
**Dom34 als regulatorischer Faktor
der *O*-Glykosylierung in
*Candida albicans***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Jessica Saskia Hilbig
aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2010

Aus dem Institut für Mikrobiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. R. Freudl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 <i>Candida albicans</i> als humanpathogener Pilz.....	1
1.2 Mannoproteine und die Zelloberfläche von <i>C. albicans</i>	2
1.3 Glykosylierung- Proteinmodifikation durch Zuckerstrukturen.....	3
1.4 <i>O</i> -Glykosylierung und die Familie der Protein- <i>O</i> -Mannosyltransferasen.....	4
1.5 Phänotypen der <i>pmt</i> -Mutanten in <i>C. albicans</i>	7
1.6 Funktionen von Dom34 in Glykosylierung und Translation.....	7
1.7 Rolle von Dom34 im „no-go decay“.....	9
1.8 Zielsetzung.....	11

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme.....	12
2.2 Stämme und Medien.....	12
2.2.1 <i>E. coli</i> -Stämme.....	12
2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	13
2.2.3 <i>C. albicans</i> -Stämme.....	13
2.2.4 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	14
2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen.....	14
2.2.6 Hypheninduktion von <i>C. albicans</i> auf festem Medium.....	15
2.2.7 Medien mit verschiedenen Substanzen.....	15
2.3 Primer und Plasmide	15
2.3.1 Plasmide.....	15
2.3.2 Primer.....	16
2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren.....	17
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	17
2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen.....	18
2.4.3 Restriktionsverdau.....	18
2.4.4 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden.....	18
2.4.5 Dephosphorylierung von DNA.....	18
2.4.6 Ligation.....	19
2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	19
2.4.8 DNA-Größenstandard.....	19

2.4.9	Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren.....	19
2.4.10	Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse.....	19
2.4.10.1	Sondenmarkierung.....	19
2.4.10.2	Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot.....	20
2.4.10.3	Hybridisierung und Detektion.....	20
2.4.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.4.11.1	Amplifikation von DNA für präparative Zwecke.....	21
2.4.11.2	Kolonie-PCR.....	21
2.4.11.3	Mutagenese-„PCR“.....	21
2.4.11.4	Quantitative RT-PCR/ Real Time-PCR.....	21
2.5	Transformation.....	25
2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.5.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	25
2.5.3	Transformation von <i>C. albicans</i>	25
2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.6.1	Antikörper.....	25
2.6.2	Präparation von Hefe-Rohextrakten.....	26
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	26
2.6.4	Bestimmung der Luziferase-Aktivität.....	26
2.6.5	Koimmunopräzipitation.....	27
2.6.6	PNGase F-Behandlung.....	27
2.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.6.8	Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse.....	28
2.6.9	Differentielle Zentrifugation.....	28
2.6.10	Bestimmung der Protein-Mannosyl-Transferase-Aktivität.....	28
2.6.10.1	Präparation der mikrosomalen Membranfraktion.....	29
2.6.10.2	Synthese des Substrats Dolicholphosphat-[¹⁴ C]Mannose.....	29
2.6.10.3	Bestimmung der Mannosylierungsaktivität.....	31
2.6.11	Aufreinigung von <i>CaDom34</i> aus <i>E. coli</i>	32
2.7	Zellbiologische Methoden.....	32
2.7.1	Immunfluoreszenz.....	32
2.7.1.1	Fixieren von Zellen.....	32
2.7.1.2	Herstellen der Präparate.....	33

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung der <i>dom34</i> - und <i>pmt1 dom34</i> -Mutanten.....	34
3.1.1 Konstruktion der <i>dom34</i> - und <i>dom34 pmt1</i> -Mutanten.....	34
3.1.2 Sensitivitäten der Mutanten.....	35
3.1.2.1 Sensitivität gegen Hygromycin B.....	35
3.1.2.2 Temperatursensitivität und Sensitivität gegen SDS.....	36
3.2 Überexpression von <i>DOM34</i> in der <i>pmt1</i> -Mutante.....	37
3.2.1 Sensitivitäten der Mutanten.....	37
3.2.1.1 Sensitivität gegen Hygromycin B.....	37
3.2.1.2 Temperatursensitivität.....	37
3.2.1.3 Sensitivität gegen SDS.....	38
3.2.2 Hyphenbildung.....	39
3.2.3 <i>O</i> -Glykosylierung von Pmt1-Substraten.....	39
3.2.3.1 Als1.....	40
3.2.3.2 Pir1.....	40
3.2.3.3 Kre9.....	41
3.3 Phänotypisierung einer <i>pmt5 dom34</i> -Doppelmutante.....	43
3.3.1 Konstruktion der <i>pmt5 dom34</i> Doppelmutante.....	43
3.3.2 Sensitivitäten der Mutanten.....	44
3.4 Einfluss anderer Pmt-Isoformen.....	45
3.4.1 Konstruktion einer <i>URA3</i> -auxotrophen <i>pmt1 pmt5</i> -Doppelmutante.....	45
3.4.2 Sensitivitäten der Mutanten.....	46
3.5 Einfluss von <i>DOM34</i> auf die Expression der <i>PMT</i> -Gene.....	47
3.6 Expression des <i>DOM34</i> -Gens in den <i>pmt</i> -Mutanten.....	50
3.7 Einfluss von <i>DOM34</i> auf die enzymatische Pmt-Aktivität.....	51
3.8 Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion von Dom34 und Pmt-Proteinen.....	53
3.9 Einfluss von Dom34 auf die Protein-Translation.....	55
3.9.1 Quantifizierung des Pmt1-Proteins.....	55
3.9.2 Rolle regulatorischer Elemente im <i>PMT1</i> -Transkript.....	56
3.10 Funktionsanalyse eines mutierten Dom34 _{Glu21-Ala}	59
3.11 Aufreinigung von <i>CaDom34</i> aus <i>E. coli</i>	60
3.12 RNase-Aktivität von Dom34.....	62
3.13 Lokalisation von Dom34.....	62
3.13.1 Markierung von Dom34 mit dem HA-Epitop.....	63

3.13.2	Fraktionierte Zentrifugation.....	64
3.13.3	Immunofluoreszenz von Dom34 ^{HA} (<i>C. albicans</i>).....	65
3.14	Immunofluoreszenz von Dom34 ^{HA} (<i>S. cerevisiae</i>).....	66
4.	Diskussion	
4.1	<i>DOM34</i> und <i>PMT1</i> zeigen genetische Interaktion in <i>C. albicans</i>	68
4.2	Dom34 beeinflusst die <i>O</i> -Glykosylierung von Kre9 unter Beteiligung von <i>PMT5</i> und <i>PMT6</i>	69
4.3	Die Expression der <i>PMT</i> -Gene wird nicht durch Dom34 beeinflusst.....	70
4.4	Dom34 stimuliert die Translation des Pmt1-Proteins.....	71
4.5	Das regulatorische Motiv der Sequenz CAACCA des <i>PMT1</i> -Transkripts ist auch im <i>PMT5</i> -Transkript vorhanden.....	72
4.6	Das Dom34-Protein zeigt eine Verteilung im Cytosol und kann in der ER-Fraktion nachgewiesen werden.....	74
4.7	Glu ₂₁ ist essentiell für die Suppression des <i>pmt1</i> -Phänotyps durch Dom34 in <i>C. albicans</i>	75
4.8	Dom34 könnte als spezifischer Faktor die Translation der Pmt-Isoformen unter speziellen Stressbedingungen regulieren.....	76
5.	Zusammenfassung	80
6.	Summary	81
7.	Literaturverzeichnis	82
8.	Abkürzungsverzeichnis	90

1. Einleitung

1.1 *Candida albicans* als humanpathogener Pilz

C. albicans gilt als bedeutenster Erreger humaner Mykosen. Bei dem Organismus handelt es sich um einen opportunistisch pathogenen Pilz, der als Kommensale häufig den gesunden Menschen besiedelt. So kann bei 75 % der Menschen *Candida* auf den Schleimhäuten von Darm, Mund und Nase sowie des Genitalbereichs nachgewiesen werden (Ghannoum *et al.*, 2010). Neben meist harmlosen oberflächlichen Mykosen kann *C. albicans* insbesondere bei immunsupprimierten Personen auch eine lebensgefährliche systemische Infektion hervorrufen. In diesem Fall kommt zu einer Besiedelung der inneren Organe wie Leber oder Nieren, die in 40 % der Fälle tödlich verläuft (Pfaller, 1996). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Fähigkeit von *C. albicans* Biofilme zu bilden, in denen die Pilzzellen eingebettet in einer Matrix die Oberfläche von invasiven medizinischen Hilfsmitteln wie Venen- oder Herzkathetern besiedeln können (Crump und Collignon, 2000). Die Besiedelung von Venenkathetern durch Biofilme ist nach Schätzungen des European Centre for Disease Prevention and Control für zwei Drittel der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Eine Candidämie zählt dabei zu den am häufigsten auftretenden systemischen Infektionen und endet durch eine Sepsis bei bis zu 65 % der Patienten tödlich (Annual European Communicable Disease Epidemiological Report 2005).

Eine zentrale Rolle bei der Infektion durch *C. albicans* spielt der Dimorphismus des Pilzes, die Fähigkeit als Hefeform oder echte Hyphe zu wachsen, als wichtigster Virulenzfaktor (Odds, 1998). So sind Mutanten für essentielle Transkriptionsfaktoren der Morphogenese wie *Efg1* und *Cph1*, die keine Hyphen mehr bilden können, im Mausinfektionsmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Hyphen zeigen eine stärkere Adhäsion an Wirtsepithelien als Hefezellen, was auf die abweichende Zellwandzusammensetzung der filamentösen Form mit einem höheren Anteil an hydrophoben Bestandteilen zurückzuführen ist (Odds, 1994; Cutler, 1991). Darüber hinaus ist die filamentöse Wachstumsform die invasive Form, die für die Penetration der Epithelzellen bei der Gewebeinvasion benötigt wird (Hostetter, 1994), und dem Pilz sogar ermöglicht, nach der Phagozytose durch Makrophagen aus diesen herauszuwachsen (Vasques-Torres und Balish, 1997). Die Hefeform ermöglicht dagegen über ihre schnelle Vermehrung durch Knospung eine Verteilung im Wirt mit Hilfe des Blutstroms (Odds, 1988; Cutler, 1991).

Die Adhäsion an Wirtsepithelien in der ersten Phase der Infektion wird durch verschiedene Strukturen der *Candida*-Zelloberfläche ermöglicht. Zum einen tritt eine unspezifische Adhäsion durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Wirtsoberfläche auf (Glee *et al.*, 1995). Die hohe Hydrophobizität der Oberfläche von *Candida* wird dabei durch den hohen Anteil von Mannoproteinen der Zellwand vermittelt (Masuoka und Hazen, 1999; Hazen *et al.*, 2001). Weiterhin kommen verschiedene Adhäsine vor, die bei der spezifischen Adhäsion eine Wechselwirkung mit Säugerproteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und Fibrinogen eingehen (Calderone und Braun, 1991; Negre *et al.*, 1994; Lopez-Ribot *et al.*, 1996). Zu den Adhäsinen in *Candida* gehören zum Beispiel die Proteine Als1, Als3 und Als5, sowie das Mannoprotein Hwp1. Gemeinsam ist allen Formen der Adhäsion die Beteiligung von *Candida* Glykoproteinen an der Bindung von Wirtsstrukturen. Verdeutlicht wird diese Bedeutung Protein-gebundener Glykostrukturen auch durch die reduzierte Adhäsion und den Verlust der Virulenz von *Candida* Glykosylierungsmutanten wie *pmt1*- oder *mnt1*-Deletionsmutanten.

