assembly 19.

^b Vorhergesagt durch Lee et al. (Lee et al. 2003)

^c Erwartungswert des Peptid-Treffers, kleiner 5 x 10⁻² bedeutet Identität oder hohe Homologie.

* Durch MALDI-TOF MS/MS identifizierte Peptide.

** enthält einen durch GPI-SOM prognostizierten GPI-Anker (Fankhauser und Maser 2005)

3.3 *SUN41*

Unter Hyphen induzierenden Bedingungen wird die Transkription der potentiellen Glycosidase Sun41p in *C. albicans* hoch reguliert (Sohn et al. 2003). Zudem wird es beim Wachstum auf einem epithelialen Zellkultur-Modell induziert (Rosa Hernández-Barbado, persönliche Mitteilung). Das zu Sun41p homologe Protein wurde in *S. cerevisiae* in der Zellwand gefunden und konnte durch Einsatz reduzierend wirkender Substanzen daraus gelöst werden (Cappellaro et al. 1998). Bei entsprechenden Untersuchungen in *C. albicans* wurde es allerdings noch nicht beschrieben (Choi et al. 2003; Urban et al. 2003; Ebanks et al. 2006), jedoch wie oben (3.2) gezeigt als sekretiertes Protein identifiziert. Aufgrund der möglichen Verbindung zur Zellwand-Biogenese und -Morphogenese sollte dieses Protein näher charakterisiert werden.

3.3.1 Deletion von *SUN41*

Um weitergehende Informationen über das von *SUN41* codierte Protein zu erhalten, wurde das Gen aus dem *C. albicans* Wildtyp Stamm durch homologe Rekombination entfernt. Dies erforderte die sequenzielle Deletion beider Genkopien des diploiden Organismus. Zur Deletion wurde eine Methode verwendet, durch die der eingeführte Selektionsmarker mittels einer induzierbaren FRT-spezifischen Rekombinase wieder entfernt werden konnte (Morschhauser et al. 1999; Reuss et al. 2004) (2.9). Die einzelnen Transformationsschritte ließen sich mittels Southern Blot überprüfen. Nach Präparation der genomischen DNS wurde diese mit dem Restriktionsenzym *BclI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Zur Detektion diente eine mittels PCR amplifizierte und radioaktiv markierte Sonde (Sonde1). Diese hybridisierte mit den auf den *SUN41*-ORF folgenden 400 bp (Bild 3.10 A). Beim Wildtyp zeigte sich dadurch eine Bande bei 2429 bp (*SUN41*). Die erfolgreiche Transformation mit dem Kassetten-Konstrukt (Flip in) führte zu einer Bande bei 4599 bp (*sun41Δ::SAT1-FLIP*). Nach Induktion der spezifischen Rekombinase und der dadurch ausgelösten Entfernung der Kasette (Flip out) mit dem Selektionsmarker lag die Bande bei 7075 bp (*sun41Δ::FRT*) (Bild 3.10 A, Spuren 1 bis 3). Auf die heterozygoten Deletionsmutanten wurde dieses

Verfahren analog zum ersten Durchlauf angewendet, um auch die zweiten Kopie des Gens *SUN41* zu entfernen (Bild 3.10 A, Spuren 4 u. 5). Mit dieser Technik wurden zwei unabhängige *sun41*Δ Deletionsmutanten (*sun41*Δ::*FRT*/*sun41*Δ::*FRT*) erzeugt (Can420 und Can426).

Als Kontrolle gegen unbeabsichtigte Manipulationen am Genom wurde der *Knock-out* rekonstituiert, und eine Kopie des Gens wieder in die Deletionsmutanten eingefügt (*SUN41*::*FRT*/*sun41*Δ::*FRT*) (Can422 und Can428). Zur Überprüfung diente wiederum der Southern Blot, bei dem *BclI* als Restriktionsenzym zum Verdau der genomischen DNS eingesetzt wurde (Bild 3.10 B). Die zur Detektion eingesetzte Sonde (Sonde2) hybridisierte dabei an die letzten 400 bp des *SUN41* ORF. Dies erzeugte ebenfalls das oben beschriebene, für die jeweiligen Genotypen charakteristische Bandenmuster. Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zur ersten Sonde (Sonde1) eine schwache Bande bei ca. 4500 bp. Dies kann auf eine Kreuzhybridisierung der zweiten Sonde (Sonde2) mit einem Fragment des Gens *SIM1* hinweisen, das am 3'-Ende des ORF eine hohe Übereinstimmung (80% Identität von 172 Basen) zu *SUN41* aufweist.

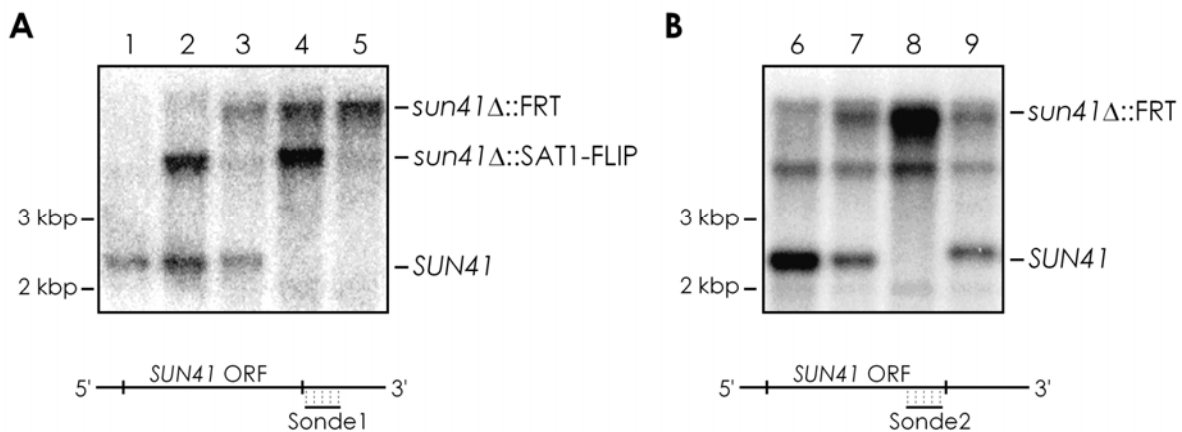


Bild 3.10: Southern Blot Analyse zur Verifizierung der *SUN41* Deletion (A) und der Rekonstitution (B)

Genomische DNS verschiedener *C. albicans* Stämme wurde mit dem Restriktionsenzym *BclI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend folgte die Detektion mit einer radioaktiv markierten Sonde (Sonde1 u. Sonde2). Deren Hybridisierungsstellen auf dem Wildtyp *Sun41* ORF ist jeweils auf der Graphik unter dem Blot abgebildet. Dargestellt sind in den Spuren 1 und 6: Wildtyp (*SUN41*/*SUN41*); 2: Flip in#1 (*sun41*Δ::*SAT1*-FLIP/*SUN41*); 3 und 7: Flip out#1 (*sun41*Δ::*FRT*/*SUN41*); 4: Flip in#2

(*sun41Δ::FRT/sun41Δ::SAT1-FLIP*); 5 und 8: Flip out#2 (*sun41Δ::FRT/sun41Δ::FRT*); und 9: Rev (*SUN41::FRT/sun41Δ::FRT*).

3.3.2 Phänotypische Analyse von *sun41Δ* Zellen

Durch Vergleich des Phänotyps der Deletionsmutante mit dem des Wildtyps unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kann auf die Funktion des Proteins geschlossen werden.

3.3.2.1 *SUN41* Transkription

Nachdem sich mit der Southern Plot Analyse das Fehlen von *SUN41* im Genom nachweisen ließ, wurde die *real-time* RT PCR eingesetzt um die Abwesenheit des Transkripts zu belegen. Parallel dazu wurde die Transkription von *SUN41* im Wildtyp zwischen Blastosporen und Hyphen verglichen, bzw. die Transkriptmenge von *SUN41* und *TDH3* in Wildtyp Blastosporen zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Aus den zu untersuchenden Stämmen wurde die Gesamt-RNS isoliert und durch eine reverse Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Diese cDNS stellte die Matrize für die darauf folgende *real-time* PCR (LightCycler® 480, Roche) dar. Unter Verwendung Gen-spezifischer Primer und fluoreszierender Sonden für *SUN41* bzw. *TDH3* wurde die Amplifikation während der PCR Zyklen verfolgt. Dadurch konnte auf die Ausgangsmenge der jeweiligen cDNS-Menge in der Gesamt-cDNS geschlossen und diese in verschiedenen Proben verglichen werden (Bild 3.11). Zur Normalisierung diente das in allen Proben in gleichen Mengen vertretene Transkript des Haushaltsgens *TDH3* (Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase). Dies wurde in Vorversuchen durch den Einsatz genau definierter cDNS-Mengen überprüft. Bei der Quantifizierung der Transkriptmengen wurden die in Vorversuchen ermittelten unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen berücksichtigt.

Beim Vergleich der Transkriptmenge von *SUN41* in Blastosporen und Hyphen zeigt sich die schon aus früheren Versuchen bekannte verstärkte Transkription in Hyphen (Sohn et al. 2003). In *sun41Δ* Deletionsstämmen ist kein Transkript von *SUN41* mehr nachweisbar; in dem mit einer Gen-Kopie rekonstituierten Stamm *sun41Δ-SUN41* etwa die Hälfte der des Wildtyps. Der Vergleich der Transkript-

menge in Wildtyp Blastosporen mit der des Haushaltsgens Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase zeigte, dass *SUN41*-mRNS in etwa 180fach geringerer Menge als *TDH3*-mRNS vorliegt.

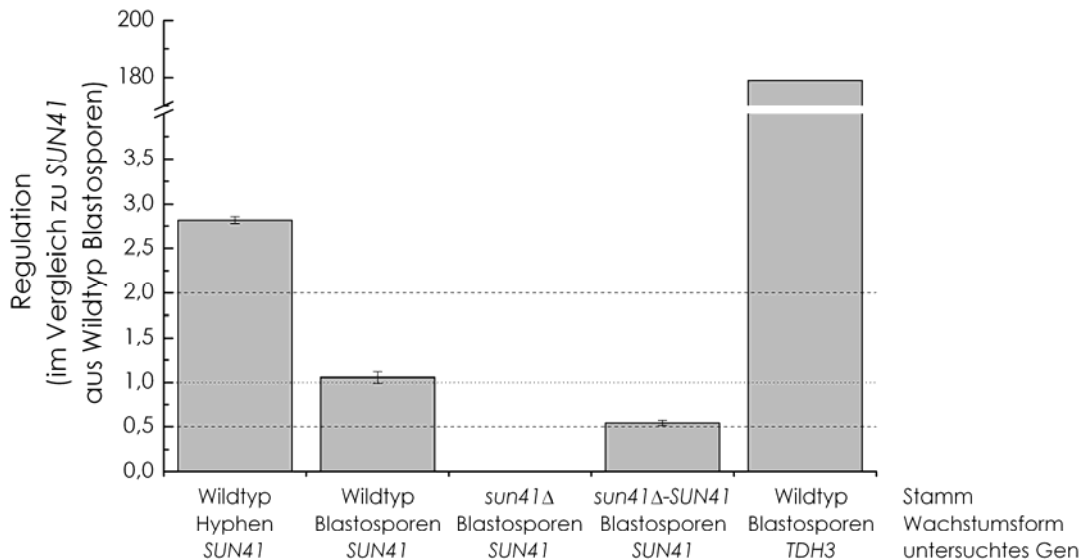


Bild 3.11: *SUN41* Transkription

Aus verschiedenen *C. albicans* Stämmen wurde die Gesamt-RNS präpariert und in cDNS umgeschrieben. Diese diente als Matrize in einer *real-time* PCR. Die Transkriptmenge der untersuchten Gene wurde mit der von *SUN41* aus Wildtyp Blastosporen verglichen. Die gestrichelte Linie markiert eine im Vergleich um das zweifache hoch- bzw. auf die Hälfte herunter regulierte Transkription. Die gepunktete Linie zeigt gleiche Mengen an. Die Standardabweichung vom Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten ist als Fehlerbalken eingetragen.

3.3.2.2 Sekretierte Proteine in *sun41*Δ

Zur Überprüfung der von *sun41*Δ *C. albicans* ins Medium sekretierten Proteine wurde der in 3.2 beschriebene Ansatz verwendet. Das durch Trypsinierung entstandene Peptidgemisch wurde mit MALDI-TOF MS analysiert (Bild 3.12). Der Vergleich des erhaltenen Massenspektrums mit dem des Wildtyps zeigte eine hohe Übereinstimmung. Einzig die Sun41p zuordenbaren Peptide, insbesondere die bei 1048,629 Da und 3794,181 Da sichtbaren, fehlten.

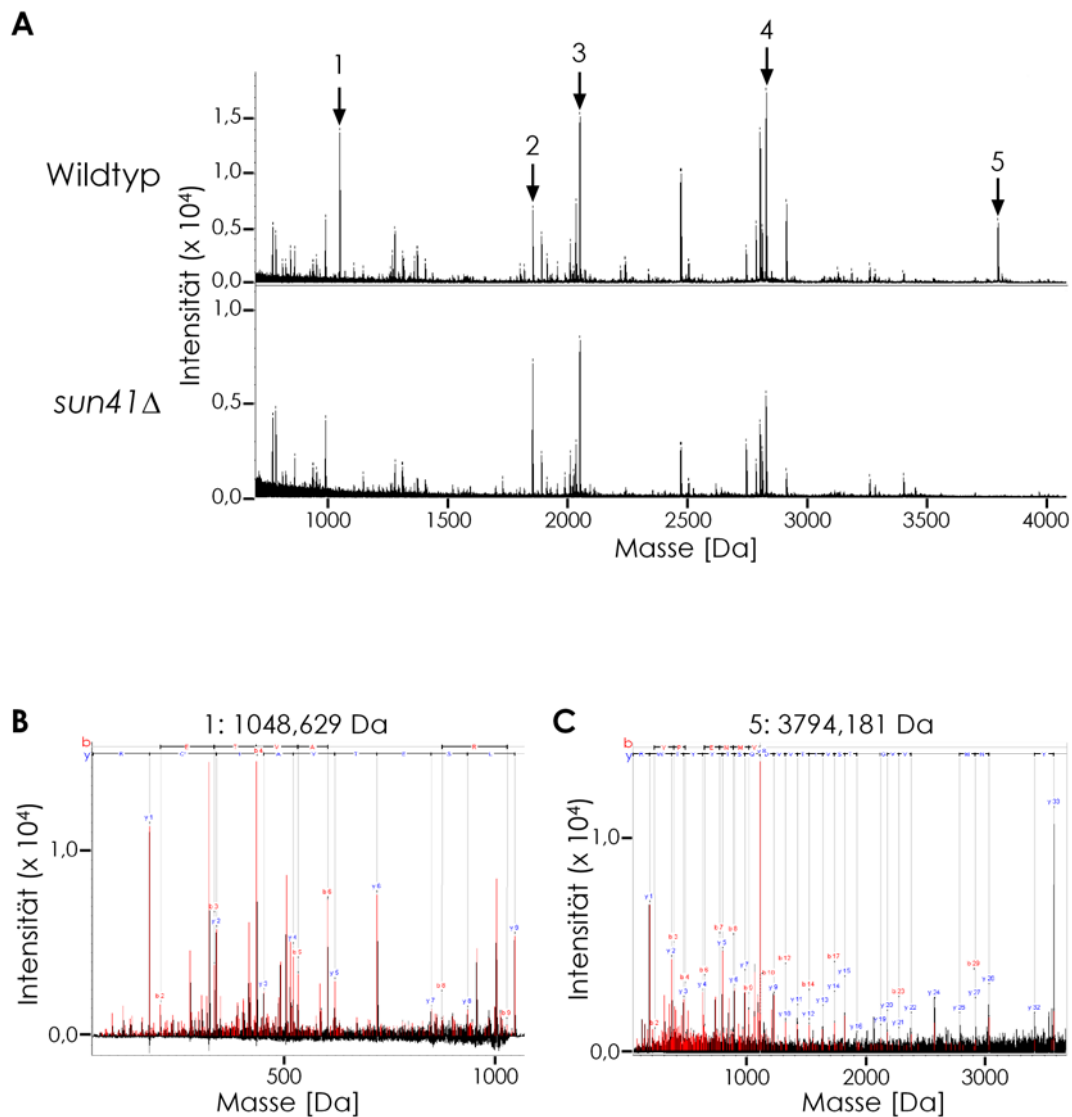


Bild 3.12: Massenspektrometrischer Vergleich der sekretierten Proteine aus Wildtyp und *sun41Δ*

(A) In YNB exponentiell wachsende *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Zellen wurden durch Zentrifugation aus dem Medium entfernt. Anschließend folgte die Präzipitation der Proteine aus dem Überstand und deren Verdau durch Trypsin. In Folge wurden die Massenspektren im Bereich von 700 bis 4000 Da durch MALDI-TOF MS aufgenommen. Die PSD-Fragmentspektren der gekennzeichneten Peptide wurden analysiert und mittels des MASCOT-Datenbank-suchprogrammes Proteinen zugeordnet. 1 und 5: Sun41p; 2: Sim1p; 3: MP65p; 4: Tos1p. (B,C) Fragmentspektren der Peptide 1 und 5 mit den daraus resultierenden Sequenzen.