1.2 Mannoproteine und die Zelloberfläche von *C. albicans*

Die Rolle von oberflächengebundenen Glykoproteinen für die Virulenz von *Candida* ist nur ein Aspekt der großen Bedeutung der Zelloberfläche für die Pilzzelle. Als äußere Hülle umgibt die Hefezelle eine Zellwand, die der Zelle strukturelle Integrität verleiht und sie vor Umwelteinflüssen schützt (Shepherd 1987; Chaffin *et al.*, 1998). Die Zellwand von Hefen wie *C. albicans*, aber auch *S. cerevisiae*, ist aus Glukanen, Chitin und Mannoproteinen aufgebaut.

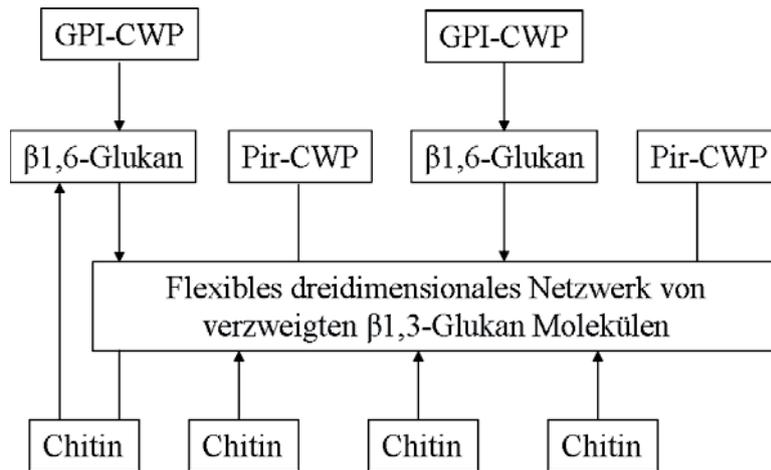


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Zellwand von *S. cerevisiae* und *C. albicans*. An das Grundgerüst aus β 1,3-Glukan sind als weitere Strukturkomponente β 1,6-Glukan und Chitin als quervernetzende Komponente der Glukane gebunden. Während Pir-Zellwandproteine (Pir-CWP) an β 1,3-Glukan gebunden sind, sind GPI-Zellwandproteine (GPI-CWP) an β 1,6-Glukan verankert. Die Abbildung ist Richard *et al.* (2002) entnommen worden und wurde von Prill (2004) modifiziert.

Hauptbestandteil der Zellwand mit etwa 40 % des Trockengewichts ist β 1,3-Glukan, ein lineares Polymer aus etwa 1500 Glucoseeinheiten, das als flexibles, dreidimensionales Netzwerk die Grundstruktur der Zellwand bildet (Klis *et al.*, 2001). Zu einem kleineren Anteil von bis zu 20 % kommt außerdem β 1,6 -Glukan vor, das mit dem β 1,3-Glukan verbunden ist und als Verankerungsstruktur für Zellwandproteine fungiert (Kapteyn *et al.*, 1996). β 1,6-Glukan ist stark verzweigt und besteht aus nur etwa 140 Glucosemonomeren. Chitin als weiterer Bestandteil ist ein unverzweigtes, β 1,4-verknüpftes *N*-Acetylglukosamin-Polymer. Chitin hat mengenmäßig mit 1-3 % nur einen sehr kleinen Anteil an der Zellwand, dient aber durch seine gleichzeitige Bindung an β 1,3-Glukan und β 1,6-Glukan der Quervernetzung dieser Makromoleküle und somit Stabilität der Zellwand (Lipke und Ovalle, 1998).

Die Mannoproteine bilden mit bis zu 40 % einen großen Anteil und wichtigen strukturellen Bestandteil der Zellwand, und vermitteln unter anderem auch eine Schutzfunktion der Zellwand gegen äußere Faktoren wie degradierende Enzyme (Klis *et al.*, 2002). Bei den kovalent gebundenen Zellwand-Proteinen unterscheidet man zwischen GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol)- Zellwandproteinen und Pir (proteins with internal repeats)-Zellwandproteinen (Klis *et al.*, 2001 und 2002). GPI-Zellwandproteine sind über den Rest eines GPI-Ankers, auf den sie im endoplasmatischen Retikulum vor ihrer Sekretion übertragen werden, an β 1,6 -Glukan gebunden (Orlean, 1997; Richard *et al.*, 2002). Zu den GPI-Zellwandproteinen gehören beispielsweise viele Adhäsine (vgl. Abschnitt 1.1) wie Hwp1 und die verschiedenen Als-Proteine, die eine aktuell 12 identifizierte Proteine umfassende Proteinfamilie bilden (Fu *et al.*, 1998; *Candida* Genome Database <http://www.candidagenome.org>). Pir-Proteine werden dagegen durch eine Transglutaminase-Reaktion an das β 1,3-Glukan gebunden (Ecker *et al.*, 2004a). Neben diesen kovalent gebundenen Zellwandproteinen gibt es außerdem auch noch weitere, nicht-kovalent mit der Zellwand assoziierte Mannoproteine, die SCWP (soluble cell wall proteins) (Cappellaro *et al.*,

1998). Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die Chitinsynthasen (Munro und Gow, 2001). Die Mannoproteine der Zellwand und andere mannosylierte Zelloberflächenproteine erfüllen zum Teil wichtige spezifische Aufgaben bei der Wechselwirkung von *Candida* mit der Umwelt. Dies verdeutlicht zum Beispiel die defekte Hyphenbildung der *pmt6*-Glykosylierungsmutante, für die vermutlich die fehlende Mannosylierung eines Sensors verantwortlich ist, der normalerweise als Reaktion auf äußere Stimuli einen Signalweg der Hyphenbildung aktiviert (Timpel *et al.*, 2000; Ernst, 2000). Neben diesen spezifischen Funktionen sind Mannoproteine bei Pilzen jedoch auch als struktureller Bestandteil der Zellwand elementar wichtig für die Integrität der Zelle.

1.3 Glykosylierung- Proteinmodifikation durch Zuckerstrukturen

Wie sich anhand der großen Bedeutung der Vielzahl verschiedener Glykoproteine ermaßen lässt, stellt der Prozess der Glykosylierung eine äußerst wichtige Form der Proteinmodifikation dar. Vermutlich wird mehr als die Hälfte aller Proteine durch eine Glykosylierung modifiziert (Apweiler *et al.*, 1999). Da die einzelnen Schritte der Glykosylierung während der Passage entlang des Sekretionswegs im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat erfolgen, sind glykosylierte Proteine typischerweise extrazelluläre Proteine, die in der Plasmamembran oder bei Hefen auch der Zellwand lokalisiert sind, oder sezerniert werden. Dort erfüllen die proteingebundenen Glykostrukturen bei Eukaryoten verschiedenste Funktionen, die so unterschiedliche Bereiche wie die Immunantwort und die Determination der Blutgruppen-Antigene oder die Zell-Zell-Interaktion umfassen, beispielsweise auch die Wirtszell-Pathogen-Erkennung. Alle diese Prozesse beruhen dabei auf einer spezifischen Erkennung anderer (Glyko-)Proteine. Eine ausgeprägte Glykosylierung kann auch eine Schutzfunktion erfüllen, indem durch Wassereinlagerungen Schleime als Schutzbarrieren gebildet werden, wie im Fall des von menschlichen Schleimhäuten sekretierten Proteins Mucin (Lagow *et al.*, 1999). Neben diesen Funktionen der Glykosylketten extrazellulärer Proteine erfüllt auch die Glykosylierung intrazellulärer Proteine der verschiedenen Zellkompartimente, die ebenfalls entlang der Sekretionswege transportiert werden, eine wichtige Funktion. Bei diesen Proteinen dient die Glykosylierung unter anderem der Kontrolle der Faltung durch Calnexin und dem ER-assoziierten Abbau von Proteinen (ERAD) (Helenius und Aebi, 2001). Glykosylierung ist ein essentieller zellulärer Prozess, und erbliche Mutationen in Glykosylierungsgenen verursachen verschiedene schwerwiegende Erkrankungen des Menschen, die als CDG (Congenital Disorders of Glykosylation)-Syndrome bekannt sind.

Die häufigsten Modifikationen von Proteinen mit Glykanen sind die *N*- und *O*-Glykosylierung. Ein seltener Glykosylierungstyp ist dagegen beispielsweise die *C*-Glykosylierung, und auch die Modifikation von Proteinen mit einem GPI-Anker als Verknüpfungsstruktur mit der Cytoplasma-Membran zählt zu den Glykosylierungen (Spiro, 2002; Kinoshita *et al.*, 1997). Die verschiedenen Glykosylierungstypen werden bezüglich der Natur der Bindung zwischen Protein und der angehängten Saccharidkette eingeteilt.

Bei der *N*-Glykosylierung wird die Saccharidstruktur über eine *N*-glykosidische Bindung mit der Amidgruppe eines Asparaginrests des Proteins verknüpft. Zunächst wird cotranslational im ER ein lineares Oligosaccharid der Sequenz $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ als Grundstruktur durch den Enzymkomplex Oligosaccharyltransferase von Dolicholphosphat als Donor auf das Protein übertragen (Tanner und Lehle, 1987). Dabei werden nur Asparaginreste der Konsensussequenz *Asn-X-Ser/Thr* erkannt und schätzungsweise 65 % der im Protein vorkommenden *N*-Glykosylierungsstellen glykosyliert (Petrescu *et al.*, 1990). Eine weitere Modifikation der *N*-Glykosylkette erfolgt im Golgi. Während der Prozess der *N*-

Glykosylierung im ER sowie die Struktur des Kern-Oligosaccharids in Hefen und Säugern prinzipiell gleich sind, verläuft die weitere Prozessierung unterschiedlich (Weerapana und Imperiali, 2006). Während in Säugern komplexe *N*-Glykane vorkommen, kommen in Hefen ausschließlich Mannosen für den weiteren Aufbau zum Einsatz. Die gebildeten Zuckerstrukturen können dabei bis zu 200 Mannosereste umfassen (Herscovics und Orlean, 1993).

O-Glykosylierung bezeichnet die Modifikation von meist Serin- oder Threoninresten durch eine *O*-glykosidische Bindung von Oligosacchariden. Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung verläuft die *O*-Glykosylierung bei Hefen und Säugern prinzipiell unterschiedlich. Bei höheren Eukaryoten erfolgt die Modifikation von Proteinen durch *O*-Glykosylketten nicht cotranslational, sondern posttranslational nach dem Weitertransport im Golgi. Im Gegensatz zu Hefen sind die in Säugern synthetisierten *O*-Glykane häufig sehr komplex in ihrem Aufbau. Neben dem als ersten angehängten *N*-Acetylglucosamin kommen eine Vielzahl verschiedener Monomere wie Galaktose und Sialinsäure, aber auch ungewöhnliche Saccharide wie Fucose oder Xylose vor. Bei Hefen erfolgt die erste Reaktion der *O*-Glykosylierung dagegen wie die *N*-Glykosylierung cotranslational im ER, weshalb die beiden Modifikation, wie für das Pir-Protein Ccw5 gezeigt werden konnte, in direkter Konkurrenz um die gleichen Glykosylierungsstellen stehen können (Ecker *et al.*, 2003b).