3.3.2.3 Verdopplungsrate

Eine Veränderung der Verdopplungsrate von Zellen kann einen Hinweis auf eine Störung des Stoffwechsels darstellen. Um die Teilungsrate des *SUN41*

Deletionsmutanten mit der des *C. albicans* Wildtyps zu vergleichen wurden von beiden Stämmen YPD Flüssigkulturen mit definierten Zellzahlen angeimpft. Während der Inkubation bei 30°C erfolgte die stündliche Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm. Die gemessenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen (Bild 3.13). Der Vergleich der Zunahme der optischen Dichte in Wildtyp und *sun41Δ* Flüssigkultur zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Verdopplungsrate stimmte bei beiden Stämmen überein.

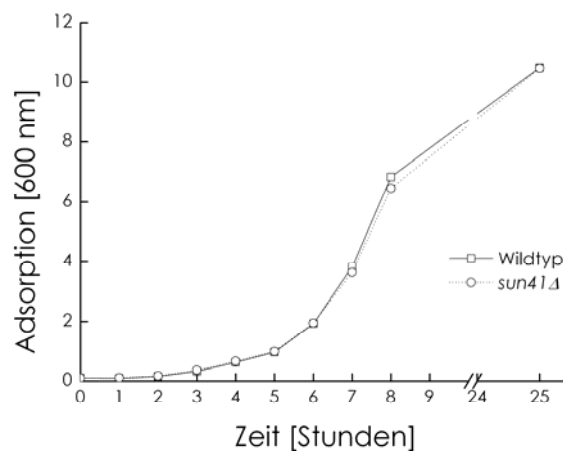


Bild 3.13: Verdopplungsrate von *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Mutante in YPD

YPD Flüssigkulturen wurden mit Zellen des *C. albicans* Wildtyps und der *sun41Δ* Mutante angeimpft. Anschließend wurde stündlich die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

Allerdings konnte bei den *sun41Δ* Kulturen eine verstärkte Flockenbildung beobachtet werden. Um der Ursache nachzugehen wurde das Erscheinungsbild der Zellen mikroskopisch untersucht.

3.3.2.4 Phänotyp der *sun41Δ* Blastosporen

Zur Betrachtung des Phänotyps der *sun41Δ* Mutanten wurden diese parallel zum Wildtyp in flüssigem YPD Medium bis in die exponentielle Phase kultiviert. Nach Fixierung und entsprechender Präparation wurden die Zellen sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht (Bild 3.14).

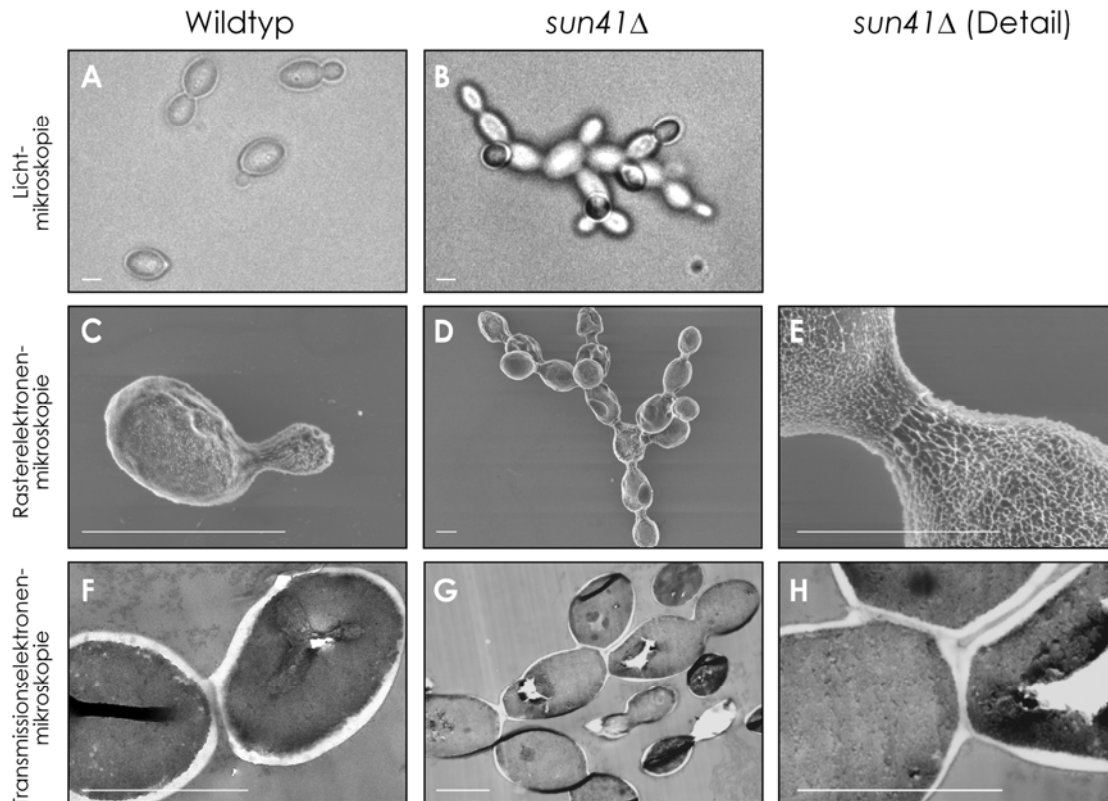


Bild 3.14: Mikroskopische Untersuchung des Phänotyps von Wildtyp und *sun41Δ* Blastosporen

In YDP wachsende Zellen des *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Stammes wurden nach 6 h Wachstum durch Glutaraldehyd fixiert. Das Erscheinungsbild der Zellen wurde mittels Lichtmikroskopie (A und B) oder, nach entsprechender Präparation, durch Rasterelektronenmikroskopie (C bis E) bzw. Transmissionselektronenmikroskopie (F bis H) untersucht. Der Balken entspricht 2 μm .

Dabei konnte bei den *sun41Δ* Zellen eine andere Erscheinungsform als bei denen des Wildtyps beobachtet werden. Statt einzelner knospender Blastosporen (Bild 3.14 A) waren bei *sun41Δ* zusammenhängende Zellen zu erkennen, die eine bäumchenartige Struktur bildeten (Bild 3.14 B). Diese schien dadurch zu entstehen, dass sich die Zellen nach erfolgter Zellteilung nicht voneinander lösten. Die so verbundenen Zellen konnten auch durch eine schwache Ultraschall Behandlung nicht separiert werden, die üblicherweise zusammen klebende Zellen voneinander löst.

Eine detailliertere Ansicht ermöglichte die Rasterelektronenmikroskopie. Auf den damit angefertigten Bildern (Bild 3.14 D und E) zeigte sich, dass die *sun41Δ* Zellen

an den Knospungsstellen miteinander verbunden waren (Bild 3.14 E). Diese Verbindung zur Mutterzelle blieb auch dann bestehen, wenn die Tochterzelle ihrerseits in einen neuen Teilungszyklus startete, wie durch Bildung einer neuen Knospe erkennbar war (Bild 3.14 B). Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglichte es die Knospungsstelle innerhalb der Zellen zu untersuchen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen sich gerade teilenden Wildtypzellen (Bild 3.14 F) und den verbundenen Zellen der *sun41Δ* Mutanten beobachtet werden. Eine dünne kontrastierte Linie an der Knospungsstelle zwischen den *sun41Δ* Zellen scheint auf die Fertigstellung der Zellwände und Septen von beiden Seiten hinzudeuten (Bild 3.14 H), wobei einzig der finale Schnitt fehlt um die Teilung abzuschließen.

3.3.2.5 Zellgröße

Deletionsmutanten in *S. cerevisiae*, denen das zu *SUN41* homologe Gen *SUN4* fehlte, wiesen eine Zunahme der Zellgröße auf (Mouassite et al. 2000). Diese Beobachtung konnte auch bei *C. albicans sun41Δ* Mutanten gemacht werden, bei denen die Zellgröße auf mikroskopischen Bildern während des exponentiellen Wachstums bestimmt wurde. Die Auswertung der Messwerte zeigte eine signifikante Vergrößerung der *sun41Δ* Zellen im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 1,3. (Bild 3.15). Die Rekonstitution der *SUN41* Deletion mit einer Kopie des Gens führt zu einer Verringerung der Größe im Vergleich zum *sun41Δ* Stamm, allerdings waren die Zellen dennoch größer als die des Wildtyps. Dies kann durch den in Bild 3.11 gezeigten Gen-Dosis Effekt erklärt werden. Bei allen untersuchten *C. albicans* Stämmen wurde eine starke Varianz der Zellgröße beobachtet.

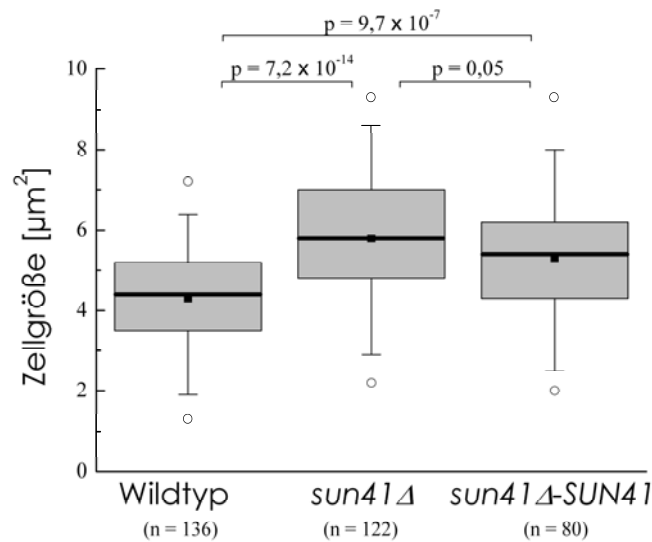


Bild 3.15: Zellgröße der *sun41Δ* Mutante im Vergleich zu Wildtyp und Revertante

C. albicans Zellen der indizierten Stämme wurden während des exponentiellen Wachstums in YPD geerntet und durch Ultraschall auch bei *sun41Δ* vereinzelt. Die Zellen wurden angefärbt und lichtmikroskopische Bilder angefertigt. Anschließend wurde mit der Scion Image Software die Fläche der Zellen bestimmt und in einem Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Größenverteilungen von Wildtyp und *sun41Δ* unterscheiden sich signifikant ($P = 7,2 \times 10^{-14}$). Die Box zeigt den Interquartilsabstand (oberes bis unteres Quartil), die horizontalen dicken Linien symbolisieren den Median. Die schwarzen Quadrate repräsentieren das arithmetische Mittel, die Länge der Whisker beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands und die Kreise zeigen die am weitesten abweichenden Werte an.

3.3.2.6 Beteiligung an der Zellwand-Biogenese

Die Beteiligung von Sun41p an der Biogenese der Zellwand wurde durch Überlebenstests auf Agarplatten geprüft, denen Kongorot und Calcofluor beigemischt waren. Kongorot behindert die Zusammenlagerung der Glucan-Mikrofibrillen (Kopecka und Gabriel 1992) und Calcofluor den Aufbau des Chitins (Elorza et al. 1983). Vereinzelt Zellen des *sun41Δ* Mutanten und des Wildtyps wurden seriell verdünnt und bis zu 5 Tage auf supplementierten YNB Agarplatten kultiviert. Dabei zeigten die *sun41Δ* Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Kongorot (Bild 3.16 B), nicht aber gegen Calcofluor (Bild 3.16 C). Auch bei mit Calcofluor gefärbten und durch Fluoreszenzmikroskopie untersuchten Blastosporen aus YPD Flüssigmedium zeigte sich kein

Unterschied im Muster der Färbung der zwischen *sun41Δ* und Wildtyp (nicht gezeigt).

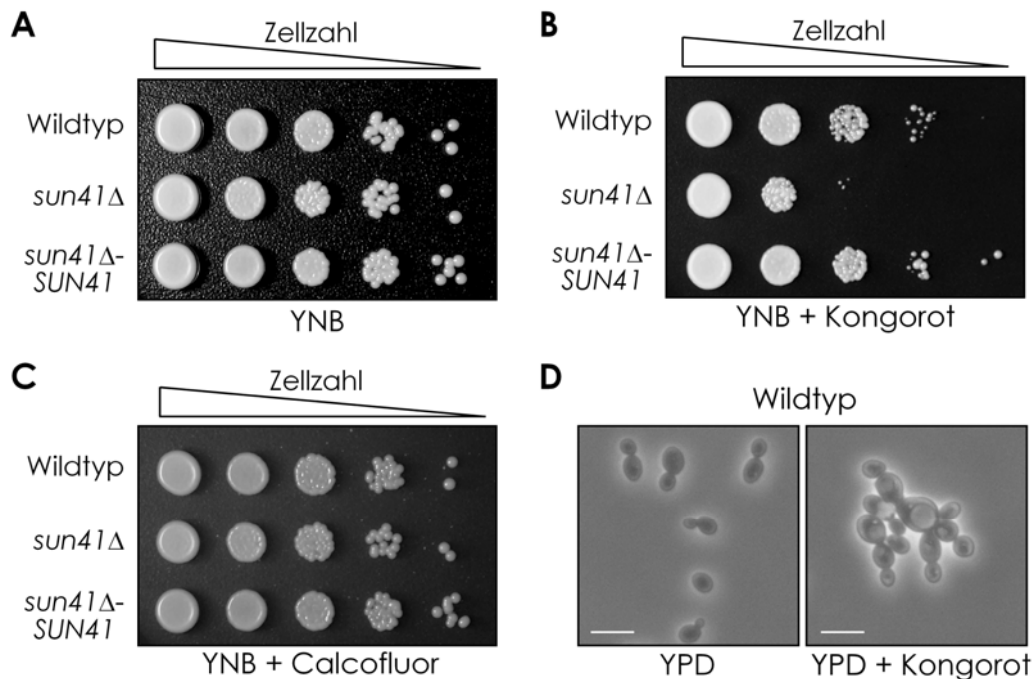


Bild 3.16: Einfluss von Kongorot und Calcofluor auf unterschiedliche *C. albicans* Stämme

Serielle Verdünnungen von *C. albicans* Zellen der indizierten Stämme wurden auf YNB-Agarplatten ausgebracht die mit 300 μg/ml Kongorot (B) oder 300 μg/ml Calcofluor (C) supplementiert waren. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert. (D) Wildtyp *C. albicans* Zellen wurden im angezeigten Flüssigmedium bei 30°C für 7 h inkubiert. Der Balken entspricht 10 μm.

Dieses Ergebnis deutet auf eine Veränderung im Glucan Netzwerk hin, die möglicherweise in einem Defekt der Zellwandstruktur und einer verringerten Überlebensrate der Zellen resultiert. Aus diesem Grund wurde die Anfälligkeit der Zellen gegenüber einer die Zellwand abbauenden β-1,3 Glucanase (Quantazyme ylg™) untersucht. Dabei wurde die Zeit bestimmt, bei der die Hälfte der Zellen lysierte, während sie dem Enzym ausgesetzt waren. Die Zellzahl wurde dabei über die OD_{600nm} ermittelt.

Bei den *sun41Δ* Mutanten benötigte dieser Vorgang mit 42 min doppelt so lange wie beim Wildtyp (21 min). Bei dem rekonstituierten Stamm *sun41Δ-SUN41* vergingen 28 min bis die Hälfte der Zellen aufgelöst waren. Dies kann auf einen

kompensatorischen Mechanismus zur Stärkung der Zellwand oder auf eine reduzierte Zahl von β -1,3 Verknüpfungen des Glucans hindeuten, und damit auf geringere Angriffsmöglichkeiten für das Enzym.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von Sun41p an der Biogenese der Zellwand stellte die Beobachtung dar, dass Zellen des *C. albicans* Wildtyps bei Anwesenheit von Kongorot im YPD Medium auch eine verstärkte Flockenbildung aufwiesen. Lichtmikroskopische Bilder zeigten, dass die Blastosporen sich nach der Knospung nicht teilten und in einer bäumchenartigen Struktur wuchsen, die der des bei *sun41* Δ beobachteten Phänotyps glich (Bild 3.16 D).

3.3.2.7 Polysaccharidgehalt in der Zellwand

Aufgrund der Hinweise auf eine Veränderung des Glucan Netzwerkes (3.3.2.6) wurde untersucht, ob sich die Zusammensetzung der Polysaccharide in der Zellwand durch das Fehlen von *SUN41* verändert hatte. Hierzu wurden die Polysaccharide isolierter Zellwände (3.1.2) aus in Flüssigmedium gewachsenen Blastosporen von Wildtyp, *sun41* Δ und der rekonstituierten Mutante durch saure Hydrolyse in ihre Monomere gespalten (Francois 2006). Diese wurden durch Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt und die Mengen von Glucosamin (aus Chitin), Glucose (aus β -Glucan) und Mannose (aus mannosylierten Proteinen) mittels gekoppelter Puls-Amperometrischer Detektion bestimmt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil von Chitin, β -Glucan und Mannan in der Zellwand der drei untersuchten Stämme (Bild 3.17). Bei der verwendeten Methode kann allerdings keine Aussage zum Anteil von β -1,3- und β -1,6- verknüpftem Glucan am gesamten β -Glucan gemacht werden.

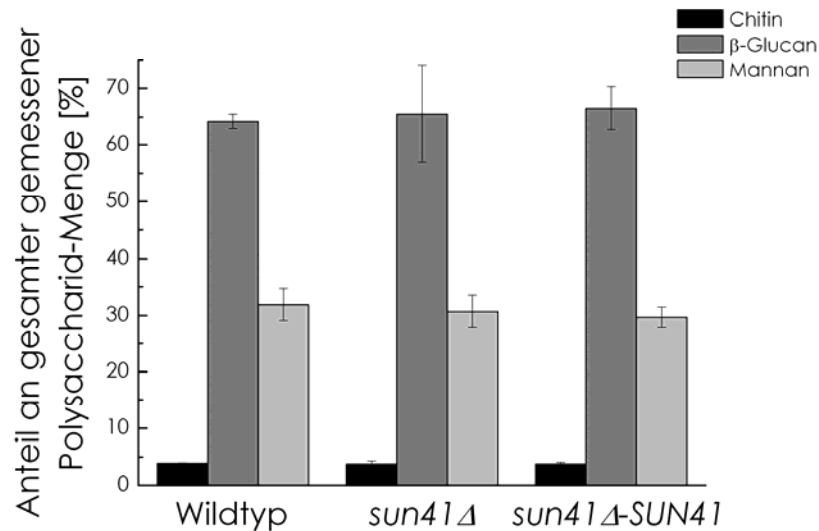


Bild 3.17: Zusammensetzung der Polysaccharide in der Zellwand von Blastosporen verschiedener *C. albicans* Stämme

Die Polysaccharide in isolierten Zellwänden aus Blastosporen der angezeigten Stämme wurden mittels Schwefelsäure durch saure Hydrolyse in ihre Monomere aufgespaltet. Nach Neutralisation der Lösung erfolgte die Mengenbestimmung der Monomere Glucosamin (aus Chitin), Glucose (aus β-Glucan) und Mannose (aus mannosylierten Proteinen) durch Ionenaustauschchromatographie mit gekoppelter Puls-Amperometrischer Detektion. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Proben und deren Standardabweichung.

3.3.2.8 Hyphenbildung

Die Bildung von Hyphen ist bei *C. albicans* eine wichtige Voraussetzung, um effektiv in das Wirtsgewebe einzudringen (Lo et al. 1997). In dieser Wachstumsform ist die Transkription von *SUN41* im Vergleich zu Blastosporen bis zu dreifach hoch reguliert (Sohn et al. 2003) (Bild 3.11). Um die Hyphenbildung von *sun41Δ* Mutanten zu untersuchen, wurden diese in α-MEM oder mit Serum versetztem YPD Flüssigmedium kultiviert. Anschließend wurden sie mit Calcofluor gefärbt und durch Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie auf Unterschiede zum Wildtyp hin geprüft. Dabei waren keine signifikanten morphologischen Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Stämmen feststellbar (Bild 3.18 A). Nur die schon bei den Blastosporen beschriebene verstärkte Flockenbildung, und zusätzlich eine geringfügig abgeschwächte Ansäuerung des Mediums wurden beobachtet (nicht gezeigt).

Interessanterweise führte die Zugabe von Kongorot zu Hyphen induzierendem Medium (YPD + Serum, 37°C) beim *sun41Δ* Stamm im Gegensatz zum Wildtyp zu einem fast vollständigen Ausbleiben der Hyphen (Bild 3.18 B). Die Zellen wuchsen wie Blastosporen und wiesen die bei dieser Wachstumsform schon zuvor beobachtete fehlende Trennung nach der Zellteilung auf (Vergleich Bild 3.14 B und Bild 3.18 B).

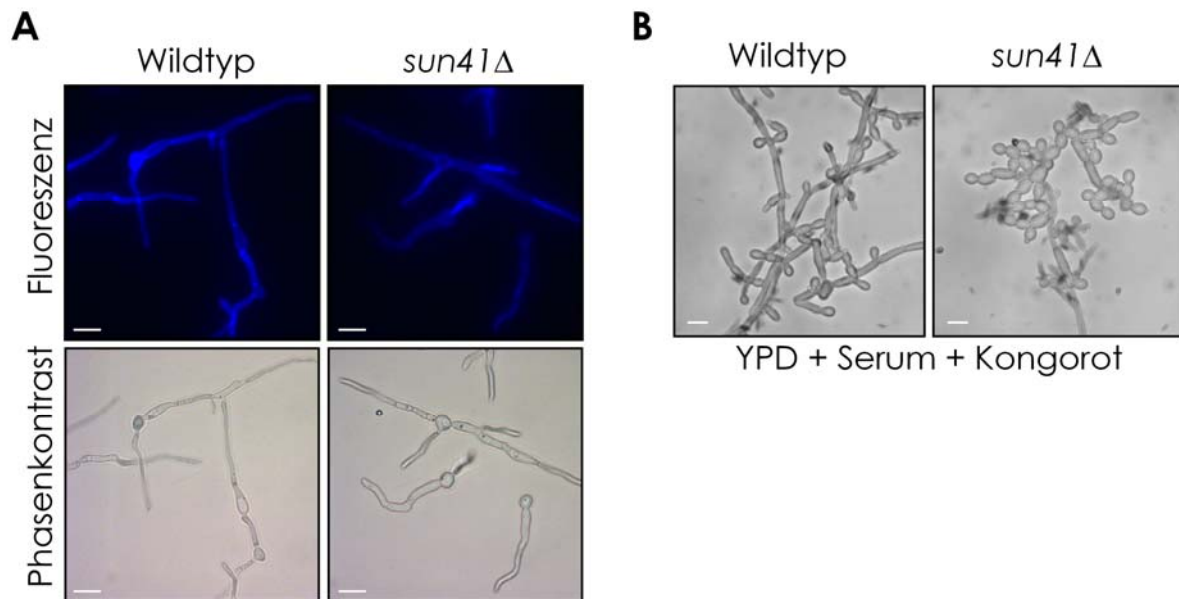


Bild 3.18: Hyphen von *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Mutanten

(A) Zellen von *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Mutante wurden 7 h bei 37°C in α -MEM Flüssigmedium inkubiert. Die dadurch induzierten Hyphen wurden mit Calcofluor gefärbt und mit Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskopie untersucht. (B) Wildtyp und *sun41Δ* *C. albicans* Zellen wurden für 7 h bei 37°C in YPD inkubiert, das mit 10% Serum und 300 μ g/ml Kongorot versetzt war. Der Balken entspricht 10 μ m.

Um das Verhalten auf einem festen Untergrund zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen *C. albicans* Stämme auf Festmedien kultiviert. Hierzu wurden exponentiell wachsende *C. albicans* verdünnt und für bis zu 5 Tage bei 37°C auf Agarplatten kultiviert, die α -MEM, YPD + 10% Serum oder Spider Medium enthielten (Bild 3.19 A, nicht gezeigt). Bei Betrachtung des Randbereichs der Kolonien (Bild 3.19 A; Bild 3.19 B, obere Reihe) und abgeschabter Zellen aus dem Zentrum (Bild 3.19 B, untere Reihe) wies der *sun41Δ* Stamm im Gegensatz zu Wildtyp und *sun41Δ-SUN41* kaum Hyphen auf. Dieser Befund unterschied sich

damit grundlegend von dem bei der Verwendung flüssiger Medien, da der *sun41Δ* Stamm auf Festmedien nicht mehr in der Lage war, Hyphen zu bilden.

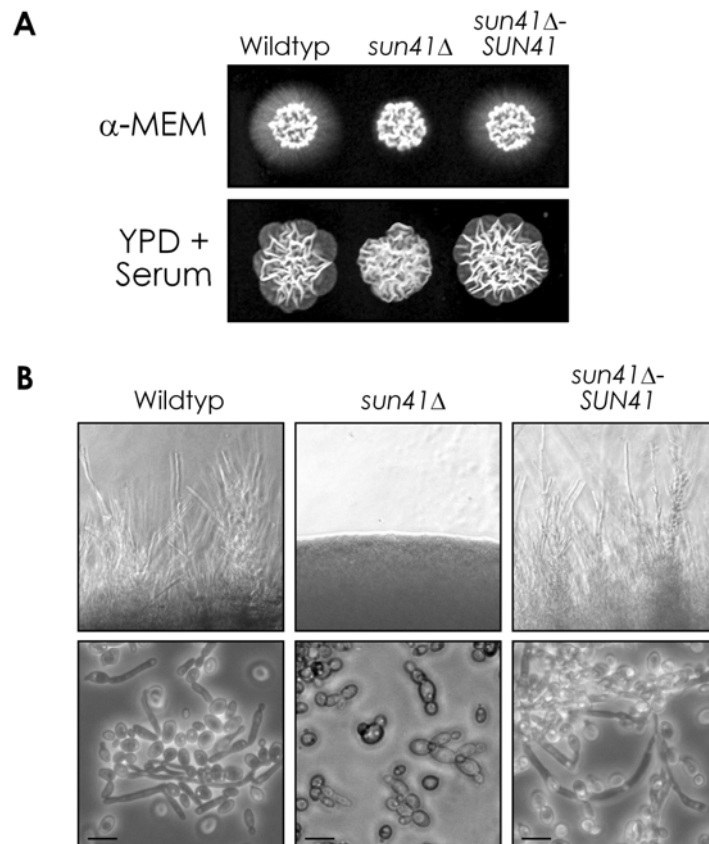


Bild 3.19: Phänotypen verschiedener *C. albicans* Stämme auf Festmedien

Jeweils 100 Zellen der indizierten *C. albicans* Stämme wurden auf Agarplatten ausgebracht, die entweder α -MEM enthielten oder mit 10% bovinem Kälberserum versetztes YPD. Anschließend wurden die Platten bei 37°C bis zu 5 Tage inkubiert. (B) Der Rand der Kolonien die auf YPD + 10% Serum Platten wuchsen, wurde mikroskopisch untersucht (obere drei Bilder). Zusätzlich wurden Zellen aus dem Zentrum der Kolonie abgekratzt und ebenfalls mikroskopisch geprüft (untere drei Bilder). Der Balken entspricht 10 μ m.

3.3.2.9 Regulation von Genen der Zellwand-Biogenese

Aufgrund von Homologien der Aminosäuresequenz zu einer bekannten Glycosidase aus *Candida wickerhamii* (Skory und Freer 1995) wurde Sun41p als potentielle Glycosidase annotiert. Die Effekte die durch die Abwesenheit des Gens/Proteins beobachtet werden konnten, stehen nicht im Widerspruch dazu (3.3.2.6, 3.3.2.7). Eine Analyse der differentiellen Regulation einer Auswahl potentieller Glycosidasen in *sun41Δ* Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob

eines der ausgewählten Gene durch den Ausfall von *SUN41* kompensatorisch reguliert wurde. Zu diesem Zweck wurde die *real-time* RT PCR verwendet. Während des exponentiellen Wachstums in Flüssigkultur als Blastosporen bzw. 6 h nach Hyphen-Induktion wurde die Gesamt-RNS von Wildtyp und *sun41Δ* Zellen präpariert und in cDNS umgeschrieben. Diese diente als Matrize in einer *real-time* PCR, mit der die Transkriptmengen der Gene *ACE2*, *ACF2*, *BGL2*, *CBK1*, *CHT3*, *ENG1*, *PHR1*, *PHR2*, *SCW11*, *SIM1*, *SUN41* und *XOG1* analysiert, und zwischen *sun41Δ* und Wildtyp verglichen wurden. Die Normalisierung beruhte auf der Menge des Transkripts von *TDH3*. Das Vorliegen gleicher Mengen dieses Transkripts in den unterschiedlichen Stämmen wurde in Vorversuchen durch den Einsatz genau definierter cDNS-Mengen überprüft. Zusätzlich wurde die Transkriptmenge der betrachteten Gene in Hyphen mit der von *TDH3* ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurde die individuelle Amplifikationseffizienz berücksichtigt. Während des Wachstums als Blastosporen konnte bei keinem der betrachteten Gene eine Regulation auf einen Faktor kleiner 0,5 oder größer 2 festgestellt werden (Bild 3.20 A). Dies weist darauf hin, dass der Verlust von *SUN41* bei Blastosporen keine Auswirkung auf die Regulation dieser Gene hat. In Hyphen wurde ein dazu unterschiedliches Ergebnis erzielt (Bild 3.20 B). In dieser Wachstumsform waren *PHR2* und *ACF2* mit einem Faktor ≥ 2 hoch reguliert. Die Transkripte von *SCW11* und *CHT3* hingegen lagen in *sun41Δ* Mutanten nur in weniger als halb so großer Menge vor wie im Wildtyp. Ebenso waren *ACE2*, *BGL2* und *PHR1* herunter reguliert, allerdings nicht bis zum Faktor 0,5. Die Bestimmung der Transkriptmengen in Hyphen im Vergleich zu der von *TDH3* ergab mit Ausnahme von *PHR1* und *PHR2* nur Werte $\leq 1\%$ von *TDH3* (Bild 3.20 C).