1.4 *O*-Glykosylierung und die Familie der Protein-*O*-Mannosyltransferasen

In Pilzen bestehen die *O*-Glykosylketten im Gegensatz zu höheren Eukaryoten mit wenigen Ausnahmen ausschließlich aus Mannoseresten. Bei *C. albicans* kommen hauptsächlich lineare, α 1,2-verknüpfte, bei *S. cerevisiae* α 1,2- und α 1,3-verknüpfte Mannoseketten vor (Herscovics und Orlean, 1993). Bei der initialen Reaktion der *O*-Glykosylierung im ER katalysieren Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) die Übertragung des ersten Mannoserests auf Serin oder Threonin des Zielproteins. Zunächst katalysiert auf cytosolischer Seite des ER die Dolicholphosphat-Mannose-Synthase Dpml die Synthese des Mannose-Donors Dolicholphosphat-Mannose aus GDP-Mannose und dem isoprenoiden Anker-molekül Dolicholphosphat (Orlean, 1990). Mit Hilfe einer Flippase erfolgt die anschließende Translokation von Dolicholphosphat-Mannose durch die ER-Membran zum ER-Lumen. Vom Donor Dolicholphosphat-Mannose wird die Mannose dann unter Inversion der Konfiguration durch die Protein-*O*-Mannosyl-Transferase, die präzise als Dol-P- β -D-Man:Protein-*O*- α -D-Mannosyltransferase bezeichnet wird, auf die Hydroxylgruppe eines Serin oder Threoninrestes des Proteins unter Bildung einer *O*- α -D-glykosidischen Bindung transferiert (Bause und Lehle, 1979; vgl. Abb. 3.14). Dieser erste Schritt der *O*-Glykosylierung eines sekretierten Proteins findet noch während dessen Translokation durch die Sekretionspore des ER (Sec61) statt (Tanner und Lehle, 1987). Da diese Translokation in der Regel cotranslational erfolgt, stellen Translation und Glykosylierung eines Proteins zwei eng miteinander verbundene Prozesse dar.

Die Kettenverlängerung durch weitere Mannosen erfolgt nach dem Transport des Proteins entlang des Sekretionswegs im Golgi. Diese Kettenelongation wird von diversen anderen Mannosyltransferasen unter Verwendung des aktivierten Zuckers GDP-Mannose katalysiert (Lussier *et al.*, 1999, Abeijon *et al.*, 1993). Die resultierenden Ketten können dabei in *S. cerevisiae* bis zu fünf Mannosereste und in *C. albicans* bis zu sieben Mannosen enthalten, sind aber in beiden Organismen am häufigsten Di-Mannosyl-Ketten (Buurman *et al.*, 1998; Goins und Cuttler, 2000).

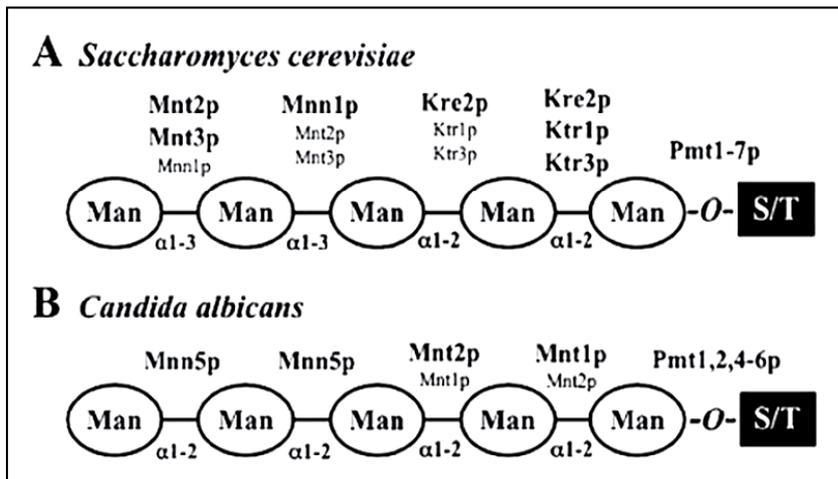


Abb. 1.2: Kettenverlängerung der O-Mannosylketten. Nach der initialen, Pmt-katalysierten Mannosylierung erfolgt eine weitere Addition von Mannoseresten durch verschiedene Mannosyltransferasen im Golgi, wodurch in *S. cerevisiae* Kettenlängen von bis zu fünf Mannosen und in *C. albicans* bis zu sieben Mannosen erreicht werden. Die meisten O-Glykosylketten bestehen jedoch in beiden Organismen aus nur zwei Mannoseresten. Die Abbildung wurde Goto *et al.* (2007) entnommen.

Im Gegensatz zu diesen linearen Mannoseketten in *C. albicans* und *S. cerevisiae* können in anderen Pilzen jedoch auch weitere Zucker wie Glukose und Galaktose, sowie Verzweigungen durch α 1,6- und β 1,2-glykosidische Bindungen vorkommen, wie es für *Schizosaccharomyces pombe* und *Aspergillus nidulans* beschrieben wurde (Goto, 2007).

Die für die O-Glykosylierung in Pilzen essentiellen Protein-O-Mannosyltransferasen bilden eine konservierte Proteinfamilie. Alle bisher untersuchten Pilze haben nicht nur eine einzige Protein-O-mannosyltransferase, sondern exprimieren mehrere Pmt-Isoformen. In den meisten Pilzen konnten bisher mindestens drei Isoformen der Pmt nachgewiesen werden, so zum Beispiel bei *S. pombe*, *Cryptococcus neoformans* oder *A. nidulans* (Willer *et al.*, 2005; Willger 2007; Oka *et al.*, 2004). *S. cerevisiae* verfügt sogar über sieben verschiedene Pmt-Isoformen, Pmt1-7, und in *C. albicans* existieren die fünf Pmt-Isoformen Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 und Pmt6 (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993 und 1999; Prill *et al.*, 2005). Die Pmt-Proteinfamilie kann aufgrund der Sequenzhomologie der einzelnen Isoformen in die drei Subfamilien vom Pmt1-, Pmt2- oder Pmt4-Typ eingeteilt werden (vgl. Abb. 1.3). In *C. albicans* gehören Pmt1 und Pmt5 der Pmt1-Subfamilie an, Pmt2 und Pmt6 werden der Pmt2-Familie zugeordnet und Pmt4 repräsentiert das einzige Mitglied der Pmt4-Subfamilie (Ernst und Prill, 2001). Im Gegensatz zu früheren Vermutungen kommen Protein-O-Mannosyltransferasen jedoch nicht nur bei Pilzen vor, in denen sie in Zusammenhang mit der pilztypischen, ausgeprägten O-Mannosylierung insbesondere von Zellwandproteinen stehen. Auch in höheren Organismen wie *Drosophila melanogaster* (Martin-Blanco *et al.*, 1996; Lyalin *et al.*, 2006), der Maus *Mus musculus* (Willer *et al.*, 2002) und sogar dem Menschen konnten Pmt-homologe Mannosyltransferasen identifiziert werden. Im Menschen konnten die beiden Proteine Pomt1 und Pomt2 als funktionelle Protein-O-Mannosyltransferasen nachgewiesen werden (Jurado *et al.*, 1999; Many *et al.*, 2004). In Säugern gibt es nur sehr wenige O-mannosylierte Proteine. Ein überaus wichtiges, stark O-mannosyliertes Substrat der Mannosyltransferasen Pomt1 und Pomt2 des Menschen ist das α -Dystroglykan, das durch ein O-Glykan der Sequenz Ser/Thr- α 1Man- β 1,2GlcNac- β 1,4Gal- α 1,2Sia modifiziert wird (Endo, 1999; Akasaka-Many *et al.*, 2006). Unterglykosylierung des α -Dystroglykans durch Mutationen im *POMT1*- oder *POMT2*-Gen sind Ursache des Walker-Warburg-Syndroms, das mit Muskeldystrophien und Defekten in der Hirnentwicklung einhergeht (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002; Van Reeuwijk *et al.*, 2005). Erst kürzlich konnten Pmt-homologe Proteine mit den Actinobakterien *Corynebacterium sepedonicum* und *Mycobacterium tuberculosis* sogar erstmals in Bakterien nachgewiesen werden (Mahne *et al.*, 2006; Van der Ven *et al.*, 2005). Die von *M. tuberculosis* O-glykosidisch an Threonin gebundenen, linearen

Mannoseketten gleichen stark der *O*-Glykosylierung in Hefen. Interessanterweise konnten dagegen in *Caenorhabditis elegans* sowie den untersuchten Protozoen, Algen und Pflanzen keine Pmt-Homologe identifiziert werden (Willer *et al.*, 2003).

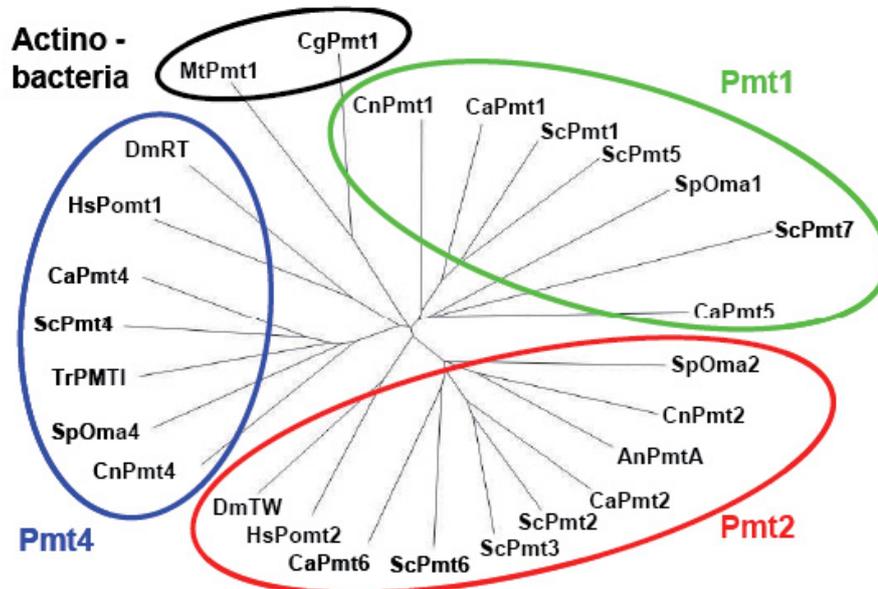


Abb. 1.3: Phylogenetische Darstellung der Pmt-Proteinfamilie. Die Verwandtschaftsverhältnisse der Pmt-homologen Proteine verschiedener Organismen wurden anhand ihrer Aminosäuresequenzen ermittelt, die eine Zuordnung zu den drei verschiedenen Pmt-Subfamilien ermöglicht. An, *Aspergillus nidulans*; Ca, *Candida albicans*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Cn, *Cryptococcus neoformans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Tr, *Trichoderma reesei*. Die Graphik wurde Lengeler *et al.* (2007) entnommen und modifiziert.

Protein-*O*-Mannosyltransferasen sind ER-lokalisierte Membranproteine. Anhand von Pmt1 aus *S. cerevisiae* konnte die aufgrund der evolutionär konservierten Sequenz vermutlich allgemeingültige Struktur der eukaryotischen Pmt-Proteine bestimmt werden (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Pmt1 weist sieben Transmembrandomänen auf, wobei der Amino-Terminus ins Cytoplasma und der Carboxy-Terminus ins ER-Lumen ragt. Ebenfalls dem ER-Lumen zugewandt sind zwei hydrophile Schleifen, loop 1 und loop 5 zwischen den Transmembrandomänen, die essentiell für die enzymatische Pmt-Aktivität von ScPmt1 sind, wie auch einige konservierte Aminosäuren (Girrbach *et al.*, 2000). Obwohl diverse *O*-glykosylierte Substratproteine bekannt sind, konnte keine Konsensussequenz der *O*-Glykosylierung gefunden werden. Gemeinsam ist jedoch vielen Glykosylierungsstellen ein Prolin in Position -1 oder +3 des Serin / Threonin, das die Glykosylierung zu begünstigen scheint, und die Lage in Serin/ Threonin-reichen Clustern (Wilson *et al.*, 1991). In *C. albicans* konnte zudem gezeigt werden, dass Threonin gegenüber Serin bevorzugt wird (Westen *et al.*, 1993). Da die einzelnen Pmt-Isoformen substratspezifisch sind und unterschiedliche Zielproteine glykosylieren, gibt es vermutlich verschiedene Pmt-spezifische Erkennungsmotive für die *O*-Glykosylierung. So konnte durch Analysen von *S. cerevisiae* *pmt1*-, *pmt2*- und *pmt4*-Mutanten gezeigt werden, dass die Proteine Pir2, Cts1, Kre1 und Kre9 durch Pmt1 und Pmt2 glykosyliert werden, wohingegen Kex2, Gas1 und Fus1 Substrate von Pmt4 sind (Gentzsch und Tanner, 1997).

1.5 Phänotypen der *pmt*-Mutanten in *C. albicans*

Die Deletion der verschiedenen Pmt-Isoformen in *C. albicans* hat pleiotrope Phänotypen zur Folge, die bei den einzelnen *pmt*-Mutanten unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die homozygoten Mutanten *pmt1*, *pmt4*, *pmt5* und *pmt6* sind lebensfähig, wogegen *PMT2* in *C. albicans* offensichtlich essentiell ist und bereits eine heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutante starke phänotypische Defekte aufweist (Prill *et al.*, 2005). Ebenso ist eine homozygote *pmt1 pmt4* Doppelmutante letal. Die *pmt1*-Mutante, die heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutante sowie die *pmt4*-Mutante zeigen erhöhte Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Substanzen, wie Hygromycin B, G418 und Azolen. *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten sind zudem hypersensitiv gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien. Alle *pmt*-Mutanten außer der *pmt5*-Mutante zeigen eine defekte Hyphenbildung (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2000; Klinkert, 2002; Timpel *et al.*, 2000). Die *pmt1*-Mutante sowie die *pmt2/PMT2*-Mutante zeigen zudem einen Wachstumsdefekt, der bei 42 °C noch verstärkt wird, und wie auch die *pmt4*-Mutante eine veränderte Zellwandzusammensetzung (Prill *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist die *pmt1*-Mutante im Mausmodell völlig avirulent, während die anderen *pmt*-Mutanten nur eine reduzierte Virulenz zeigen (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2005). Auch ist die Fähigkeit zur Adhäsion an Wirtsepithelzellen in der *pmt1*-Mutante, aber auch der *pmt6*-Mutante, deutlich reduziert. Für die *pmt5*-Mutante konnte *in vitro* zunächst kein Phänotyp nachgewiesen werden, später konnte jedoch eine reduzierte Virulenz der *pmt5*-Mutante im Mausmodell sowie einem künstlichen Haut-Penetrationsmodell gezeigt werden (Prill *et al.*, 2005). Die verschiedenen Defekte der *pmt*-Phänotypen sind sowohl auf die reduzierte Mannosylierung von Strukturproteinen der Zellwand als auch den Funktionsverlust von *O*-glykosylierten Proteinen mit spezifischen Funktionen zurückzuführen. Einige spezifische Zielproteine der einzelnen Pmt-Isoformen konnten bereits auch in *C. albicans* beschrieben werden. Für die Zellwandproteine Kre9, Pir1 und Als1 konnte eine *O*-Glykosylierung durch Pmt1 nachgewiesen werden, während die Knospungsdeterminante Axl2 ein Zielprotein von Pmt4 ist (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Sec20, ein Faktor des retrograden Vesikeltransports im ER, wird dagegen von Pmt1 und Pmt4 glykosyliert (Weber *et al.*, 2004). Zudem vermutet man die Glykosylierung eines unbekanntes Sensorproteins der Hypheninduktion durch Pmt6, die essentiell für die Funktionalität des betroffenen Proteins zu sein scheint (vgl. auch Abschnitt 1.2).

Prinzipiell können für die *pmt1*, *pmt2/PMT2* und *pmt4*-Mutante deutlich ausgeprägtere Phänotypen beobachtet werden als für die *pmt5*-Mutante und die *pmt6*-Mutante, die geringere Defekte aufweisen. Aufgrund dieser unterschiedlich starken Ausprägung der einzelnen *pmt*-Phänotypen geht man davon aus, dass der Großteil der *O*-Glykosylierung in *C. albicans* auf Pmt1, Pmt2 und Pmt4 zurückzuführen ist, während Pmt5 und Pmt6 nur eine kleinere Bandbreite von Zielproteinen glykosylieren. Zudem repräsentieren Pmt5 und Pmt6 in *C. albicans* jeweils ein zweites Mitglied der Pmt1-Subfamilie und der Pmt2-Subfamilie, das in vielen anderen Pilzen nicht vorhanden ist. In der Mehrzahl der untersuchten Pilze konnte nur jeweils ein Mitglied aus jeder Pmt-Subfamilie nachgewiesen werden (Willer *et al.*, 2005).

1.6 Funktionen von Dom34 in Glykosylierung und Translation

Ein Faktor, der in *S. cerevisiae* ebenfalls eine Rolle bei der *O*-Glykosylierung spielt, jedoch keine Protein-*O*-Mannosyltransferase darstellt, ist das Dom34-Protein. Durch eine ungerichtete Mutagenese eines *S. cerevisiae*-Stamms, der hIGF-1 (human Insulin like Growth Factor-1) heterolog sekretierte, konnten zwei Mutanten mit einer reduzierten *O*-Glykosylierung des Modellproteins identifiziert werden (Finck *et al.*, 1996). Neben einem *O*-Glykosylierungsdefekt des heterologen hIGF-1 konnte in diesen Mutanten auch eine

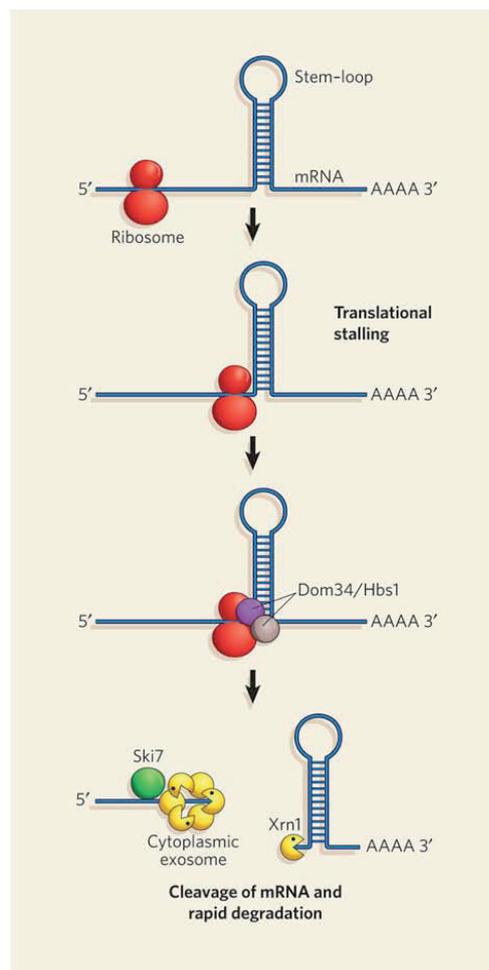
Hypoglykosylierung anderer sekretierter Proteine, wie α -Agglutinin und des *S. cerevisiae*-Proteins Chitinase beobachtet werden. Durch zusätzliche Deletion von *PMT1* als weiterer Mutation eines Glykosylierungsgens in diesen Stämmen konnte ein synthetischer Phänotyp erzeugt werden, der die Identifizierung der durch die Mutagenese betroffenen Gene ermöglichte. Der synthetische Phänotyp einer Killer-Toxin-Resistenz dieser Stämme konnte für die Komplementation durch eine Genombank genutzt werden, da die bei einer Komplementation des unbekanntes Gens resultierende *pmt1*-Einzelmutante wieder Killersensitiv war (Wickert, 1998). Als die in den unbekanntes *O*-Glykosylierungsmutanten betroffenen Gene konnten *DOM34* und *YL001* identifiziert werden. Bei der weiteren Untersuchung des *DOM34*-Gens konnten durch eine anschließende gezielte Konstruktion der *dom34*-Mutante und der *dom34 pmt1*-Doppelmutante die Phänotypen der ursprünglichen unbekanntes Mutante reproduziert werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass eine *dom34 pmt1*-Doppelmutante weitere synthetische Phänotypen, wie eine Hypersensitivität gegen Hygromycin B sowie einer Vergrößerung der Zellen zeigte (Wickert, 1998). In *C. albicans* konnte in ersten Untersuchungen einer *dom34*-Mutante jedoch bislang kein Phänotyp mit typischen Merkmalen einer *O*-Glykosylierungsmutante nachgewiesen werden, wie sie für *pmt*-Mutanten beobachtet werden können, darunter Sensitivitäten gegen verschiedene Substanzen wie Hygromycin B, G418, Azole oder Zellwand-destabilisierende Agenzien, Wachstumsdefekte, Filamentierungsdefekte oder Veränderungen der Zellwandzusammensetzung. Auch konnte bislang kein Glykosylierungsdefekt eines *O*-glykosylierten Proteins wie Als1 oder Pir1 in der *dom34*-Mutante, als Nachweis einer direkten Beteiligung von Dom34 an der *O*-Glykosylierung wie in *S. cerevisiae*, festgestellt werden. Als einziger Phänotyp wurde lediglich ein schwach ausgeprägter Wachstumsdefekt bei 42 °C für die *dom34*-Mutante in *C. albicans* beschrieben (Kluge, 2006).