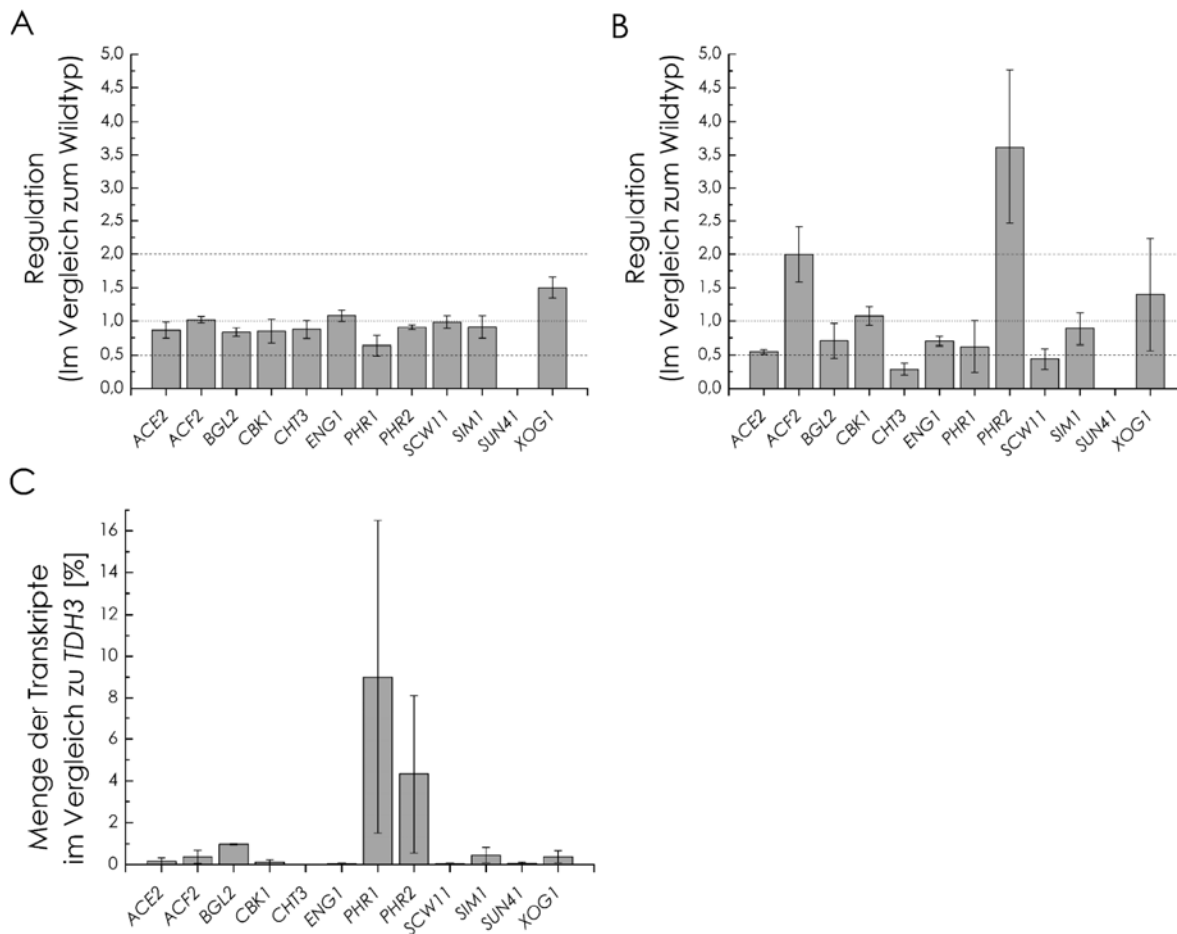


Bild 3.20: Differenzielle Regulation in *sun41Δ* und Wildtyp

Gesamt-RNS aus *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Blastosporen (A) und Hyphen (B) wurde präpariert und in cDNS umgeschrieben. Diese diente als Matrize in einer real-time PCR. Die Transkriptmenge der aufgeführten Gene im *sun41Δ* Mutanten wurde mit der aus dem Wildtyp verglichen. Die gestrichelte Linie markiert eine um das zweifache hoch- bzw. auf die Hälfte herunter regulierte Transkription im *sun41Δ* Stamm. Die gepunktete Linie zeigt gleiche Mengen an. (C) Vergleich der Transkriptmenge der betrachteten Gene in Hyphen mit der von *TDH3* (Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase). Die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ist als Fehlerbalken eingetragen.

3.3.2.10 Adhäsion auf Agarplatten

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die durch das Fehlen von Sun41p ausgelösten Veränderungen (siehe oben) auf das Adhäsionsverhalten auswirkten. Für einen ersten Test wurde die Adhäsion auf Agarplatten geprüft, indem die darauf ausgestrichenen und für 24 h kultivierten *C. albicans* Zellen einem Waschtest unterzogen wurden. Die dabei verwendeten YPD Platten

waren zum Teil mit Kongorot und/oder 10%igem Serum supplementiert. Auf YPD allein ließen sich die Zellen des *sun41Δ* Stamms deutlich schlechter abwaschen als die des Wildtyps oder des *sun41Δ-SUN41* Stamms (Bild 3.21 A, Links). Die mikroskopische Untersuchung dieser auf Platten gewachsenen *sun41Δ* Stämme zeigte, dass die Zellen ebenfalls den in der Flüssigkultur beobachteten Cytokinesedefekt aufwiesen (siehe oben). Eine daraus möglicherweise resultierende verstärkte Zell-Zell Interaktion könnte den Grund für die intensivere Adhäsion darstellen. Um zu prüfen ob der Teilungsdefekt für die stärkere Adhäsion verantwortlich war, wurden Zellen von *sun41Δ*, Wildtyp und *sun41Δ-SUN41* auf Kongorot enthaltende YPD Platten ausgestrichen. Dies induzierte, wie zuvor beschrieben (3.3.2.6), einen Teilungsdefekt auch in den *SUN41* exprimierenden Stämmen wie durch mikroskopische Betrachtung nochmals bestätigt wurde (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass der Teilungsdefekt die beobachtete gesteigerte Adhäsion von *sun41Δ* Mutanten auf YPD Platten verursachte, verhielten sich die Stämme beim Waschtest gleich (Bild 3.21 B). Wurden die YPD Platten zur Induktion von Hyphen mit 10% Serum versetzt, ließen sich die Kolonien des *sun41Δ* Mutanten leichter wegwaschen als die des Wildtyps (Bild 3.21 A, Rechts). Dies lässt vermuten dass die bäumchenartigen Strukturen der *sun41Δ* Zellen, die sich auch unter diesen Bedingungen bildeten (siehe Bild 3.14 B), ein im Vergleich zu den Hyphen des Wildtyps reduziertes Potential besitzen an den Agar zu adhäreren und in ihn einzuwachsen.

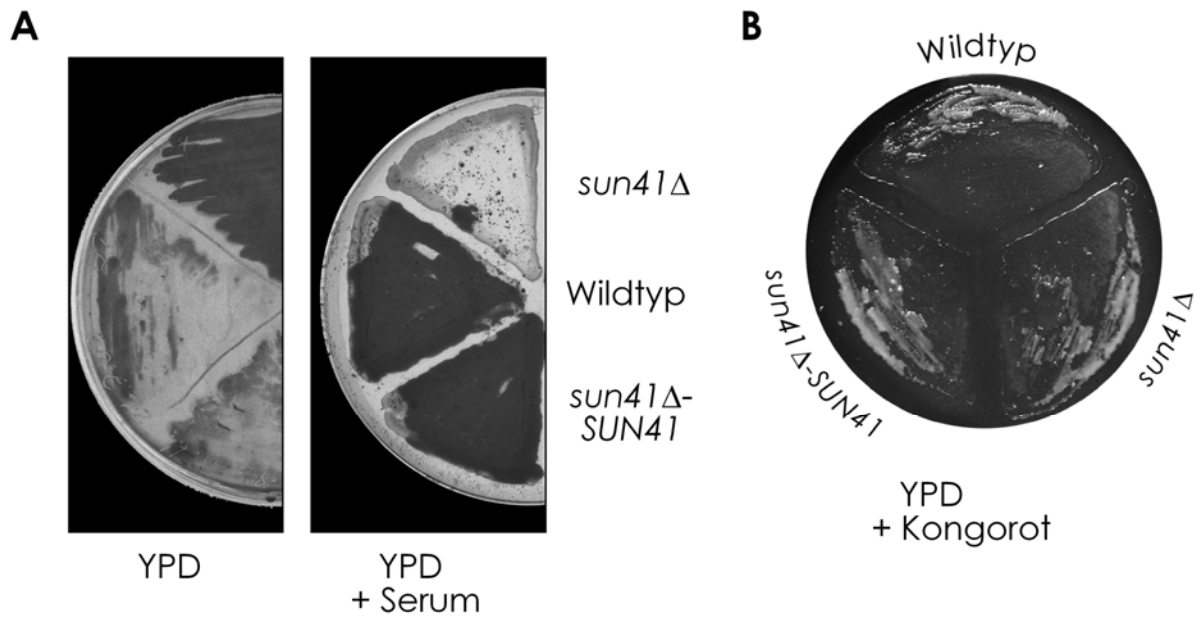


Bild 3.21: Adhäsion auf Agarplatten

Zur Untersuchung der Fähigkeit auf Agarplatten zu haften wurden die indizierten Stämme auf YPD-Platten ausgestrichen, die teilweise mit 10% bovinem Kälberserum (A) oder 300 µg/ml Kongorot (B) versetzt waren. Nach zweitägiger Inkubation bei 30°C (YPD +/- Kongorot) oder 37°C (YPD + Serum) wurden die Platten einem Waschtest unterzogen.

3.3.2.11 *In vitro* Modell der Adhäsion auf Geweben

Die Adhäsion an Epithelien ist eine notwendige Voraussetzung für die Kolonisation und eine spätere Penetration des Wirtsgewebes. Um zu testen ob sich die zuvor auf Platten beobachteten Veränderungen auch auf Geweben finden ließen, wurde die Adhäsion auf einem Darmmodell *in vitro* untersucht. Zu diesem Zweck wurden *C. albicans* Zellen auf einem Caco-2 Zell-Monolayer inkubiert um ihnen die Möglichkeit zu bieten daran zu haften. Zum Vergleich der Kinetik und der Effizienz dieses Vorgangs bei *sun41Δ* und Wildtyp Zellen diente die Bestimmung der Zahl adhärierter bzw. im Überstand vorkommender *C. albicans* zu verschiedenen Zeitpunkten (Bild 3.22). Das Erreichen einer Adhärenz von 67% nach 30 min beim Wildtyp zeigte, dass die Adhäsion schnell und effizient verlief. Das Maximum von 93% war nach 90 min schon nahezu erreicht. Die Zellen des rekonstituierten Stamms *sun41Δ-SUN41* verhielten sich annähernd wie der Wildtyp. Dahingegen fanden sich bei *sun41Δ* nach 30 min nur 54% adhärert, das Maximum von 83% war erst nach 120 min erreicht. Die durch das

Fehlen von *SUN41* in *C. albicans* auf den Agarplatten vorgefundene Verringerung der Adhäsion unter Hyphen induzierenden Bedingungen spiegelte sich also auch bei diesem Versuch auf einer Zellschicht wider, wenn auch nicht so stark ausgeprägt.

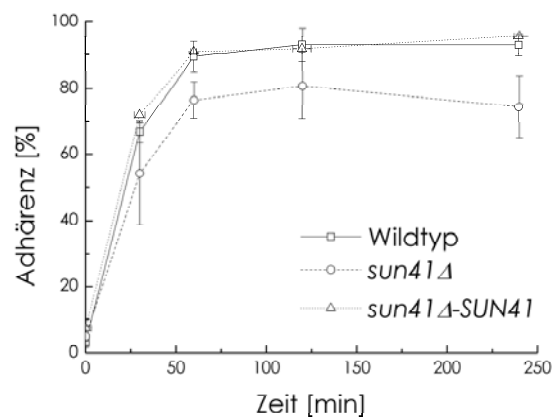


Bild 3.22: Adhäsion auf Caco-2 Zell-Monolayer

C. albicans Zellen der indizierten Stämme wurden auf eine Caco-2 Zellschicht aufgetragen. 0, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Infektion wurde der Prozentsatz der adhärenierten *Candida* Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte mit den Standardabweichungen aus vier Experimenten.

3.3.2.12 Bildung eines Biofilms

Sowohl die Filamentbildung wie auch die Adhäsion sind bei *C. albicans* an der Bildung von Biofilmen beteiligt (Nobile und Mitchell 2006). Diese Biofilme werden auf medizintechnischen Gerätschaften wie Katheteroberflächen gefunden (Jin et al. 2003). Das Augenmerk der Forschung hat sich aufgrund ihrer Persistenz und Resistenz gegen Fungizide auf sie gerichtet (Kontoyiannis und Lewis 2002; Sanglard 2002). Diese Charakteristiken der *C. albicans* Biofilme tragen sowohl zu oberflächlichen wie auch systemischen Candidosen bei (Nguyen et al. 1995; Samaranayake et al. 2002).

In einem Vorversuch wurde die Adhäsion der untersuchten Stämme auf Plastik analysiert. In Mikrotiterplatten ausgesäte *C. albicans* Zellen wurden für 60 min inkubiert und anschließend die Zahl auf dem Untergrund adhärenierter bzw. nicht

adhärierter Zellen im Überstand gezählt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Adhäsion von Wildtyp und *sun41Δ* Zellen (Bild 3.23).

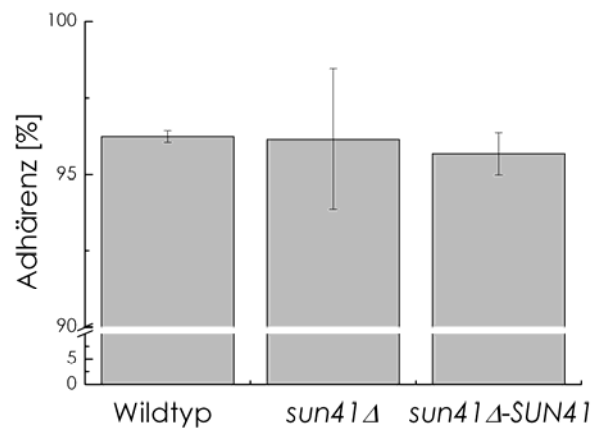


Bild 3.23: Adhäsion auf Plastikoberfläche

C. albicans Zellen der indizierten Stämme wurden in 12 Well Mikrotiterplatten für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Prozentsatz der adhärennten *Candida* Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus zwei Experimenten.

Die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen wurde bei *sun41Δ C. albicans in vitro* getestet. Die Zellen wurden 60 min in Mikrotiterplatten inkubiert und adhärennten währenddessen an die Oberfläche. Nach Entfernung der nicht adhärennten Zellen wurden die Platten für zwei Tage im Brutschrank gelagert um die Bildung des Biofilms zu ermöglichen (Jin et al. 2003). Die Menge an metabolisch aktiven Zellen ließ sich im Anschluss durch den Farbumschlag einer hinzugefügten Lösung ermitteln (Kuhn et al. 2002) (XTT-Aktivitätsassay, 2.23). Dabei zeigte es sich, dass die Biofilme des Wildtyps und des rekonstituierten Stammes durch eine vergleichbare Anzahl Zellen gebildet wurden, bei *sun41Δ* jedoch fiel der Farbumschlag deutlich schwächer aus (Bild 3.24). Dies lässt auf eine stark reduzierte Fähigkeit zur Biofilm Bildung schließen.

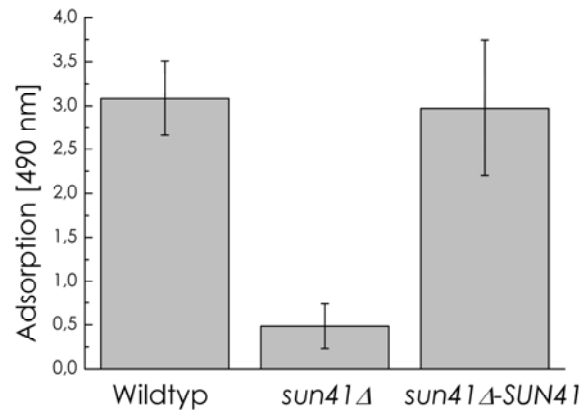


Bild 3.24: Vergleich der Biofilm Bildung verschiedener *C. albicans* Stämme

C. albicans Zellen der indizierten Stämme wurden in 96 Well Mikrotiterplatten mit YNB für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nicht adhärierte Zellen wurden abgewaschen. Die Menge der Zellen, die einen Biofilm bildeten, wurde durch den XTT Aktivitätsassay bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren das arithmetische Mittel mit den Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten.

Für eine detailliertere Analyse wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Biofilme angefertigt (Bild 3.25). Darauf spiegelten sich die schon aus der vorangegangenen Analyse (Bild 3.24) unterschiedlichen Mengen an Biofilm bildenden Zellen wider (Bild 3.25, obere Reihe). Bei stärkerer Vergrößerung war zu erkennen, dass die Biofilme bei *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ-SUN41* hauptsächlich durch lange Hyphen gebildet wurden. Bei *sun41Δ* hingegen waren diese kaum zu finden (Bild 3.25, untere Reihe). Hier überwogen die schon beschriebenen bäumchenartigen Strukturen der Blastosporen. Die beobachtbaren Hyphen waren sehr kurz und ähnelten Pseudohyphen.