ScDom34 und *CaDom34* sind Mitglieder einer evolutionär hoch konservierten Familie von Proteinen, der Dom34/Pelota-Proteinfamilie. Homologe dieser Proteine kommen in zahlreichen Eukaryoten vor, wie *Drosophila*, *C. elegans*, der Maus, *Arabidopsis* und dem Menschen (Castrillon *et al.*, 1993; Adham *et al.* 2002; Shamsadin *et al.*, 2000). Es konnten sogar innerhalb der Archaeobakterien Dom34-homologe Proteine nachgewiesen werden, so bei *Thermoplasma acidophilum* oder *Sulfolobus solfataricus*, dagegen wurde in keinem Bakterium ein Protein der Familie identifiziert (Ragan *et al.*, 1996). Die Dom34/Pelota-Proteine weisen in mehreren Sequenzbereichen eine Homologie zu einzelnen Domänen des eukaryotischen Release Factors eRF1 auf, einem Terminationsfaktor der Translation, der durch Interaktion mit der Peptidyltransferase-Stelle des Ribosoms die Freisetzung der Polypeptidkette vermittelt (Frolova *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Sequenzhomologie werden die Dom34/Pelota-Proteine in eine Subfamilie der eRF1-Proteine eingeordnet (Finn *et al.*, 2006; <http://www.expasy.org/sprot/>). Deletionen des *DOM34/Pelota*-Gens führen in den einzelnen Organismen zu verschiedenen Phänotypen. In *D. melanogaster* sind Männchen mit Mutationen in *Pelota* steril, verursacht durch eine Arretierung in der Prophase der ersten meiotischen Teilung der Spermatogenese, und Mutationen des *Pelo*-Gens der Maus führen zu einem Zellzyklusarrest und Letalität im frühen Embryonalstadium (Eberhart und Wasserman, 1995; Adham *et al.* 2002). In *S. cerevisiae* wurden neben dem oben erwähnten *O*-Glykosylierungsphänotyp weitere Phänotypen einer *dom34*-Mutante beschrieben, allerdings in einem speziellen genetischen Stammhintergrund (Davis und Engebrecht, 1998). *dom34*-Mutanten zeigten Zellzyklusdefekte in Form eines verzögerten Austritts aus der G₁-Phase, eine defekte Pseudohyphenbildung sowie ein reduziertes Auftreten von Polyribosomen zugunsten von mehr freien 40S und 60S Ribosomenuntereinheiten. Diese Defekte konnten durch die Überexpression des ribosomalen Proteins S30 der 40S Untereinheit aufgehoben werden. In späteren Arbeiten konnte weiterhin eine genetische Interaktion wie auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion von Dom34 mit dem G-Protein Hbs1 nachgewiesen

werden (Carr-Schmid *et al.*, 2002). Hbs1 zeigt ebenso wie Dom34 Homologie zu einem in der Translation involvierten Protein, dem eukaryotischen Release Factor eRF3 (Wallrapp *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen, insbesondere die Homologie der Dom34-Proteine zu eRF1 und das durch ribosomale Proteine komplementierbare veränderte Polyribosomenprofil der *dom34*-Mutante, führten zu der Annahme, dass Dom34 im Komplex mit Hbs1 an der Regulation der Translation beteiligt ist. Bei dieser Regulation spielt vermutlich sowohl eine Interaktion mit der mRNA als auch den ribosomalen Untereinheiten eine Rolle (Carr-Schmid *et al.*, 2002; Davis und Engebrecht, 1998). Da zudem der Phänotyp einer *S. cerevisiae dom34*-Mutante durch Expression des heterologen *D. melanogaster Pelota* komplementiert werden kann, postulieren die Autoren eine streng konservierte Funktion der eukaryotischen Mitglieder der Dom34/Pelota-Familie (Davis und Engebrecht, 1998).

1.7 Rolle von Dom34 im „no-go decay“

In neueren Arbeiten konnte eine Beteiligung von Dom34 und Hbs1 an einem weiteren Prozess in *S. cerevisiae*, dem „no-go decay“ gezeigt werden. mRNAs sind im Allgemeinen kurzlebige Moleküle, die in der Zelle nach Ablauf ihrer spezifischen Lebensdauer einer regulären Degradation durch 5'- beziehungsweise 3'-Exonucleasen unterliegen, die eine mRNA vom 5'- oder 3'-Ende beginnend abbauen. Neben diesem regulären Abbau verfügt die Zelle zusätzlich über Mechanismen der mRNA-Qualitätskontrolle, sogenannte „mRNA-surveillance pathways“, die defekte, nicht funktionell



translatierbare mRNAs erkennen und einen frühzeitigen Abbau dieser Moleküle bewirken. Zwei solcher Kontrollmechanismen sind bereits seit längerer Zeit bekannt. Zum einen erkennt der „nonsense-mediated decay“ (NMD) mRNAs mit frühzeitigem Stopcodon, deren Translation kein funktionelles Protein produziert, zum anderen werden mRNAs ohne Stopcodon im sogenannten „nonstop decay“ (NSD) erkannt und dem Abbau zugeführt (Gonzalez *et al.*, 2001; Wilusz *et al.*, 2001; Frischmeyer *et al.*, 2002; van Hoof *et al.*, 2002). Ein weiterer, erst kürzlich beschriebener Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle ist der „no-go decay“ (Doma und Parker, 2006). Durch diesen Kontrollmechanismus werden solche mRNAs erkannt, deren Translation durch eine Blockade des Ribosoms, ausgelöst durch chemisch modifizierte Nukleotide oder doppelsträngig gefaltete Bereiche innerhalb der mRNA („stem-loop“-Strukturen), nicht weiter voranschreitet. Die Erkennung eines während der Translations-Elongation angehaltenen Ribosoms führt zur endonucleolytischen Spaltung der mRNA in unmittelbarer Nähe des blockierten Ribosoms, dessen Freisetzung durch Dissoziation der Untereinheiten und dem anschließenden vollständigen Abbau der betroffenen mRNA.

Abb. 1.4: Schema des no-go decay in *S. cerevisiae*. Die Blockade des Ribosoms (Translational stalling) durch einen doppelsträngig gefalteten Bereiche der mRNA (Stem-loop) führt zu endonucleolytischer Spaltung der mRNA (Cleavage of mRNA) mit anschließendem vollständigen Abbau (degradation). Die Abbildung wurde Tollervey (2006) entnommen.

Sowohl für Dom34, als auch Hbs1 wurde eine Beteiligung am no-go decay nachgewiesen; beide Proteine werden für die initiale endonucleolytische Spaltung der mRNA benötigt, jedoch konnte die Identität der Endoribonuclease nicht aufgeklärt werden (Doma und Parker, 2006). In nachfolgenden Untersuchungen wurde postuliert, dass Dom34 selbst die Endoribonuclease-Funktion im no-go decay übernimmt (Lee *et al.*, 2007). Weitere Einblicke in die Funktion von Dom34 ermöglichte in diesem Zusammenhang die Aufklärung der Struktur des Pelota-Proteins aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* als Modell der Dom34/Pelota-Proteine. Da die Aminosäuresequenz innerhalb der Dom34/Pelota-Familie im Bereich der wichtigen funktionellen Bereiche konserviert ist, können die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen an *T. acidophilum* vermutlich auf andere Mitglieder der Protein-Familie übertragen werden. Eine nachfolgende Strukturanalyse des Dom34-Proteins aus *S. cerevisiae* bestätigte eine strukturelle Homologie zwischen den Vertretern der Dom34/Pelota-Proteinen dieser beiden Organismen (Graille *et al.*, 2008). Die Dom34/Pelota-Proteine sind aus drei etwa gleichgroßen Domänen aufgebaut. Domäne 2 und Domäne 3 zeigen dabei eine Homologie zu den entsprechenden Domänen des Translations-Terminationsfaktors eRF1, während Domäne 1 in ihrer Struktur stark von eRF1 abweicht (Lee *et al.*, 2007). Trotz der allgemeinen strukturellen Ähnlichkeit einzelner Domänen zu eRF1-Proteinen sind wichtige, für die spezifische Funktion dieser Faktoren bei der Termination der Translation verantwortliche Sequenzmotive in den entsprechenden Domänen der Dom34/Pelota-Proteine nicht zu finden. Dies betrifft ein für die Freisetzung der Polypeptidkette vom Ribosom verantwortliches, konserviertes Motiv in Domäne 2 (GGQ) der eRF1-Proteine, sowie eine Erkennungsstelle für das Stop-Codon der mRNA in Domäne 1 (NIKS).

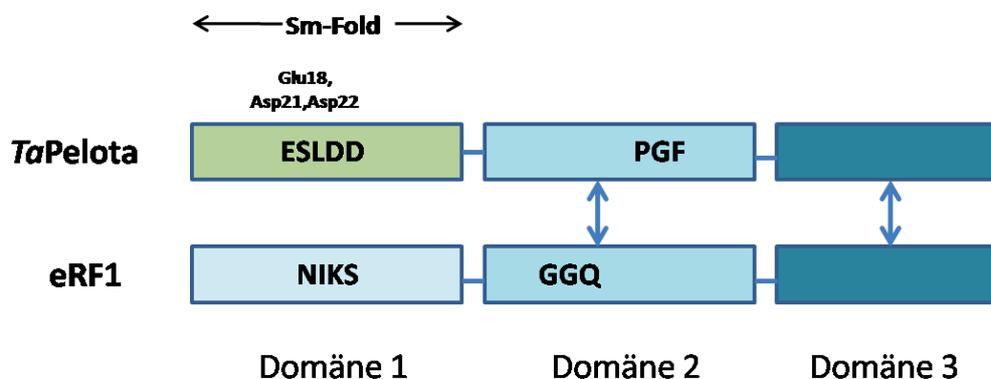


Abb. 1.5: Schematischer Aufbau des Pelota-Proteins aus *T. acidophilum* (*TaPelota*) und eRF1. Während Domäne 2 und 3 von *TaPelota* und eRF1 Homologien aufweisen, unterscheiden sich die Domänen 1 der Proteine deutlich. Blaue Pfeile deuten die Homologie der entsprechenden Bereiche an. ESLDD mit den konservierten sauren Aminosäuren Glu18, Asp21, Asp22; PGF; Sm-Fold bezeichnen konservierte Motive der Dom34/Pelota-Proteinfamilie. NIKS, GGQ bezeichnen konservierte Motive der eRF1-Proteine. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Lee *et al.* (2007) erstellt.

Aufgrund dieser spezifischen Unterschiede zwischen den beiden Protein-Familien wird vermutet, dass Dom34/Pelota-Proteine eine von eRF1 abweichende spezifische Funktion in der Translation erfüllen. Insbesondere der abweichende strukturelle Aufbau der Domäne 1 und eigene konservierte Motive innerhalb der Dom34/Pelota-Familie (ESLDD, PGF) unterstützen diese Hypothese. In gezielten Funktionsuntersuchungen konnte eine *in vitro* Endoribonuklease-Aktivität der Domäne 1 von *TaPelota* gezeigt werden, die ebenfalls für die Domäne 1 von *ScDom34* nachgewiesen wurde (Lee *et al.*, 2007). Die Proteine zeigten dabei

eine spezifische endonukleolytische Spaltung der doppelsträngigen stem-loop Strukturen einer synthetischen Substrat-RNA. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass Dom34 die für die endonucleolytische Spaltung der mRNA am blockierten Ribosom verantwortliche Endonuklease in *S. cerevisiae* darstellt.

Innerhalb der Domäne 1 von TaPelota konnten drei saure Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für die Ribonuklease-Aktivität des Proteins sind und vermutlich das aktive Zentrum repräsentieren (Lee *et al.*, 2007). Diese Reste sind innerhalb der Dom34/Pelota-Proteine konserviert und somit auch in Dom34 aus *C. albicans* zu finden. Es wurde bisher jedoch nicht untersucht, ob in *C. albicans* ebenfalls ein Prozess wie der no-go decay in *S. cerevisiae* existiert. Zudem konnte auch der Nachweis einer *in vitro* Endoribonuklease-Aktivität von *S. cerevisiae* Dom34 als Hinweis auf diese spezifische Funktion des Proteins im no-go-decay in neueren Arbeiten nicht reproduziert werden (Graille *et al.*, 2008). Es konnte sogar gezeigt werden, dass *dom34*-Mutationen mit einer Deletion der postulierten Ribonuklease-Domäne *in vivo* keinen Einfluss auf den no-go decay in *S. cerevisiae* haben (Passos *et al.*, 2009).