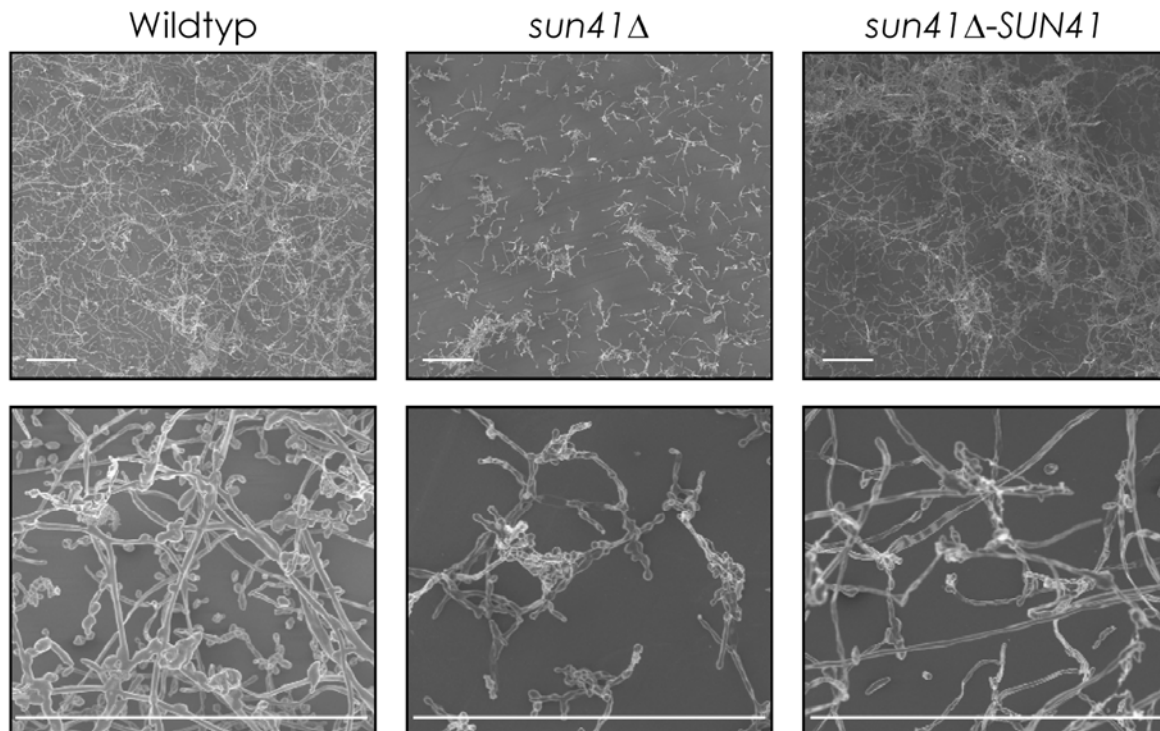


Bild 3.25: Ultrastruktur der Biofilme verschiedener *C. albicans* Stämme

C. albicans Zellen der angezeigten Stämme wurden in 24 Well Mikrotiterplatten auf Plastikplättchen mit YNB für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nicht adhärenzte Zellen wurden abgewaschen. Die Zellen auf den Plättchen wurden lyophilisiert. Nach entsprechender Präparation wurden die Biofilme durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Der Balken entspricht 100 µm.

3.3.2.13 Invasionsassay

Der auf die Adhäsion an die Wirtszellen folgende Schritt ist die Invasion der *C. albicans* Zellen in das Wirtsgewebe. In einem dreidimensionalen epithelialen Zellkultur-Modell des Darms wurde geprüft ob neben der verringerten Adhäsion (siehe 3.3.2.11) auch die Invasion durch die Abwesenheit von Sun41p beeinträchtigt ist, und zu der beobachteten verringerten Virulenz beiträgt (3.3.2.14) (Norice et al. 2007). Zu diesem Zweck wurde ein bereits beschriebenes *in vitro* Modell verwendet (Dieterich et al. 2002; Hernández in press). Auf einer Kollagenschicht konfluent wachsende CACO-2 Zellen wurden mit 45000 *C. albicans* Zellen infiziert und einen Tag bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und in Paraffin eingebettet. Die daraus angefertigten Dünnschnitte wurden nach der PAS Methode und der Methode von McManaus

gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht (McManaus 1989; Papanicolaou 1989). Bei der Färbung werden Bestandteile der Pilz-Zellwand magentarot gefärbt, die Kerne der Epithelzellen erscheinen blau und das Kollagen hellblau. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Invasion zwischen Wildtyp und *sun41Δ* Zellen (Bild 3.26).

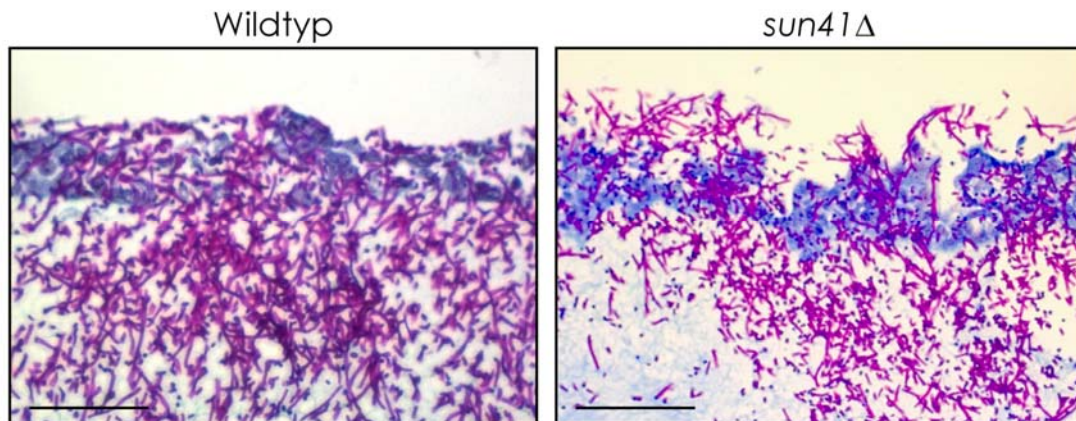


Bild 3.26: Invasion der *C. albicans* auf einem Epithelial-Modell

Die Invasion von *C. albicans* Wildtyp und *sun41Δ* Zellen wurde in einem epithelialen Zellkultur-Modell betrachtet. *C. albicans* Zellen erscheinen nach Färbung der Dünnschnitte magentarot, die Kerne der Epithelzellen blau und das Kollagen hellblau. Der Balken entspricht 50 μm .

3.3.2.14 Virulenztest in der Maus

Die vorangegangenen Experimente zur Morphologie, Adhäsion und Biofilm Bildung hatten erste Hinweise darauf geliefert, dass Sun41p an der Pathogenität von *C. albicans* beteiligt sein könnte. In einem Tiermodell der Maus wurde der Einfluss von Sun41p auf die Virulenz von *C. albicans* untersucht. Dazu wurden 10^8 Zellen des Wildtyps, des *sun41Δ* Stammes und der rekonstituierten Mutante in den Bauchraum von je sechs Mäusen injiziert (2.25). Die Überlebensrate der Mäuse wurde über drei Wochen verfolgt (Bild 3.27). Dabei konnte beobachtet werden, dass beim Wildtyp alle infizierten Mäuse innerhalb von vier Tagen starben. Beim *sun41Δ* Mutanten hingegen überlebte die Hälfte der Mäuse bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Allerdings überlebten auch beim rekonstituierten Stamm *sun41Δ-SUN41* vier von sechs Mäusen über 21 Tage hinweg. Daher konnte nicht sicher von einem Einfluss des Gens *SUN41* auf die

Virulenz ausgegangen werden. Diese Untersuchungen wurden in der Gruppe von Prof. K. Kuchler an der Medizinischen Universität Wien durchgeführt.

Während des Abschlusses dieser Arbeit wurde die verringerte Virulenz eines *C. albicans* *sun41*Δ Stammes im Maus-Modell einer systemischen Infektion in der Blutbahn jedoch von einer weiteren Gruppe berichtet (Norice et al. 2007). In dieser Untersuchungen wurde weiterhin eine verminderte Invasion der Pilzzellen in die untersuchten Organe (Niere, Zunge) der infizierten Mäuse beschrieben (Norice et al. 2007).

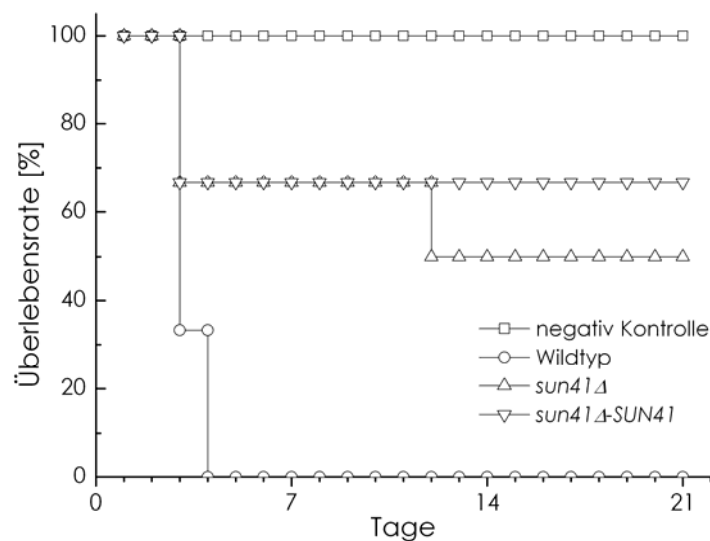


Bild 3.27: Virulenztest verschiedener *C. albicans* Stämme im Mausmodell

10^8 Zellen der angezeigten *C. albicans* Stämme wurden je sechs Mäusen intraperitoneal injiziert. PBS diente als Negativkontrolle. Die Zahl der überlebenden Mäuse wurde über 21 Tage verfolgt.

4 Diskussion

4.1 Zellwandproteine

Während einer Infektion durch pathogene Pilze spielen deren Zellwand und ihre Bestandteile eine besonders wichtige Rolle. Dieses komplexe Netzwerk stellt die Verbindungsstelle der Interaktion von Wirt und Pathogen dar. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass in die Zellwand eingebundene Proteine ausschlaggebend für die Interaktion mit dem Wirt und seinem Immunsystem sind (Chaffin et al. 1998). Hinweise auf Änderungen im Zellwand-Proteom in verschiedenen Wachstumsformen von *C. albicans* wurden zuerst in RNS-Microarray-Experimenten gefunden, und konnten später in Untersuchungen bestätigt werden, die sich auf die Zellwandproteine konzentrierten (Pitarch et al. 2002; Sohn et al. 2003; Urban et al. 2003; Ebanks et al. 2006).

Die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Informationen bezogen sich dabei hauptsächlich auf die Proteine der Blastosporen, bzw. lösliche Zellwandproteine. Zur Untersuchung der kovalent an die *C. albicans*-Zellwand gebundenen Proteine wurde zunächst eine Methode optimiert, mit welcher Fragmente dieser Proteine aus isolierten Zellwänden freigesetzt werden können. Diese Fragmente wurden anschließend durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert und ihren Ursprungproteinen zugeordnet. Dadurch konnten 33 Proteine in der Zellwand von Blastosporen identifiziert werden, sechs davon sind vermutlich über einen GPI-Anker mit der Zellwand verknüpft. Weiterhin konnten 18 Proteine während des Wachstums als Hyphen identifiziert werden, von denen 14 die für den GPI-Anker typische Domäne beinhalten. Für die ausschließlich in Hyphen gefundenen 11 Proteine konnte anhand von Transkriptomdaten gezeigt werden, dass sieben davon in dieser Wachstumsform induziert wurden. Je nach verwendeter Methode zur Fragmentierung der Proteine bzw. zur Identifikation verwendetem Massenspektrometer wurde eine hohe Varianz in der Zahl identifizierter Proteine, bzw. der Zahl zu einem Protein gehörender Peptide, gefunden.

4.1.1 Identifikation der Zellwandproteine

Die Verlässlichkeit einer Proteinidentifikation anhand einer massenspektrometrischen Analyse wird stark durch die Zahl der pro Protein zu Verfügung stehenden Peptidsequenzen und der Qualität der für die Sequenzzuordnung verfügbaren Fragmentspektren beeinflusst. Die Qualität dieser Spektren ist dabei sowohl von der Peptidmenge, der Peptidmasse als auch der jeweiligen Aminosäuresequenz abhängig (Wenschuh et al. 1998; Nold et al. 1999). Um eine möglichst hohe Anzahl an verwertbaren Spektren in Kombination mit einer hohen Abdeckung zu erzeugen, wurden die Proteine in den Zellwänden mit verschiedenen Proteasen geschnitten, die jeweils an unterschiedlichen Schnittstellen ansetzten (3.1.4). Während des Tests mehrerer Proteasen zeigten sich Unterschiede zu einer Diplomarbeit, in der die hier verwendete Methode etabliert wurde (Schwenk 2003). Im Gegensatz zu der früheren Arbeit konnte keine signifikante Verringerung der Trypsinaktivität durch die isolierte Zellwand beobachtet werden (3.1.1). Ebenso zeigte es sich, dass der Verdaupuffer allein nicht zu einer Freisetzung von Proteinen aus der Zellwand führte (3.1.1). Die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität kann in der Verwendung von Trypsin eines anderen Herstellers begründet sein, da die Verdaubedingungen nur geringfügig von denen abwichen, die während der Etablierung der Technik getestet wurden. Möglich wären auch Unterschiede in den verwendeten Zellwänden. Die Präparationen für diese Arbeit erfolgten zwar nach dem gleichen Protokoll, wiesen aber einen wahrscheinlich deutlich geringeren Anteil präparativer Kontaminationen auf, da sich bei der Inkubation mit dem Verdaupuffer allein keine Proteine lösten. Möglicherweise ging die beobachtete Inhibition von Kontaminationen aus, die während der Isolation in den Zellwänden verblieben.

4.1.2 Unterschiedliche Zusammensetzung des Zellwand-Proteoms in

Blastosporen und Hyphen

Insgesamt konnten in den aus Blastosporen isolierten Zellwänden 33 Proteine identifiziert werden, in den aus Hyphen isolierten 18 (3.1.6.2). Von den in Blastosporen gefundenen Proteinen beinhalten sechs eine für GPI-Anker typische Domäne, von denen in Hyphen gefundenen 14. Weder Pir1p noch

Pir32p als Vertreter der PIR-Proteine (proteins with internal repeats) konnten identifiziert werden. Somit handelt es sich bei den in Zellwänden von Blastosporen gefundenen Proteinen nur zu etwa einem Fünftel um Proteine, die aufgrund von *in silico* Analysen als potentiell kovalent verknüpft vorliegen. Mit Ausnahme von Phr2p wurden diese potentiellen GPI-Proteine auch schon in einer früheren Untersuchung als kovalent gebundene Zellwandproteine identifiziert (de Groot et al. 2004). Dabei verwendeten die Autoren sowohl enzymatische Degradationen der Polysaccharide wie auch Behandlungen der Zellwand mit HF-Pyridin oder NaOH um verknüpfte Proteine zu lösen. Diese wurden anschließend tryptisch verdaut und identifiziert. Interessanterweise konnten die Autoren mit allen verwendeten Ansätzen keine Hinweise auf atypische Zellwandproteine finden, die keinem bekanntem Bindungstyp angehören (1.1.2.3). Diese Proteine machten in dieser Untersuchung bei Blastosporen jedoch etwa vier Fünftel aller identifizierten Proteine aus. Dazu gehörten cytoplasmatische Proteine der Glycolyse wie beispielsweise Fba1p, Pgc1 und Tdh3p oder auch plasmamembran- gebundene Proteine wie die ATPase Pma3p (3.1.6.1). Proteine dieser Kompartimente waren in anderen Untersuchungen sowohl als lösliche Zellwandproteine beschrieben worden, als auch mit Methoden gefunden worden die nur kovalent verknüpfte Proteine aufdecken sollten (Pitarch et al. 2002; Urban et al. 2003; Ebanks et al. 2006). Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich dabei entweder um Verunreinigungen der Zellwand während des Zellaufschlusses oder trotz der Extraktionsschritte in der Zellwand verbleibende lösliche Zellwandproteine handelt. Für letzteres spricht eine Untersuchung von Urban et al. in der gezeigt werden konnte, dass die atypischen Zellwandproteine in der Fraktion der löslichen Zellwandproteine keine Verunreinigung der Zellwand durch die Lyse der Zellen darstellen (Urban et al. 2003). Um dies zu überprüfen wurden die Zellwandproteine von Blastosporen und Hyphen vor der Zellwandisolation und dem Verdau mit einem membranimpermeablen Biotinderivat markiert. Durch Dot-Blots und Streptavidin-POD gekoppelter Detektion konnten im durch den Verdau freigesetzte Peptidgemisch markierte Peptide nachgewiesen werden, (Daten nicht gezeigt). In den anschließenden massenspektrometrischen

Analysen ließ sich nur bei insgesamt vier Peptiden der durch die Markierung verursachte Massenzuwachs nachweisen. In anderen Untersuchungen hatte sich eine vergleichbare Markierung in der Massenspektrometrie nicht als problematisch gezeigt, weswegen nicht davon auszugehen ist, dass die Markierung die Identifikation negativ beeinflusst (Oda et al. 2001; Azim-Zadeh et al. 2007). Jedoch konnten während der Identifikation nur Peptide als markiert erkannt werden, deren Massenzuwachs genau den Erwartungen aufgrund der Markierungsreaktion entsprach. Unerwartete Nebenprodukte der Markierung, bzw. aufgrund der harschen Bedingungen der Extraktion aufgetretene Modifikationen könnten die Identifikation der Peptide und deren Markierungen verhindert haben.

In den Zellwänden der Hyphen konnten insgesamt 18 Proteine identifiziert werden, von denen 14 vermutlich über GPI verankert sind (3.1.6.2). Auch wenn insgesamt weniger Proteine als bei Blastosporen gefunden wurden, war der Anteil der atypischen Zellwandproteine deutlich geringer. Dahingegen weisen die von Ebanks et al. veröffentlichten Identifikationen aus hyphalen Zellwänden einen deutlich größeren Anteil atypischer Zellwandproteine und weniger GPI-Proteine auf, obwohl die Autoren eine vergleichbare Methode verwendeten (Ebanks et al. 2006). Das gleiche gilt für die von Pitarch et al. publizierten Daten, die auch Identifikationen aus hyphalen Zellwänden enthalten (Pitarch et al. 2002). In der Arbeit dieser Autoren wurden die Proteine allerdings durch eine enzymatische Degradation des Polysaccharidgerüsts aus den isolierten Zellwänden freigesetzt. Der Grund für diese unterschiedliche Zusammensetzung der gefundenen Proteinspezies ist unbekannt. Möglicherweise liegt der Grund in den unterschiedlichen verwendeten Medien, die zur Kultivierung von *C. albicans* verwendet wurden. Weiterhin können die zur Identifikation verwendeten Methoden und Geräte eine Rolle dabei spielen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ergibt allein schon die Verwendung unterschiedlicher Massenspektrometer eine große Varianz in der Zahl und der Identität der gefundenen Proteine (3.1.6.2).

Möglicherweise steht die unterschiedliche Struktur der isolierten Zellwände bei rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung in Zusammenhang mit dem hier

gezeigten ungleichen Anteil der atypischen Zellwandproteine in Blastosporen und Hyphen (3.1.3). Die aus Hyphen isolierten Zellwände zeigten eine schwammartige Struktur, die eine starke Ähnlichkeit mit den Glucan-Mikrofibrillen der regenerierenden Zellwand von Protoplasten aufwies (Nishiyama et al. 1995; Osumi 1998). Unter der Annahme, dass es sich bei der hier beobachteten Struktur tatsächlich um das Polysaccharidnetzwerk handelt, kann dies auf unterschiedliche Strukturen der Zellwand von Blastosporen und Hyphen hinweisen. Möglicherweise sind die deutlich weniger strukturierten Zellwände der Blastosporen ein Hinweis darauf, dass in diesen im Gegensatz zu den Hyphen nach der Extraktion mehr Proteine in dem Netzwerk verbleiben, die dann in der anschließenden Identifikation als atypische Zellwandproteine erscheinen. Ob diese Proteine dort natürlicherweise vorkommen oder die Zellwand während der Lyse kontaminierten und aufgrund starker Denaturierung während der Extraktion dort verblieben, ließ sich nicht bestimmen.

Elf der insgesamt 18 in Hyphen gefundenen Proteine wurden ausschließlich in den Zellwänden dieser Wachstumsform nachgewiesen. Die Betrachtung der jeweiligen Transkriptionsrate dieser Proteine zeigte in weitgehender Übereinstimmung dazu, dass die nur in Hyphen gefundenen Proteine in Blastosporen gar nicht oder nur schwach transkribiert waren. Unter Hyphen induzierenden Bedingungen war deren Transkription hingegen größtenteils induziert (3.1.10). Somit ließen sich die aufgrund der Untersuchung des Transkriptomts verschiedener Wachstumsformen von *C. albicans* vorhergesagten Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellwandproteine auch auf Proteomebene zumeist bestätigen.

Bei Betrachtung der Effizienz der unterschiedlichen Varianten des Verdauens zeigte sich, dass der sequenzielle Einsatz von CNBr gefolgt von Trypsin die höchsten Identifikationsraten gewährleistete. Die durchschnittliche Zahl der dabei gefundenen Peptide, und damit die Verlässlichkeit der Identifikation, variierte zwischen Blastosporen und Hyphen (3.1.6). Der Grund dafür fand sich in der unterschiedlichen Zusammensetzung der jeweils identifizierten Proteine. Während die potentiell GPI-verankerten Zellwandproteine große Abschnitte in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit

glycosyliert vorliegen, findet sich diese Modifikation kaum bei den atypischen Zellwandproteinen (Ruiz-Herrera et al. 2006; Sohn et al. 2006). Diese Glycosylierung führt dazu, dass bei den GPI-Proteinen ein kleinerer Sequenzbereich für die Protease bzw. die massenspektrometrische Identifikation zugänglich ist als bei den anderen Proteinen, wie auch die Analyse der Sequenzabdeckung bei verschiedenen Proteinen zeigte (3.1.8). Da die atypischen Zellwandproteine bei den Blastosporen in deutlich größerer Zahl als bei den Hyphen auftraten, lag aufgrund der bei diesen Proteinen erreichten höheren Abdeckung auch die Zahl der durchschnittlich pro Protein gefundenen Peptide höher. Wurden nur die GPI-Proteine miteinander verglichen, war dieser Wert gleich (nicht gezeigt).

Die bei den GPI-Proteinen gefundene Sequenzabdeckung ist weiterhin ein Indiz für die Stimmigkeit der Glycosylierungsvorhersage, da aus Bereichen mit einer entsprechenden Vorhersage trotz ausreichend vorhandener Schnittstellen für die Proteasen keine Peptide identifiziert werden konnten (3.1.8).

4.1.3 Sekretierte Proteine

Zu den Charakteristika der potentiell GPI-verankerten Proteine gehört neben der C-terminalen Ankersequenz eine N-terminale Signalsequenz für die Sekretion, die das Ausschleusen des Proteins durch die Zellmembran in die Zellwand ermöglicht (De Groot et al. 2003; Sohn et al. 2006). Um zu prüfen ob die in der Zellwand gefundenen Proteine möglicherweise auch unverankert im Medium auftraten, wurden die jeweils darin befindlichen Proteine analysiert. Während dieser Untersuchung konnten die GPI-Proteine Ywp1p bei Blastosporen und Sod5p bei Hyphen nachgewiesen werden (3.2). Sod5p war auch schon in den isolierten Zellwänden der Hyphen aufgefunden worden, Ywp1p jedoch nicht in denen der Blastosporen. Weiterhin wurden bei Blastosporen und Hyphen die schon aus den jeweiligen isolierten Zellwänden bekannten Proteine MP65p und Tos1p gefunden. Sowohl für diese, wie auch für alle weiteren im Medium gefundenen Proteine gilt mit Ausnahme von Dsl1p, dass sie eine auf die Sekretion hinweisende Signalsequenz beinhalten (Lee et al. 2003). Die fast vollständige Abwesenheit von Proteinen ohne diese Signalsequenz legt nahe,

dass es sich bei den identifizierten Proteinen um Proteine handelt die über den klassischen Sekretionsweg sekretiert werden. Eine Kontamination durch cytoplasmatische Proteine lysierter Zellen im Medium hätte zur Identifikation von im Cytoplasma abundant vorkommenden Proteinen wie beispielsweise Aktin und GAPDH geführt.

Unter den identifizierten Proteinen befand sich auch Sun41p, das sowohl im Überstand von Blastosporen als auch von Hyphen aufgefunden wurde. Dieses Protein, das als Substrat für die am sekretorischen Weg beteiligte Serin-Protease Kex2p in Frage kommt, gehört zu einer auf Pilze beschränkte Familie von Proteinen (Newport et al. 2003) (1.1.4.1). Aufgrund dessen, und einer auf der Homologie zu *SUN4* aus *S. cerevisiae* resultierenden Verbindung zu Zellwand, stellt Sun41p möglicherweise ein interessantes Ziel für eine Anti-Pilz Therapie dar und wurde daher weitergehend untersucht.

4.2 *SUN41*

Das Gen *SUN41* ist als homologes Gen zu *SUN4* aus *S. cerevisiae* annotiert (<http://www.candidagenome.org/>), dabei liegt die Übereinstimmung auf Proteinebene bei 57% Identität und 70% Ähnlichkeit. In *S. cerevisiae* wurde *SUN4* mit verschiedenen Funktionen in Verbindung gebracht. Dazu gehören Zellwandbiogenese, Zellgröße, Cytokinese und eine Beteiligung an mitochondrialen Abläufen (Cappellaro et al. 1998; Velours et al. 2002). In früheren Arbeiten konnte eine transkriptionelle Hochregulation von *SUN41* in *C. albicans* während des Wachstums als Hyphen gezeigt werden¹ (Sohn et al. 2003). Zur Untersuchung der Funktionen des durch *SUN41* kodierten Proteins, wurde das Gen aus dem Genom entfernt. Durch Vergleich des Phänotyps der Deletionsmutante mit der des Wildtyps unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte auf die Funktion des Proteins geschlossen werden.

¹ Parallel zur Veröffentlichung des Sun41p betreffenden Teils dieser Arbeit (Hiller et al. 2007) erschienen *SUN41* betreffende Publikationen von zwei weiteren Gruppen (Firon et al. 2007, Norice et al. 2007). Deren Ergebnisse werden im weiteren Text diskutiert.

Nach der Deletion des Gens *SUN41* wiesen die Mutanten die für *C. albicans* üblichen Wachstumsraten auf (3.3.2.3). Dies zeigt, dass *SUN41* unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell für das Überleben der Zellen ist. Allerdings fielen bei den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp mehrere Abweichungen auf, die einen Bezug auf die Zellwandbiogenese und Morphogenese vermuten lassen. Dazu gehören Defekte der Cytokinese, der Sensitivität gegenüber die Zellwand schädigenden Substanzen und der Hyphenbildung auf einem festen Substrat. Des Weiteren konnte eine verringerte Fähigkeit der Biofilmbildung und der Adhäsion auf Zellen als auch Hinweise auf eine reduzierte Virulenz festgestellt werden.

4.2.1 Beteiligung von Sun41p an der Zellwandbiogenese

Sowohl nach dem Wachstum auf festem wie auch in flüssigen Medium zeigte die mikroskopische Betrachtungen der Blastosporen einen Defekt der Zellteilung. Die Tochterzellen trennten sich auch nach Erreichen der vollständigen Zellgröße nicht von den Mutterzellen und starteten ihrerseits wiederum einen neuen Teilungszyklus. Dies führte zu einem bäumchenartigen Wachstum der Zellkonglomerate (3.3.2.4). Wie auf elektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen war, wiesen die *sun41Δ* Zellen an den Verbindungsstellen der Zellen sowohl ein intaktes Septum auf, wie auch eine normale Zellwand. Die deutet darauf hin, dass nach einer abgeschlossenen Cytokinese nur der finale Schnitt zur Trennung der Zellen ausbleibt. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Firon et al. (Firon et al. 2007). Der hier gezeigte Cytokinesedefekt wurde ebenfalls bei der Deletion des zu *SUN41* homologen Gens *SUN4* in *S. cerevisiae* beobachtet (Mouassite et al. 2000). Die Verwendung von Methoden zur spezifischen Kontrastierung der unterschiedlichen Zellwandbestandteile könnte allerdings in Zukunft bisher nicht bemerkte Veränderungen sichtbar machen. Beispielsweise könnte eine Färbung der Polysaccharide (Silva und Macedo 1987) in der Zellwand Hinweise darauf liefern, ob eine Veränderung in deren Zusammensetzung oder ihrem Aufbau an der Verbindungsstelle für die ausbleibende Trennung verantwortlich ist. Anhaltspunkte auf die Beteiligung der Polysaccharide der Zellwand, insbesondere des Glucans, hatten auch noch

weitere Versuche geliefert. So waren die *C. albicans sun41Δ* Blastosporen wie auch die *S. cerevisiae sun4Δ* Mutanten deutlich resistenter gegenüber der Lyse durch eine β -1,3-Glucanase (3.3.2.6) (Mouassite et al. 2000). Dies kann auf eine Veränderung des β -1,3-verknüpften Glucans in der Zellwand hinweisen, mit einer daraus resultierenden geringeren Anfälligkeit gegenüber einem dieses Glucan spaltenden Enzym. Dabei wäre sowohl eine veränderte Struktur der Mikrofibrillen denkbar, als auch ein verringerter Anteil an β -1,3-Glucan mit einer gleichzeitigen Erhöhung des Anteils von β -1,6-Glucan, da die Gesamtmenge an β -Glucan in den *sun41Δ* Blastosporen keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies (3.3.2.7). Für eine Veränderung des β -1,3-Glucans sprechen weiterhin die erhöhte Sensitivität des *sun41Δ* Stammes gegenüber Kongorot (3.3.2.6) und, wie Norice et al. beobachteten, gegenüber Caspofungin (Norice et al. 2007). Kopecká et al. zeigten bei *S. cerevisiae*, dass Kongorot die Zusammenlagerung der aus β -1,3-Glucan- Helices gebildeten Mikrofibrillen in der Zellwand beeinträchtigt, was zu einer verringerten Teilungsrate führt (Kopecka und Gabriel 1992). Bei Plattenexperimenten zeigte sich, dass die *SUN41* deletierten *C. albicans* Mutanten sensitiver als der Wildtyp auf diesen Farbstoff reagierten (Bild 3.16). Dies deutet auf eine durch die Deletion ausgelöste Veränderung des Glucan-Netzwerkes hin, dessen weitere Störung durch Kongorot dann zu einer verringerten Teilungs-/Überlebensrate führt (3.3.2.6). Dass eine derartige Veränderung im Aufbau der Zellwand zu einem Teilungsdefekt führen kann wie er auch bei der *sun41Δ* Mutante auftrat, wurde durch Inkubation von Blastosporen des Wildtyps mit Kongorot gezeigt. Die dabei auftretenden Zellkonglomerate aus sich teilenden, aber nicht trennenden Zellen glichen denen der *sun41Δ* Mutante (Kopecka und Gabriel 1992) (Bild 3.14, Bild 3.16). Die durch Norice et al. beobachtete Hypersensitivität gegenüber Caspofungin, einem Inhibitor der β -1,3-Glucan-Synthase, stellt ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Sun41p an der Biogenese des Glucan-Netzwerkes dar. Eine durch Caspofungin in der verwendeten Konzentration reduzierte β -1,3-Glucan-Synthese wirkte sich auf den *SUN41* deletierten Stamm im Gegensatz zum Wildtyp letal aus (Norice et al. 2007). Diese Beobachtung ließe sich damit erklären, dass ohne Sun41p der Aufbau des Glucan-Netzwerkes gestört ist. Die

durch den Inhibitor verursachte zusätzliche Verringerung des zum Aufbau benötigten β -1,3-Glucans bewirkt dann in Kombination eine stark reduzierte Vitalität der Zellen.

Die Ursache der gemessenen Vergrößerung der *sun41 Δ* Blastosporen konnte nicht aufgeklärt werden, allerdings steht sie im Einklang mit entsprechenden Messungen bei dem *SUN4* deletierten *S. cerevisiae* Stamm (Mouassite et al. 2000). Als möglichen Grund nennen die Autoren eine leichte Veränderung in der Generationszeit, die zu einer Akkumulation von Zellen mit doppeltem DNS-Gehalt führt. Die erhöhte Anzahl der in dieser Phase leicht vergrößerten Zellen könnten zur beobachteten Verschiebung der mittleren Zellgröße geführt haben (3.3.2.5). Eine durchflusscytometrische Analyse des DNS-Gehalts der *C. albicans sun41 Δ* Blastosporen könnte hier zur Klärung beitragen.