Die beschriebene Beteiligung von Dom34 an so unterschiedlichen Prozessen wie der *O*-Glykosylierung und der Regulation oder Qualitätskontrolle der Translation in *S. cerevisiae* stellen nicht notwendigerweise voneinander unabhängige Funktionen des Proteins dar. Aufgrund der zeitlichen und räumlichen Nähe der Translation eines Proteins und der cotranslationalen Glykosylierung der naszierenden Polypeptidkette während der Translokation durch die Sekretionspore des ER sind diese beiden Vorgänge eng miteinander verbunden.

1.8 Zielsetzung

In Hinsicht auf die spezielle Bedeutung der *O*-Glykosylierung von Proteinen für die Virulenz von *C. albicans* sollte in dieser Arbeit die spezifische Funktion von *DOM34*, unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Rolle bei der *O*-Glykosylierung in diesem humanpathogenen Pilz, untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte zunächst eine Doppeldeletionsmutante von *PMT1* und *DOM34* hergestellt werden und durch anschließende Phänotypanalysen und weitere genetische Untersuchungen eine mögliche genetische Interaktion der beiden Gene wie in der apathogenen Hefe *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Des Weiteren sollten Versuche zur Analyse einer potentiellen Funktion von Dom34 bei der Protein-Translation als möglicher Mechanismus der Regulation der *O*-Glykosylierung durch Dom34 durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid-Bisacrylamid, BCIP, Glasperlen, Glycerin, KCl, NBT, PEG, Roti-Phenol (Roth)
 Agar (BD)
 Agarose (PeqLab)
 Ampicillin, BSA, Ethidiumbromid, SDS (Serva)
 Bradford-Reagenz (Bio Rad)
 Bromphenol Blau (Janssen)
 Glucuronidase, IPTG, Sorbitol (Sigma)
 Glukose (Caesar & Lorentz GmbH)
 Heringssperma-DNA (Clontech)
 Hybond N (Amersham/Pharmacia)
 Hygromycin B (Calbiochem)
 ImmobilonP-Membran (Millipore)
 Isopropanol, Maleinsäure (Fluka)
 Klenow-Polymerase, Blocking-Reagenz, DIG-UTP-Labeling and Detection-Kit (Roche)
 Magermilchpulver, HEPES (Applichem)
 Natriumchlorid (J. T. Baker)
 Proteinase-Inhibitoren, „Complete Mini EDTA-free“ (Roche)
 Protein A-Sepharose (Zymed Laboratories)
 Proteinmarker (Fermentas, Invitrogen)
 “QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit” (Stratagene)
 Restriktionsenzyme (NE Biolabs, Roche, MBI Fermentas)
 Röntgenfilme (Fuji Rx-Med)
 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
 YNB w/o amino acids, Casamino acids, Hefeextrakt, Pepton (Difco Laboratories)
 Zymolyase (Seikagaku Kogyo Co. Ltd.)

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Invitrogen, Applichem und Sigma bezogen.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 2.1: verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α F'	F' [Φ 80 $\Delta(lacZ)$ M15] $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 r_K- m_K⁺ supE44 thi-1</i>	Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989
BL-21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r	Promega

2.2.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 2.2: verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
SEY-6210	<i>MATα</i> , <i>leu2,3-112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>trp1-Δ901</i> , <i>lys2-801</i> , <i>suc2-Δ9</i> , <i>GAL+</i>	Candida-Sammlung Ernst
W303	<i>MATα</i> , <i>ura3-1</i> , <i>trp1Δ2</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>his3-11</i> , <i>ade2-1</i> , <i>can1-100</i>	K. Melcher

2.2.3 *C. albicans*-Stämme

Tab. 2.3: verwendete *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
SC5314	prototroph	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	<i>Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAF2-1	<i>Δura3::imm434/URA3</i>	Fonzi und Irwin, 1993
SK47	wie CAI4, aber <i>dom34Δ::FRT/dom34Δ::FRT</i>	Kluge, 2006
JH47-1	<i>dom34Δ ::FRT/dom34Δ ::FRT</i> <i>ura3Δ ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
JH47-2	wie JH47-1	diese Arbeit
CAP1-3121	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
SPCa2	<i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill, 2004
SK24	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG</i> <i>dom34Δ::FRT/dom34Δ::FRT</i>	Kluge, 2006
JH24-4	<i>pmt1Δ ::hisG/pmt1Δ ::hisG dom34Δ::FRT/</i> <i>dom34Δ::FRT ura3Δ ::imm434/URA3</i>	diese Arbeit
JH24-5	wie JH24-4	diese Arbeit
JH5	wie SK47, aber <i>PMT5/pmt5Δ-URA3</i>	diese Arbeit
JH5-3	wie SK47, aber <i>PMT5/pmt5Δ-hisG</i>	diese Arbeit
JH5-3-1	wie SK47, aber <i>pmt5Δ-URA3/pmt5Δ-hisG</i>	diese Arbeit
JH8	wie JH5	diese Arbeit
JH8-5	wie JH5-3	diese Arbeit
JH8-5-11	wie JH5-3-1	diese Arbeit
SPCa10	<i>pmt5Δ::hisG/pmt5Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill, 2004
P15-274	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt5Δ-</i> <i>URA3/pmt5Δ-hisG</i>	Klinkert, 2002
P15-274-1	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt5Δ-</i> <i>hisG/pmt5Δ-hisG</i>	diese Arbeit
CPP112	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt6Δ-</i> <i>hisG/pmt6Δ-URA3</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1999
CPP1121	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt6Δ-</i> <i>hisG/pmt6Δ-hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1999
SPCa8	<i>pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill, 2004

SPCa4	<i>PMT2/pmt2Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill, 2004
SPCa6	<i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill, 2004
Pmt1-HA(URA)	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{HA}-URA3</i>	I. Schmidt, persönliche Mitteilung
CIS23	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{HA}-SAT</i>	Schmidt, 2007
Pmt2-HA(URA)	wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{HA}-URA3</i>	I. Schmidt, persönliche Mitteilung
CIS25	wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{HA}-SAT</i>	Schmidt, 2007
JHCa1-1	wie CAI4, aber <i>DOM34/DOM34^{HA}-URA3</i>	diese Arbeit
JHCa1-2	wie JHCa1-1	diese Arbeit

2.2.4 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Medium (Luria *et al.*, 1960)

1 % Trypton (Pepton 140), 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

Die Selektion in *E. coli* erfolgte durch Zugabe von Ampicillin auf eine Konzentration von 100 µg/ml. Festes Medium wurde durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C.

2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium)

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

SD (Minimalmedium)

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base), 2 % Glukose
pH 6,9 mit NaOH eingestellt

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* in SD wurden Aminosäuren hinzugefügt, wie bei Zimmermann (1975) beschrieben.

CASA

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base), 4 % Casamino acids

Serum-Medium

5 % Pferde-Serum

Spider (Liu *et al.*, 1994)

1 % Nutrient Broth, 1 % Mannitol, 0,2 % K₂HPO₄, 100 mM NaCl

FOA-Medium (McCusker und Davis, 1991)

0,02 % 5-Fluoro-Orotic Acid (FOA), 0,001 % Uridin, 2 % Glukose, 0,17 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat), 0,1 % Prolin

Festes Medium wurde durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Das Wachstum der Hefen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei 30 °C.

2.2.6 Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium

Die Hypheninduktion erfolgte zum einen auf Serumplatten bei 37 °C für 3 Tage. Zum anderen wurde die Hyphenbildung durch Wachstum auf Mangelmedium induziert. Hierzu wurden Spider-Platten hergestellt. Die Stämme wurden 4-5 Tage bei 30 °C, oder für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.2.7 Medien mit verschiedenen Substanzen

Zur Charakterisierung der Phänotypen verschiedener Stämme wurden deren Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Chemikalien getestet. Dazu wurden die verschiedenen Substanzen YPD bzw. SD-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C, wenn nicht anders angegeben, in folgender Endkonzentration zugesetzt:

Hygromycin B: 200µg/ml

SDS: 0,06 %

2.3 Primer und Plasmide

2.3.1 Plasmide

Tab. 2.4: verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pSK2	Expression von <i>CaDOM34-FLAG</i> unter Kontrolle des <i>CaMET3</i> -Promotors; <i>CaURA3</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	Kluge, 2006
pSP38	<i>CaMET3</i> -Promotor mit FLAG-Epitop; <i>CaURA3</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	Prill, 2004
pJB34	<i>CaDOM34</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors; <i>CaURA3</i> , <i>CaLEU2</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	J. van den Boom, persönliche Mitteilung

pBI-1	<i>CaPCK1</i> -Promotor in pRC2312; <i>CaURA3</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	Rademacher, 1998
HB5	genomischer <i>CaURA3</i> -Locus zur Rekonstituierung des <i>CaURA3</i> -Gens	Losberger und Ernst, 1989
pBK-5	<i>PMT5-URA3</i> -Blaster zur Disruption von <i>CaPMT5</i> ; <i>CaURA3</i> , <i>amp</i>	Klinkert, 2002
pBK-Pmt5b	<i>CaPMT5</i> -ORF mit 1 kb Promotorregion in pUC18; <i>amp</i>	Klinkert, 2002
pSP9	Expression von <i>CaKRE9-FLAG</i> unter Kontrolle des <i>ACT1</i> -Promotors; <i>CaURA3</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	Prill, 2004
pJB34-AKF	<i>ACT1</i> -Promotor- <i>CaKRE9-FLAG</i> (<i>SmaI</i> -Fragment) in pJB34 (<i>EcoRV</i>); <i>CaURA3</i> , <i>CaARS</i> , <i>amp</i>	diese Arbeit
pPdC2	<i>PMT1</i> -Promotor (-1153 bp bis -170 bp)- <i>RLUC</i> ; <i>CaRP10</i> , <i>CaURA3</i> , <i>amp</i>	P. Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung
pPdC3	<i>PMT1</i> -Promotor (-1153 bp bis -192 bp)- <i>RLUC</i> ; <i>CaRP10</i> , <i>CaURA3</i> , <i>amp</i>	P. Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung
pGEM-HIS1	<i>CaHIS1</i> , <i>amp</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
pPdC2-HIS	pPdC2 (<i>MfeI</i>) mit <i>CaHIS1</i> -Selektionsmarker aus pGEM-HIS1 (<i>BamHI</i> , <i>MscI</i>); <i>CaRP10</i> , <i>amp</i>	diese Arbeit
pPdC3-HIS	pPdC3 (<i>MfeI</i>) mit <i>CaHIS1</i> -Selektionsmarker aus pGEM-HIS1 (<i>BamHI</i> , <i>MscI</i>); <i>CaRP10</i> , <i>amp</i>	diese Arbeit
pET22b	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit T7-Promotor und 10x <i>HIS</i> -Epitop; <i>amp</i>	Novagen
pET22b-Dom34	<i>E. coli</i> -Expression von <i>CaDOM34</i> (PCR Dom34-NdeI-FW und Dom34-XhoI-RV-Stopp) in pET22b (<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>) mit C-terminaler 10x <i>HIS</i> -Fusion	diese Arbeit
p3HA-URA3	3xHA- <i>CaURA3</i> -Fragment zur C-terminalen Markierung mit dem dreifachen HA-Epitop; <i>CaURA3</i> , <i>amp</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
YCplac111	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionsvektor; <i>ScLEU2</i> , <i>amp</i>	Gietz und Sugino, 1988
pSW25	Expression von <i>ScDOM34</i> mit C-terminalem HA-Epitop unter Kontrolle des <i>GALI</i> -Promotors in YCplac111; <i>ScLEU2</i> , <i>amp</i>	Wickert, 1998

2.3.2 Primer

Tab. 2.5: verwendete Primer

Primer	Sequenz
i-p2-URA3ver	5'-TTACAATCAAAGGTGGTCC-3'
p3-URA3ver	5'-GGTACAGTTGTTCCCTCACA-3'
p-URA3-v	5'-GGT CTT AGT GTT GAC TGT C-3'
v-PMT5-1	5'-CTG GTA TAG GAG TTA CAC C-3'
pcURA3	5'-GGTAAAGGAAGAGATCCAG- 3'
p-PMT5-1	5'-TTA CTG CAG GTC ATT CCT CGA ATT TAA GTC-3'
Dom34(Glu-Ala)for	5'- GCAATAACCTTGGTACCCGCTGATTCCGAGGATTTA TGG-3'
Dom34(Glu-Ala)rev	5'- CCATAAATCCTCGGAATCAGCGGGTACCAAGGTTAT TGC-3'

Dom34-NdeI-FW	5'- GGAATTCCATATGGCTGGCACAGTTCCTGGCCA- 3'
Dom34-XhoI-RV- Stopp	5'- CGCTGAGGTCTTCTTCATCACTGTC- 3'
Dom34-HA(for)	5'-GAATCTGGTGAACAATTGAATCAGTTGACGGGTATTGC TGCTTTATTGAAATATCCGATACCAGATCTTGATGACAGT GATGAAGAAGACGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATT AA-3'
Dom34-HA(rev)	5'-GGTTTAATACAGGACTATTTAATTCACGCCAGAAAGGG TAGAGTCTGGTATTTAGATAGGTATACACAACAAAAAC TCGTATAAAAAATAATACTCTAGAAGGACCACCTTTGA TTG-3'
p1-Dom34-HA	5'- GGAGGCATTACAGCGCTTCC-3'
p2-Dom34-HA	5'- GAGCAGCGTAATCTGGAACG-3'
p3-Dom34-HA	5'- GAGCTAAAGAAACCACCACC-3'
p4-Dom34-HA	5'- GCAGCATTCTTAACATCGAC-3'

Primer für die quantitative RT-PCR:

Primer	Sequenz
ACT1(RT)-r	5'- TGGACAAATGGTTGGTCAAG- 3'
ACT1(RT)-f	5'- TTGGATTCTGGTGATGGTGT- 3'
PMT1-RT-f	5'- GCTGCTGAACCTGTTGAAGA- 3'
PMT1-RT-r	5'- CATCAGCAACTTGTGGGTCT- 3'
PMT2-for-RTa	5'- CCATGATGGCTACTAACAATG- 3'
PMT2-rev-RTa	5'- CCCATCCACACATTCTAATACC- 3'
PMT4-RT-f	5'- TTGGAAACATCATTGGGTTC- 3'
PMT4-RT-r	5'- TTGATCTTGCTCTGTGCTT- 3'
PMT5-RT-f	5'- CCCTTATGCATCTCCTCCAT- 3'
PMT5-RT-r	5'- CACCAAATATGGCCAGGAAT- 3'
PMT6-RT-f	5'- ATTTGTTGGTTGTTGGCATC- 3'
PMT6-RT-r	5'- TGATTGACTGTTTGCTGGGT- 3'
DOM34-RT-(f)	5'- GTTGAATGATGACGACGGAA -3'
DOM34-RT-(r)	5'- CGTCGCTTCTAAACAAAGCA -3'

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Arbeiten nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

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

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Für präparative Zwecke und für die Isolation von Plasmiden, welche zur Sequenzierung verwendet wurden, erfolgte die Isolierung

der Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen. Dabei wurde dem Protokoll der Hersteller Firma (Qiagen, Hilden) gefolgt.

2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen

Gesamt-DNA aus *C. albicans* wurde nach einer modifizierten Methode von Sherman *et al.* (1986) isoliert. Die Zellen einer 5 ml großen stationären Übernachtskultur wurden einmal in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Pellet in 400 µl SCE/Zymolyase-Lösung (1,2 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA pH 7,0; 200 µg/ml Zymolyase (100T); 20 mM 1,4-Dithiothreitol) resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (5 min, 4000 Upm) und in 500 µl 50 mM EDTA pH 8,0 aufgenommen. Durch Zugabe von 50 µl 10 % SDS-Lösung und 15 – 30 min Inkubation bei 65 °C erfolgte die Lyse der Zellen und die Denaturierung der Proteine. Nach Abkühlung der Suspension auf Raumtemperatur wurden die Proteine durch Zugabe von 100 µl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung pH 6,0 für 30 – 90 min auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 Upm, 4 °C) zur Abtrennung der Proteine und der Zellreste wurde die DNA im Überstand mit 900 µl Ethanol gefällt und abzentrifugiert (15 min, 15000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 400 µl RNase-Lösung (150 mM Natriumacetat pH 5,9; 200 µg/ml RNase A; 10 mM Tris/HCL pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 30 – 60 min bei 37 °C wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die DNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 800 µl Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.4.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

2.4.4 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Um kohäsiv geschnittene DNA-Enden nach einer Restriktionsendonukleolyse in stumpfe Enden umzuwandeln, wurde eine Auffüllreaktion durchgeführt. Hierzu wurden 5'-überhängende DNA-Enden durch zugegebene dNTP (0,5 µl einer 25 mM Lösung) und Klenow-Fragment (3 U) in 30 min bei 37 °C zu Doppelsträngen ergänzt. Nach Inkubation von 15 min bei 72 °C und anschließender Phenol-/Chloroformextraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.5 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von 5'-Enden linearer DNA wurde mit alkalischer Phosphatase nach den Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt und das Enzym 10 min bei 65 °C inaktiviert. Daran schloss sich eine Phenol/Chloroform – Extraktion, gefolgt von einer Ethanol – Fällung der geschnittenen und dephosphorylierten DNA, an.

2.4.6 Ligation

Ligationsreaktionen zur Verknüpfung verschiedener DNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl oder 20 µl durchgeführt. Es wurden je nach Ansatz unterschiedliche molare Verhältnisse von Vektor zu Insert gewählt. Nach Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) wurde der Ansatz bei 16 °C über Nacht oder für 48 h bei 4 °C (blunt-end Ligationen) inkubiert.

2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerprotokoll.

2.4.8 DNA-Größenstandard

λ-DNA (MBI Fermentas), welche mit *EcoRI/HindIII* oder mit *HindIII* geschnitten wurde (Fragmentgrößen (bp): 24756, 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125). Alternativ wurde als Größenstandard eine 1 kb Leiter (MBI-Fermentas) verwendet (Fragmentgrößen (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250).

2.4.9 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

Photometrisch

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$A_{260} \cdot \varepsilon = c \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA sowie 33 µg/ml Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993)

Abschätzung im Agarosegel

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde in Agarosegelen anhand von Fragmenten vergleichbarer Größe und bekannter Konzentration abgeschätzt. Chromosomale DNA wurde im Vergleich zu bekannten Mengen ungeschnittener DNA des Bakteriophagen λ abgeschätzt.

2.4.10 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse

(Southern, 1977; Sambrook *et al.*, 1989)

2.4.10.1 Sondenmarkierung

Zur Markierung von DNA-Fragmenten wurde das Prinzip des "random priming" verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden

erfolgte mit dem "DIG DNA Labeling and Detection Kit non radioactive" der Firma Roche. In einem Reaktionsansatz wurden 100-500 ng DNA über Nacht markiert. Die Konzentration der Sonde wurde vor der Hybridisierung im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit markierter Kontroll-DNA abgeschätzt.

2.4.10.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot

1,5 bis 2 µg der zu untersuchenden DNA wurde in 100 µl Volumen über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (jeweils 20 U) geschnitten und dann in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, um anschließend in einer Vakuum-Blotkammer (LKB 2016 VacuGene von Pharmacia) auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham/Braunschweig) transferiert zu werden. Nach dem Anlegen eines konstanten Vakuums erfolgte eine dreiminütige Denaturierung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), eine ebenfalls dreiminütige Neutralisierung (3 M NaAc, pH 5,5) und der Transfer der DNA für 45 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7). Zur Fixierung der DNA wurde die Membran für 3 min unter UV-Licht (312 nm) bestrahlt.

2.4.10.3 Hybridisierung und Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Hybond N-Nylonmembran erfolgte zunächst eine 1-4-stündige Inkubation in Prähybridisierungslösung (5x SSC; 1 % Blockierungslösung [Roche]; 0,1 % N-Laurylsarkosinat; 0,02 % SDS) bei 68 °C im Wasserbad. Darauf folgte die Hybridisierung der Membran mit der Digoxigenin-markierten Sonde, die zuvor für 10 min bei 95 °C denaturiert wurde, ebenfalls bei 68 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran zweimal je 5 min bei Raumtemperatur gewaschen (2x SSC; 0,1 % SDS) und einmal für 15 min bei 68 °C (0,1x SSC; 0,1 % SDS). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 30-60 min in 1 % Blockierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich eine 45 min Inkubation mit Antikörperkonjugat (polyklonale Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente konjugiert mit alkalischer Phosphatase) in 1 % Blockierungslösung an. Es folgten zwei 15 min Waschschrte in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure; 150 mM NaCl). Nach Äquilibrierung der Membran (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂) für 2 min erfolgte die Detektion im gleichen Puffer mittels des durch die alkalische Phosphatase katalysierten Umsatzes der Substrate NBT (0,338 mg/ml) und X-Phospat (0,175 mg/ml) zu einem blauen Farbstoff.

2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Fallona, 1987) diente zur präparativen Amplifikation von DNA und zu analytischen Zwecken bei der Verifikation von Transformanten (Kolonie-PCR). Sie wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Zur Klonierung bestimmte PCR Fragmente wurden mit dem "QIAquick PCR-Purification"-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

2.4.11.1 Amplifikation von DNA für präparative Zwecke

Für die präparative Amplifikation von DNA, z.B. zum Zweck der Transformation bei der Epitopmarkierung von Genen, wurde das „Expand™ High Fidelity“-PCR-Kit von Roche Diagnostics verwendet. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden neben dem DNA-Template 200µM dNTP, je 20 pmol des 5'- und 3'-Primers und High Fidelity Polymerase mit dem zugehörigen PCR-Puffer mit MgCl₂ eingesetzt. Die Amplifikation der DNA erfolgte in 20 Zyklen, wobei die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit den jeweiligen Primern bzw. dem Produkt angepasst wurden.