4.2.2 Sun41p beeinflusst die Bildung von Hyphen

Interessanterweise konnte bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten keine Beeinträchtigung der Hyphenbildung in Flüssigmedium festgestellt werden (3.3.2.8). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der von Firon et al. kürzlich veröffentlichten Beobachtung, dass die Hyphen eines vergleichbaren *sun41 Δ* *C. albicans* Stammes ab dem Auftreten des ersten Septums (ca. 120 min nach Induktion der Hyphenbildung) eine Veränderung in der Länge, im Durchmesser und der Zahl der Verzweigung aufweisen (Firon et al. 2007). Die von den Autoren beschriebene verstärkte Flockenbildung der Zellen im Medium, die sie auf diese Veränderungen zurückführten, wurde allerdings auch in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen beobachtet. Ihre Ursache konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Der Grund für die Diskrepanz der beiden Versuche kann in den für den *knock out* verwendeten unterschiedlichen Stämmen zu finden sein. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten prototrophen Stamm SC5314 wurde von Firon et al. ein diesem Isolat abstammender auxotropher Stamm (BWP17) eingesetzt (Firon et al. 2007).

Einen deutlich stärkeren Effekt als in Flüssigmedium hatte der Verlust von *SUN41* hingegen unter Hyphen induzierenden Bedingungen auf den entsprechenden Festmedien. Dabei konnten keine Hyphen beobachtet werden, die Zellen

wuchsen weiterhin in der schon vorab beschriebenen bäumchenartigen Struktur als Blastosporen. Nur vereinzelt traten Pseudohyphen oder Hyphen ähnelnde Strukturen auf (3.3.2.8). Daraus lässt sich schließen, dass die *sun41Δ* Mutanten zwar prinzipiell in der Lage sind Hyphen zu bilden, dass aber die notwendige Änderung des morphogenetischen Programms für die Bildung von Hyphen auf einem festen Untergrund durch das Fehlen von *SUN41* gestört ist. Eine Veränderung in der Zellwand, die die Wahrnehmung der Umgebung stört, könnte dafür die Ursache sein.

Die Transkriptionsuntersuchung einiger als Glycosidase annotierter Gene zeigte eine Hochregulation von *PHR2* im Hyphen induzierendem Flüssigmedium im *sun41Δ* Stamm (3.3.2.9). Bei *PHR2* handelt es sich um eine Glycosidase die mit der Zellwandstruktur, vorrangig mit den β -1,3- Verknüpfungen des Glucans, in Verbindung gebracht wird (Fonzi 1999). Die Transkription wird üblicherweise durch niedrigen pH, hohen Eisengehalt und Fluconazol induziert (Bensen et al. 2004; Lan et al. 2004; Copping et al. 2005). Die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Transkriptionsrate im Vergleich zum Wildtyp konnte allerdings nicht durch eine verstärkte Ansäuerung des Mediums verursacht worden sein, da diese bei *sun41Δ* schwächer ausfiel als beim Wildtyp. Daher kann die veränderte Transkription auch als kompensatorische Regulation angesehen werden, durch die der Ausfall von Sun41p ausgeglichen wird. Dazu passend trat dann unter diesen Bedingungen auch keine Veränderung des Phänotyps auf. Diese Interpretation würde wiederum auf eine Funktion von Sun41p als Glycosidase hinweisen. In Folge dieser Hypothese würde der mögliche kompensatorische Effekt anderer Glycosidasen auf den Verlust von *SUN41* durch die Anwesenheit von Kongorot im Medium wieder unterbunden, da die Deletionsmutanten nun wieder in ihrer bäumchenartigen Struktur als Blastosporen auftraten. Auf die Hyphenbildung des Wildtyps wirkte sich Kongorot kaum aus. Dies kann bedeuten, dass die Zusammensetzung /der Aufbau der Zellwand von der Zelle wahrgenommen wird, und der jeweilige Zustand zu unterschiedlichen Entscheidungen bezüglich der Wachstumsform der Zellen führt.

4.2.3 Sun41p beeinflusst die Adhäsion

Die beobachteten Phänotypen, insbesondere das Ausbleiben von Hyphen auf festem Medium, wirkte sich stark auf das Adhäsionsverhalten aus. Sowohl auf Agarplatten wie auch auf einer Caco-2 Zellschicht adhärirten die *sun41Δ* Zellen schwächer an den Untergrund.

Da die Zellen keine Hyphen bildeten, und damit nicht tief in den Agar eindringen und sich dort verankern konnten, ließen sie sich weitaus leichter von der Oberfläche waschen als der Wildtyp (3.3.2.10). Dahingegen war die Adhäsion der Mutanten stärker, wenn beide Stämme als Blastosporen wuchsen. Die in der bäumchenartigen Struktur wachsenden *sun41Δ* Konglomerate verankerten sich stärker in der Plattenoberfläche, als die sich normal teilenden Wildtyp-Zellen. Dass diese verstärkte Adhäsion tatsächlich durch den Wachstumstyp ausgelöst wurde, ließ sich durch die Zugabe von Kongorot zeigen. Auf diesem Medium wiesen nun auch die Wildtyp Blastosporen den Teilungsdefekt auf, was zu einer übereinstimmenden Adhäsion auf den Platten führte (3.3.2.10). Die steigende Adhäsion auf den Platten repräsentiert also den Grad der zellulären Verbindung, ausgehend von einzelnen Blastosporen, über aufgrund des Cytokinesedefekt zusammenhängen Zellen, hin zu in den Agar stark eindringenden Hyphen als zusammenhängendes Netzwerk.

4.2.4 Sun41p wirkt bei der Bildung eines Biofilms mit

Die verringerte Bildung von Hyphen auf Oberflächen wirkte sich auch auf Biofilme in einem *in vitro* System aus. Deren Bildung kann im Wesentlichen in drei Stadien unterteilt werden. (I) Zuerst adhärirten die Zellen als Blastosporen an die Oberfläche und besiedeln diese. (II) Anschließend wachsen und proliferieren diese Blastosporen während sie die grundlegende Schicht verankerter Zellen bilden. (III) Im letzten Schritt folgt pseudohyphales und massives hyphales Wachstum. Es wird von der Produktion der extrazellulären Matrix begleitet (Nobile und Mitchell 2006). Sowohl bei Norice et al. wie auch in den hier durchgeführten Versuchen wies der *sun41Δ* Stamm eine deutlich verringerte Fähigkeit auf, Biofilme zu formen (3.3.2.12) (Norice et al. 2007). Da gezeigt werden konnte, dass die Adhäsion an die Plastikoberfläche der *sun41Δ*

Mutanten nicht beeinträchtigt war und sie, zumindest in Flüssigkultur, auch kein Wachstumsdefizit aufwies, kann das beobachtete Ausbleiben des hyphalen Wachstums die starke Reduktion des Biofilms erklären. Unter der Annahme, dass es sich bei Sun41p wie vorhergesagt um eine Glycosidase handelt, könnte zudem auch der Aufbau der extrazellulären Matrix beeinflusst sein. Glucan stellt einen der Hauptbestandteile der Matrix dar (Al-Fattani und Douglas 2006; Nett et al. 2007). Eine Untersuchung dazu, beispielsweise durch Rasterelektronenmikroskopie steht noch aus.

4.2.5 Sekretion von Sun41p ins Medium

Eine mögliche Beteiligung am Aufbau der Matrix wird durch die Entdeckung des Proteins Sun41p im Medium unterstützt. In den massenspektrometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Sun41p sowohl von Blastosporen wie auch von Hyphen in das umgebende Medium sekretiert wird (3.2). Auch wenn die Art der durchgeführten Versuche keine echte Angabe von Mengen erlaubt, lassen die Peakintensitäten während der MALDI-TOF Messungen darauf schließen, dass Sun41p zu den abundanten sekretierten Proteinen gehört. Andernfalls wären die von Sun41p stammenden Peptide durch die Peptide der in der Mischung dominant vertretenen Proteine unterdrückt worden. Quantitative proteomische Assays dürften hier in Zukunft genauere Aussagen dazu erlauben, wie viel Sun41p unter welcher Wachstumsbedingung sekretiert wird. Die Detektion des Proteins im Medium bestätigt damit die Vorhersage der Sekretion aufgrund einer für diese typische Signalsequenz am N-Terminus des Proteins (Lee et al. 2003). Nachdem die vorangegangenen Messungen die Anwesenheit des Sun41p im Medium der Zellen nachgewiesen hatten, wurde getestet ob Medium, das zuvor durch Wildtyp Blastosporen mit Sun41p konditioniert worden war, den Cytokinesedefekt der *sun41Δ* Zellen beeinflussen würde. Bei diesen Versuchen konnte allerdings keine Effekt auf den Phänotyp der Mutanten beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies legt den Schluss nahe dass die Funktion von Sun41p die zur Trennung der Zellen während der Cytokinese beiträgt möglicherweise an einen bestimmten Ort, beispielsweise die Zellwand an der Knospungsstelle, gekoppelt ist. Auch kommen für das Protein

weitere, bisher nicht getestete Funktionen in Frage. Interessanterweise wurde Sun41p bisher nicht in der Zellwand gefunden, obwohl die Proteine dieses Kompartiments im Mittelpunkt mehrerer Untersuchungen standen (Pitarch et al. 2002; Choi et al. 2003; Urban et al. 2003; Ebanks et al. 2006). Für das zu Sun41p homologe Protein aus *S. cerevisiae* konnte diese Lokalisation hingegen gezeigt werden. Hierbei konnte ein mit einem Marker versehenes Sun4p durch den Einsatz von reduzierend wirkenden Substanzen aus der Zellwand gelöst werden. Zusätzlich wurde dieses Protein auch in den Mitochondrien gefunden (Cappellaro et al. 1998; Velours et al. 2002). Aufgrund der in SDS-PAGE beobachteten Größe, und der Bindung des markierten Sun4p an Concanavalin A, schließen die Autoren dass das Protein durch Glycosylierungen modifiziert wird. Eine entsprechende Vorhersage aufgrund der Sequenz gibt es auch für *C. albicans* Sun41p. Versuche der Lokalisation von Sun41p über eine C-terminale Markierungen, beispielsweise mit dem *green fluorescent protein*, schlugen mehrfach fehl, da sich das Fusionsprotein als nicht funktionell herausstellte (Daten nicht gezeigt; Arnaud Firon, persönliche Mitteilung). Verfahren bei denen das Protein in ganzen Zellen oder in Dünnschnitten für die Elektronenmikroskopie durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden kann, werden in Zukunft möglicherweise dazu beitragen die Lokalisation zu bestimmen.

4.2.6 Sun41p ist ein Virulenzfaktor

Die beschriebenen Ergebnisse der Adhäsionstests und Biofilmbildung deuteten darauf hin, dass *SUN41* die Virulenz von *C. albicans* beeinflusst. Dies wurde untersucht, in dem die für die Virulenz wichtige Adhäsion und Invasion an *in vitro* Darmepithelmodellen geprüft (3.3.2.11), und anschließend die Virulenz in einem intraperitonealen Mausmodell bestimmt wurde (3.3.2.14). Es zeigte sich dass der Verlust von *SUN41*, und die damit verbundenen zellulären Veränderungen (siehe oben) dazu führten, dass diese *C. albicans* Mutanten in einem geringeren Umfang an den Zellen des Epithelmodells adhärirten. Der schon auf den Agarplatten beobachtete Effekt trat also auch auf einem komplexeren zellulären Untergrund auf. Die Invasion in das entsprechende Hautmodell war hingegen nicht beeinflusst und lief in vergleichbarer Intensität wie beim Wildtyp

ab (3.3.2.13). Dies wurde auch in entsprechenden Experimenten durch Norice et al. beobachtet, allerdings zeigte sich bei deren Experimenten auch keine verringerte Adhäsion auf den Epithelmodellen (Norice et al. 2007). Die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Adhäsion (ca. 15% schwächer) auf dem Darmepithelmodell führte nicht zu einer sichtbaren Verringerung der Invasion im Hautmodell.

Bei Verwendung des Mausmodells zeigte der *sun41Δ* Stamme hingegen eine deutliche Reduktion der Virulenz (3.3.2.14) (Norice et al. 2007). Zwar zeigte in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen auch der rekonstituierte Stamm eine vergleichbare Reduktion der Virulenz im intraperitonealen Modell, weswegen dieser Effekt nicht eindeutig auf den Verlust von *sun41* zurückzuführen ist. Jedoch war auch der von Norice et al. konstruierte *sun41Δ* Stamm bei einer systemischen Infektion der Mäuse komplett avirulent. Präparationen von Niere und Zunge infizierter Mäuse zeigten, dass dieser Stamm nicht mittels Hyphen in die betrachteten Gewebe eindrang (Norice et al. 2007). Über den Grund der geringeren Virulenz des rekonstituierten Stammes lässt sich nur spekulieren. Die Analyse der *SUN41* Transkriptmenge zeigte, dass sie in diesem Stamm nur etwa die Hälfte der des Wildtyps erreichte, was darin begründet sein dürfte, dass nur ein Allel des Gens rekonstituiert wurde (3.3.1). Möglicherweise als Folge daraus konnte beim *sun41Δ-SUN41* Stamm keine vollständige Wiederherstellung der Virulenz im Mausmodell, der Wildtyp-Zellgröße als auch der Sensitivität gegenüber der β -1,3-Glucanase festgestellt werden. Bei den restlichen Experimenten konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden.

Dies zeigt einen Gen-Dosis-Effekt, bei dem die mutmaßlich ebenfalls verringerte Menge an Sun41p einen Einfluss auf bestimmte Funktionen des Proteins hat, welche daraufhin dann auch die Virulenz in der Maus beeinflussten. Bei Norice et al. wies der rekonstituierte Stamm annähernd die Ausgangsmenge des *SUN41* Transkripts auf (Norice et al. 2007).

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Identifikation von Zellwandproteinen optimiert, von kovalent an das Polysaccharidgerüst geknüpft sind. Diese Methode wurde verwendet um Proteine aus der Zellwand von *C. albicans*

Blastosporen und Hyphen zu analysieren. Weiterhin wurden sekretierte Proteine untersucht und eines davon, Sun41p, durch Erstellung eines entsprechenden Deletionsstammes näher charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden dass dieses Protein an der Zellwandbiogenese beteiligt ist, insbesondere an Prozessen der Cytokinese und dadurch auch an der Virulenz in Modellsystemen. Dies weist auf eine wichtige Rolle von Sun41p bei der Interaktion des Pathogen *C. albicans* mit dem Wirt hin und bestätigt seine Identifikation als interessantes Ziel für Antimykotika.

5 Literaturverzeichnis

- Al-Fattani, M. A. and Douglas, L. J. (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance." *J Med Microbiol* **55**(Pt 8): 999-1008.
- Ausubel, F. M. (1988). Current protocols in molecular biology. New York, Greene Pub. Associates ; Wiley-Interscience.
- Azim-Zadeh, O., Hillebrecht, A., Linne, U., Marahiel, M. A., Klebe, G., Lingelbach, K. and Nyalwidhe, J. (2007). "Use of biotin derivatives to probe conformational changes in proteins." *J Biol Chem* **282**(30): 21609-17.
- Bensen, E. S., Martin, S. J., Li, M., Berman, J. and Davis, D. A. (2004). "Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p." *Mol Microbiol* **54**(5): 1335-51.
- Birktoft, J. J. and Breddam, K. (1994). "Glutamyl endopeptidases." *Methods Enzymol* **244**: 114-26.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. and Loewenberg, J. R. (1969). "A simple colorimetric method for determination of protein." *Anal Biochem* **31**(1): 146-8.
- Camougrand, N. M., Mouassite, M., Velours, G. M. and Guerin, M. G. (2000). "The "SUN" family: UTH1, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Biochem Biophys* **375**(1): 154-60.
- Cappellaro, C., Mrsa, V. and Tanner, W. (1998). "New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating." *J Bacteriol* **180**(19): 5030-7.
- Castillo, L., Martinez, A. I., Garcera, A., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R. (2003). "Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan." *Yeast* **20**(11): 973-83.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). "Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 130-80.
- Chaffin, W. L. and Stocco, D. M. (1983). "Cell wall proteins of *Candida albicans*." *Can J Microbiol* **29**(10): 1438-44.
- Choi, W., Yoo, Y. J., Kim, M., Shin, D., Jeon, H. B. and Choi, W. (2003). "Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis." *Yeast* **20**(12): 1053-60.
- Cole, S. R., Ashman, L. K. and Ey, P. L. (1987). "Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates." *Mol Immunol* **24**(7): 699-705.

- Copping, V. M., Barelle, C. J., Hube, B., Gow, N. A., Brown, A. J. and Odds, F. C. (2005). "Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of *SAP2* and *SAP9* secreted proteinase genes." *J Antimicrob Chemother* **55**(5): 645-54.
- de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., de Koster, C. and Klis, F. M. (2004). "Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins." *Eukaryot Cell* **3**(4): 955-65.
- De Groot, P. W., Hellingwerf, K. J. and Klis, F. M. (2003). "Genome-wide identification of fungal GPI proteins." *Yeast* **20**(9): 781-96.
- De Groot, P. W., Ram, A. F. and Klis, F. M. (2005). "Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls." *Fungal Genet Biol* **42**(8): 657-75.
- de Groot, P. W., Yin, Q. Y., Weig, M., Sosinska, G. J., Klis, F. M. and de Koster, C. G. (2007). "Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* **24**(4): 267-78.
- de Nobel, H. and Lipke, P. N. (1994). "Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly?" *Trends Cell Biol* **4**(2): 42-5.
- de Pauw, B. E. and Meunier, F. (1999). "The challenge of invasive fungal infection." *Chemotherapy* **45 Suppl 1**: 1-14.
- Dieterich, C., Schandar, M., Noll, M., Johannes, F. J., Brunner, H., Graeve, T. and Rupp, S. (2002). "In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* *EFG1* and *CPH1* to adhesion and invasion." *Microbiology* **148**(Pt 2): 497-506.
- Drapeau, G. R., Boily, Y. and Houmard, J. (1972). "Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* **247**(20): 6720-6.
- Ebanks, R. O., Chisholm, K., McKinnon, S., Whiteway, M. and Pinto, D. M. (2006). "Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins." *Proteomics* **6**(7): 2147-56.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. and Eisenhaber, F. (2004). "A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." *J Mol Biol* **337**(2): 243-53.
- Elorza, M. V., Rico, H. and Sentandreu, R. (1983). "Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells." *J Gen Microbiol* **129**(5): 1577-82.
- Ernst, J. F. (2000). "Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis." *Microbiology* **146** (Pt 8): 1763-74.
- Fankhauser, N. and Maser, P. (2005). "Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map." *Bioinformatics* **21**(9): 1846-52.

- Firon, A., Aubert, S., Iraqui, I., Guadagnini, S., Goyard, S., Prevost, M. C., Janbon, G. and d'Enfert, C. (2007). "The *SUN41* and *SUN42* genes are essential for cell separation in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **66**(5): 1256-1275.
- Fonzi, W. A. (1999). "*PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans." *J Bacteriol* **181**(22): 7070-9.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. and Hube, B. (2005). "Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood." *Mol Microbiol* **56**(2): 397-415.
- Francois, J. M. (2006). "A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls." *Nat Protoc* **1**(6): 2995-3000.
- Garcera, A., Martinez, A. I., Castillo, L., Elorza, M. V., Sentandreu, R. and Valentin, E. (2003). "Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein." *Microbiology* **149**(Pt 8): 2137-45.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y. and Kirsch, D. R. (1984). "Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations." *Mol Gen Genet* **198**(1): 179-82.
- Gross, E. and Witkop, B. (1962). "Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease." *J Biol Chem* **237**: 1856-60.
- Haynes, M. P., Chong, P. L., Buckley, H. R. and Pieringer, R. A. (1996). "Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells." *Biochemistry* **35**(24): 7983-92.
- Heine, S. (2007). "Charakterisierung von Sun41p - ein mögliches Zellwandprotein - in *Candida albicans* " *Diplomarbeit*.
- Hernández, R. (in press). Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro. Part II. Histological methods for studying fungal invasion. *Host-Pathogen Interaction*. S. Rupp und K. Sohn, Humana Press Inc.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H. and Rupp, S. (2007). "*Candida albicans* Sun41p, a Putative Glycosidase, Is Involved in Morphogenesis, Cell Wall Biogenesis, and Biofilm Formation." *Eukaryot Cell* **6**(11): 2056-65.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene* **57**(2-3): 267-72.
- Jin, Y., Yip, H. K., Samaranayake, Y. H., Yau, J. Y. and Samaranayake, L. P. (2003). "Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection." *J Clin Microbiol* **41**(7): 2961-7.
- Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T. and Watson, J. T. (1987). "Novel fragmentation process of peptides by collision-induced

- decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine." *Anal. Chem.* **59**(21): 2621-2625.
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H. and Klis, F. M. (2000). "The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants." *Mol Microbiol* **35**(3): 601-11.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. and Klis, F. M. (1996). "Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer." *Glycobiology* **6**(3): 337-45.
- Kontoyiannis, D. P. and Lewis, R. E. (2002). "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi." *Lancet* **359**(9312): 1135-44.
- Kopecka, M. and Gabriel, M. (1992). "The influence of congo red on the cell wall and (1---3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Microbiol* **158**(2): 115-26.
- Kreger, D. R. and Kopecka, M. (1976). "On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: an electronmicroscopic, x-ray diffraction and chemical study." *J Gen Microbiol* **92**(1): 207-220.
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. and Ghannoum, M. A. (2002). "Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces." *Infect Immun* **70**(2): 878-88.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lan, C. Y., Rodarte, G., Murillo, L. A., Jones, T., Davis, R. W., Dungan, J., Newport, G. and Agabian, N. (2004). "Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **53**(5): 1451-69.
- Lee, S. A., Wormsley, S., Kamoun, S., Lee, A. F., Joiner, K. and Wong, B. (2003). "An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms." *Yeast* **20**(7): 595-610.
- Liu, H., Kohler, J. and Fink, G. R. (1994). "Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog." *Science* **266**(5191): 1723-6.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. and Fink, G. R. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-49.
- Magee, B. B. and Magee, P. T. (2000). "Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains." *Science* **289**(5477): 310-3.
- Marcilla, A., Elorza, M. V., Mormeneo, S., Rico, H. and Sentandreu, R. (1991). "*Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol." *Arch Microbiol* **155**(4): 312-9.

- Matthews, R. C. and Burnie, J. P. (2005). "Human recombinant antibody to HSP90: a natural partner in combination therapy." *Curr Mol Med* **5**(4): 403-11.
- Matthews, R. C., Rigg, G., Hodgetts, S., Carter, T., Chapman, C., Gregory, C., Illidge, C. and Burnie, J. (2003). "Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(7): 2208-16.
- McManaus, G. N. (1989). Darstellung von paraplasmatischen Substanzen, PAS Reaktion nach McManaus. *Mikroskopische Technik*. B. Romeis. München Wien Baltimore, Urban u. Schwarzenberg: 697 S.
- Morrison, J. R., Fidge, N. H. and Grego, B. (1990). "Studies on the formation, separation, and characterization of cyanogen bromide fragments of human AI apolipoprotein." *Anal Biochem* **186**(1): 145-52.
- Morschhauser, J., Michel, S. and Staib, P. (1999). "Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination." *Mol Microbiol* **32**(3): 547-56.
- Mouassite, M., Camougrand, N., Schwob, E., Demaison, G., Laclau, M. and Guerin, M. (2000). "The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation." *Yeast* **16**(10): 905-19.
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M. and Andes, D. (2007). "Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 510-20.
- Newport, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J. J., Kurtz, M. B., Abruzzo, G. K. and Agabian, N. (2003). "Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **278**(3): 1713-20.
- Nguyen, M. H., Peacock, J. E., Jr., Tanner, D. C., Morris, A. J., Nguyen, M. L., Snyderman, D. R., Wagener, M. M. and Yu, V. L. (1995). "Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study." *Arch Intern Med* **155**(22): 2429-35.
- Nishiyama, Y., Aoki, Y. and Yamaguchi, H. (1995). "Morphological aspects of cell wall formation during protoplast regeneration in *Candida albicans*." *J Electron Microsc (Tokyo)* **44**(2): 72-8.
- Nobile, C. J. and Mitchell, A. P. (2006). "Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation." *Cell Microbiol* **8**(9): 1382-91.
- Nold, M. J., Cerda, B. A. and Wesdemiotis, C. (1999). "Proton affinities of the N- and C-terminal segments arising upon the dissociation of the amide bond in protonated peptides." *J Am Soc Mass Spectrom* **10**(1): 1-8.
- Norice, C. T., Smith, F. J., Jr., Solis, N., Filler, S. G. and Mitchell, A. P. (2007). "Requirement for *Candida albicans* Sun41 in Biofilm Formation and Virulence." *Eukaryot Cell* **6**(11): 2046-55.
- Northrop, J. H. and Kunitz, M. (1931). "Isolation of Protein Crystals Possessing Tryptic Activity." *Science* **73**(1888): 262-263.
- Oda, Y., Nagasu, T. and Chait, B. T. (2001). "Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome." *Nat Biotechnol* **19**(4): 379-82.

- Odds, F. C. (1994). "Pathogenesis of *Candida* infections." *J Am Acad Dermatol* **31**(3 Pt 2): S2-5.
- Osumi, M. (1998). "The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation." *Micron* **29**(2-3): 207-33.
- Papanicolaou, J. F. A. (1989). Färbetechniken der zytodiagnostik, Färbung nach Papanicolaou. *Mikroskopische Technik*. B. Romeis. München Wien Baltimore, Urban u. Schwarzenberg: 697 S.
- Pedreno, Y., Maicas, S., Arguelles, J. C., Sentandreu, R. and Valentin, E. (2004). "The *ATC1* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*." *J Biol Chem* **279**(39): 40852-60.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Rinaldi, M. G., Barnes, R., Hu, B., Veselov, A. V., Tiraboschi, N., Nagy, E. and Gibbs, D. L. (2005). "Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing." *J Clin Microbiol* **43**(12): 5848-59.
- Pierson, C. A., Eckstein, J., Barbuch, R. and Bard, M. (2004). "Ergosterol gene expression in wild-type and ergosterol-deficient mutants of *Candida albicans*." *Med Mycol* **42**(4): 385-9.
- Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C. and Gil, C. (2002). "Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome." *Mol Cell Proteomics* **1**(12): 967-82.
- Reinhard, C., Schweikert, M., Wieland, F. T. and Nickel, W. (2003). "Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8253-7.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R. and Morschhauser, J. (2004). "The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*." *Gene* **341**: 119-27.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R. (2006). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity." *FEMS Yeast Res* **6**(1): 14-29.
- Samaranayake, L. P., Fidel, P. L., Naglik, J. R., Sweet, S. P., Teanpaisan, R., Coogan, M. M., Blignaut, E. and Wanzala, P. (2002). "Fungal infections associated with HIV infection." *Oral Dis* **8 Suppl 2**: 151-60.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanglard, D. (2002). "Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs." *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 379-85.
- Schwenk, J. (2003). "Neue Ansätze zur Identifizierung potentieller Virulenzfaktoren in *Candida albicans*." *Diplomarbeit*.
- Sentandreu, R., Elorza, M. V., Valentin, E. and Ruiz-Herrera, J. (2004). The structure and composition of the fungal cell wall. *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*. G. San-Blas und R. Calderone. Wymondham, UK, Caister Academic Press: 3-39.

- Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Zhang, M., Waring, A. J. and Edwards, J. E., Jr. (2004). "Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **279**(29): 30480-9.
- Silva, M. T. and Macedo, P. M. (1987). "Improved Thiery staining for the ultrastructural detection of polysaccharides." *J Submicrosc Cytol* **19**(4): 677-81.
- Skory, C. D. and Freer, S. N. (1995). "Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*." *Appl Environ Microbiol* **61**(2): 518-25.
- Sohn, K., Schwenk, J., Urban, C., Lechner, J., Schweikert, M. and Rupp, S. (2006). "Getting in touch with *Candida albicans*: the cell wall of a fungal pathogen." *Curr Drug Targets* **7**(4): 505-12.
- Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. and Rupp, S. (2003). "EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays." *Mol Microbiol* **47**(1): 89-102.
- Surarit, R., Gopal, P. K. and Shepherd, M. G. (1988). "Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*." *J Gen Microbiol* **134**(6): 1723-30.
- Toh-e, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. and Matsui, Y. (1993). "Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock." *Yeast* **9**(5): 481-94.
- Tokunaga, M., Niimi, M., Kusamichi, M. and Koike, H. (1990). "Initial attachment of *Candida albicans* cells to buccal epithelial cells. Demonstration of ultrastructure with the rapid-freezing technique." *Mycopathologia* **111**(1): 61-8.
- Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H. and Rupp, S. (2003). "Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell." *FEBS Lett* **544**(1-3): 228-35.
- Velours, G., Boucheron, C., Manon, S. and Camougrand, N. (2002). "Dual cell wall/mitochondria localization of the 'SUN' family proteins." *FEMS Microbiol Lett* **207**(2): 165-72.
- Wenschuh, H., Halada, P., Lamer, S., Jungblut, P. and Krause, E. (1998). "The ease of peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: the effect of secondary structure on signal intensity." *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**(3): 115-9.
- Wessel, D. and Flugge, U. I. (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." *Anal Biochem* **138**(1): 141-3.
- Wilchek, M. and Bayer, E. A. (1990). "Applications of avidin-biotin technology: literature survey." *Methods Enzymol* **184**: 14-45.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. and Hancock, R. (1981). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Anal Biochem* **118**(1): 197-203.

Danksagung

Herzlich danken möchte ich

- **Prof. Dr. Herwig Brunner** für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Fraunhofer IGB
- **Prof. Dr. Peter Scheurich** für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit
- **PD Dr. Steffen Rupp** für die intensive Betreuung und seine ständige Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen
- **Sonja Heine** für ihre engagierte Mitarbeit und ihr Interesse an dieser Arbeit
- **Dr. Xin Xiong** für interessante Diskussionen und Einblicke in die chinesische Mentalität
- **Jürgen Schmucker** und **Gabi Beck-Schwadorf** dafür, dass sie mir die Grundlagen der Massenspektrometrie näher gebracht haben
- allen **Kollegen der Abteilung Molekulare Biotechnologie**, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft bei meiner Arbeit unterstützt haben
- **Johannes Madlung** und **Andreas Jakob** vom Proteom Centrum Tübingen für massenspektrometrische Analysen etlicher meiner Proben
- meinen **Eltern**, die durch ihre Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben
- **Verena** für ihren Beistand, den Rückhalt und einfach alles was das Leben außerhalb der Wissenschaft so lebenswert macht

Lebenslauf

Ekkehard Hiller

geboren am 24. April 1976 in Radolfzell

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Seit 11/2007 Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik (IGVT) der
Universität Stuttgart (Prof. Dr. Thomas Hirth)

Doktorarbeit

11/2003 - 12/2008 Promotion am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik (Prof. Dr. Brunner) zum Thema:
Detektion und Charakterisierung von Zellwandproteinen in
Candida albicans

Wissenschaftliche Hilfskraft

01/2003 - 08/2003 Molekulare Genetik (Lehrstuhl Prof. Dr. Knippers)

Studium

01/2002 - 12/2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl Molekulare Genetik (Prof. Dr.
Knippers) zum Thema: „Untersuchung über Replikations-
Initiations-Proteine“

Abschluss: Diplom

10/1997 - 10/2001 Studium der Biologie an der Universität Konstanz

Fächer der mündlichen Diplomprüfung:

Genetik, Biochemie

Zivildienst

08/1996 - 08/1997 Krankenhaus Radolfzell

Schulbildung

09/1986 - 07/1996 Gymnasium Radolfzell

Abschluss: Abitur

Publikationen

(Aus der Dissertation hervorgegangen)

Nanoparticle-based diagnostic 3D-protein biochip for *Candida albicans*

Borchers K, Weber A, Hiller E, Rupp S, Brunner H, Tovar G.E.M

Polymeric Materials: Science & Engineering 2006, 95, 1016

Candida albicans Sun41p, a Putative Glycosidase, Is Involved in Morphogenesis, Cell Wall Biogenesis, and Biofilm Formation

Hiller E, Heine S, Brunner H, Rupp S

Eukaryotic Cell, November 2007, 2056-2065, Vol. 6, No. 11

Molecular characterization of urea extracted rat tail collagen type I shows unusual assembly- and hydroxyprolin-patterns

Xiong X, Ghosh R, Hiller E, Drepper F, Knapp B, Brunner H, Rupp S

(submitted)

Sample Preparation for the Cell-Wall Proteome Analysis of Yeast and Fungi

Sohn, K, Hiller, E , Rupp, S

Proteomics Sample Preparation. 2008, J. von Hagen, Wiley-Vch. 371-378

Candida-Diagnose-Chip

Tovar G, Weber A, Borchers K, Hiller E, Hauser N, Rupp S

Patentmeldung

Pub. No.: WO/2007/036352; International Application No.: PCT/EP2006/009363

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, Dezember 2008

Ekkehard Hiller