2.4.11.2 Kolonie-PCR

Zur Verifikation von Transformanten wurde die PCR auf ganzen Zellen einzelner Kolonien durchgeführt. Dazu wurde etwas Zellmaterial einer Kolonie in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und 10 min bei 95 °C inkubiert. Für die Kolonie-PCR wurde Taq-Polymerase von NEB mit dem dazugehörigen PCR-Puffer mit MgCl₂ verwendet und 2 µl der Zellsuspension eingesetzt. Die übrigen Komponenten wurden wie in 2.4. .1 beschrieben eingesetzt, wobei eine Amplifikation in 35 Zyklen erfolgte.

2.4.11.3 Mutagenese-„PCR“

Der gezielte Austausch einzelner Basen erfolgte mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene). Die dafür verwendeten Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben ausgewählt und die Mutagenese-Reaktionen entsprechend durchgeführt.

2.4.11.4 Quantitative RT-PCR/ Real Time-PCR

Die Analyse der Expression einzelner Gene erfolgte mit Hilfe der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bzw. Real Time-PCR. Die Real Time-PCR ermöglicht im Gegensatz zur Endpunktbestimmung der konventionellen PCR eine Verfolgung der Amplifikation der DNA in Echtzeit („Real Time“) und somit eine Quantifizierung der Ausgangskopienzahl. Die Messung der Amplifikation der DNA wird dabei durch fluoreszierende Reportermoleküle ermöglicht, die an das gebildete Produkt binden und dessen Zunahme so in Echtzeit sichtbar machen. In dieser Arbeit wurde SYBR Green verwendet, das sequenzspezifisch, aber spezifisch nur in doppelsträngige DNA interkaliert. SYBR Green wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm, wobei die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs 200-fach höher ist als die des freien Farbstoffs. Diese Eigenschaften ermöglichen nach der Amplifikation eine Überprüfung auf Nebenprodukte, wie sie beispielsweise durch Kontamination, Primer-Dimere oder Falschanlagerung der Primer entstehen können. Im Anschluss an den PCR-Lauf wird eine Schmelzkurve des Produkts erstellt, indem der Reaktionsansatz langsam erhitzt wird. Bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des Produkts ist dieses zu 50 % zu Einzelsträngen denaturiert, so dass ein drastischer Fluoreszenzabfall durch eine Freisetzung des zuvor gebundenen SYBR Green gemessen wird. Hierbei sollte nur ein Produkt mit einer spezifischen Schmelztemperatur detektiert werden, jedes Nebenprodukt tritt als weiterer peak mit einer anderen Schmelztemperatur auf.

Die Ermittlung der Ausgangskopienzahl der eingesetzten DNA und somit der Expressionsrate eines Gens erfolgt bei der Real Time-PCR nicht absolut, sondern als relative Größe in

Relation zu einem Referenzgen, das unter den untersuchten Bedingungen unverändert exprimiert wird (relativer Transkriptspiegel). In dieser Arbeit wurde das Actin-Gen *ACT1* als Referenzgen für *C. albicans* verwendet, da es als housekeeping-Gen in den untersuchten Stämmen nicht reguliert ist. Für die Berechnung des relativen Transkriptspiegels eines Gens (RTL, relative transcript level) wird der Ct-Wert (threshold cycle) des Gens ermittelt. Dabei handelt es sich um den Amplifikationszyklus, bei dem die Fluoreszenz des betreffenden Produkts einen bestimmten Grenzwert (threshold) überschreitet. Die Berechnung des RTL erfolgt dabei unter Berücksichtigung der Effizienz der jeweiligen Amplifikation, da diese das Ergebnis stark beeinflussen kann. Theoretisch beträgt die Amplifikationsrate oder Effizienz bei einer PCR 2, das heißt es findet eine Verdoppelung der DNA innerhalb eines Zyklus statt. In der Praxis kann dieser Wert jedoch abweichen und muss daher für jedes Gen ermittelt werden. Dazu wird eine Standardkurve für jedes Gen erstellt, bei der fünf Verdünnungen derselben DNA gemessen werden. Aus der Steigung (slope) der Standardkurve kann die Effizienz (E) mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt werden:

$$E = 10^{-1 / \text{slope}}$$

Der relative Transkriptspiegel des Gens kann so schließlich aus den gemessenen Ct-Werten unter Berücksichtigung der berechneten Effizienzen ermittelt werden:

$$\text{relativer Transkriptspiegel} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Aktin}})^{\text{Ct}_{\text{Aktin}}}}{(\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}})^{\text{Ct}_{\text{Zielgen}}}}$$

Präparation von RNA aus *C. albicans*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellen einer 50 ml Kultur bei einer $OD_{600} = 0,5$ geerntet (5 min, 3500 Upm) und nach Abgießen des Überstands im verbliebenen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam so in flüssigen Stickstoff getropft, dass gefrorene Zellkügelchen entstanden. Die Zelltropfen wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Zellaufschluss der gefrorenen Kugeln erfolgte in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) mit einer 7 mm Carbid-Kugel im Stickstoff-gekühlten Teflon-Gefäß 2 min bei 2600 Upm. Das entstandene Zellpulver wurde noch gefroren möglichst zügig in 1 ml Trizol[®] (Invitrogen) resuspendiert und nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) 1 min kräftig geschüttelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 13000 Upm) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 400 μl Chloroform zugesetzt, die Proben für 15 sec geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 Upm) wurde die obere, farblose Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde zunächst durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und dann pelletiert (10 min, 13000 Upm). Das RNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol (verdünnt in DEPC-dH₂O) gewaschen (vortexen; 10 min, 13000 Upm) und danach luftgetrocknet. Die RNA wurde in

500 μl DEPC-dH₂O resuspendiert (vortexen; 10 min, 37 °C) und nach Zugabe von 500 μl LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA) erneut mindestens 1 h oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach dem Auftauen wurde die RNA pelletiert (30 min, 13000 Upm) und zweimal mit 1 ml bzw. 500 μl 70 % Ethanol gewaschen (s.o.). Das Pellet wurde 15 min getrocknet und die RNA in 50- 100 μl DEPC-dH₂O aufgenommen.

Synthese der Komplementär-DNA

Für die Analyse des Expressionslevels bestimmter Gene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR muss aus der isolierten mRNA zunächst durch reverse Transkription komplementär-DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dazu erfolgte zunächst eine DNase-Behandlung (TURBO DNase Kit, Ambion) der isolierten Gesamt-RNA und danach die reverse Transkriptase-Reaktion (RETROscript® Kit, Ambion mit SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen).

(I) DNase-Behandlung

8 μg RNA
2 μl 10x DNase I-Puffer
1 μl DNase I

auffüllen mit dH₂O auf 20 μl Reaktionsvolumen, Inkubation 30 min, 37 °C.

Nach der DNase-Reaktion erfolgte eine Aufreinigung der RNA mit einem RNA Clean-up Kit (R1015 von Zymo research) nach Herstellerangaben.

(II) Reverse Transkription

1-2 μg RNA
2 μl Oligo (dT)

auffüllen mit Nuklease-freiem dH₂O auf 12 μl Gesamtvolumen, 3 min bei 70 °C denaturieren, danach auf Eis inkubieren.

Danach erfolgte die Zugabe von:

2 μl 10x RT Puffer
4 μl dNTP Mix
1 μl RNase-Inhibitor
1 μl SuperScript™ II ReverseTranskriptase

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42 °C inkubiert und danach die Reverse Transkriptase 10 min bei 95 °C inaktiviert.

Um das Auftreten kontaminierender DNA in den für die quantitativen RT-PCR Messungen verwendeten RNA-Proben auszuschließen, wurde für jede untersuchte Probe zusätzlich eine so genannte „NoRT“-Kontrolle angesetzt. Dazu wurde parallel eine zweite Probe der DNase-behandelten RNA nach der Denaturierung mit Oligo (dT) nicht mit Reverser Transkriptase versetzt, sondern nur mit dH₂O auf 20 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und später ebenfalls in die quantitative RT-PCR eingesetzt.

quantitative RT-PCR Analyse

Für die quantitative RT-PCR Reaktion wurde das SYBR Green Kit von Invitrogen (Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG Kit, Invitrogen) verwendet. In diesem System wird ROX (25 μ M 5-carboxy-X-rhodamin in 10 mM Tris/HCl, pH 8.6; 0,1 mM EDTA; 0,01 % Tween-20) als ein passiver Referenzfarbstoff eingesetzt, um leichte Volumenschwankungen in den einzelnen Reaktionsansätzen durch Berücksichtigung der Fluoreszenz des Referenzfarbstoffs rechnerisch auszugleichen zu können. Dazu wurden zu 1,2 ml Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG 5 μ l ROX gemischt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 mit dH₂O verdünnt in die quantitative RT-PCR eingesetzt. Jede Reaktion wurde in einem Ansatz mit 25 μ l Gesamtvolumen und folgenden Komponenten durchgeführt:

cDNA (1:10 Verdünnung)	10 μ l
SYBR Green Mix (+ ROX)	12,5 μ l
Forward primer [2 μ M]	1,25 μ l
Reverse primer [2 μ M]	1,25 μ l
Σ	25 μl

Jede Messung wurde mindestens als Zweifachbestimmung (Duplikate) oder als Dreifachbestimmung (Triplikate) durchgeführt. Die Bestimmung der Effizienz für jedes Gen erfolgte durch die Erstellung einer Standardkurve aus fünf Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:10000 derselben cDNA. Für die Bestimmung des relativen Transkriptspiegels eines Gens wurden mindestens zwei Messungen von unabhängigen RNA-Präparationen durchgeführt (biologisches Replicate).

Die Primer für die quantitative RT-PCR wurden mit Hilfe des Programms „Real-time PCR Design“ (www.genscript.com/ssl-bin/app/primer) ausgewählt. Wichtige Kriterien bei der Auswahl waren dabei eine Länge von 18-30 bp, ein GC-Gehalt von 40-60 %, eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur des Primerpaars sowie das Vermeiden von Hairpinstrukturen, Dimerbildung und anderen Strukturen, die zu Problemen bei der Amplifikation führen könnten. Von jedem in der quantitativen RT-PCR verwendeten Primerpaar wurde außerdem eine Kontrolle ohne cDNA (ersetzt durch 10 μ l dH₂O) amplifiziert, um Primer-bedingte Nebenprodukte auszuschließen.

Die quantitative RT-PCR wurde in einem ABI PRISM[®] 7000 mit folgendem Programm durchgeführt:

- AmpliTaq Aktivierung: 95 °C für 10 min
- Denaturierung: 95 °C für 1 min
- Annealing: 60 °C für 30 sec
- Extension: 72 °C für 30 sec (40 Wiederholungen)

Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Abschnitt 2.4.11.4 erläutert.

2.5 Transformation

2.5.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983).

2.5.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Li-Acetat Methode (Gietz und Schiestl, 1995).

2.5.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte nach einer Lithiumacetat-Methode nach Mitchell (Wilson *et al.*, 2000). 50 ml einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,5 - 0,8$) wurden abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm), das Pellet mit 5 ml LATE-Puffer (0,1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 0,5 ml LATE-Puffer resuspendiert. Pro Ansatz wurden zu 100 μ l Zellsuspension 5 μ l Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und die zu transformierende DNA (bis zu 80 μ l PCR-Produkt bzw. 2-10 μ g DNA) hinzugefügt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG3350 in LATE-Puffer) zugegeben, kurz gemischt (Vortex, 2 sec) und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Auf die Inkubation folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Nach Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) wurde das Pellet in 5 ml YPD resuspendiert und zur Regeneration für 4 Stunden bei 30 °C inkubiert (110 Upm). Der Ansatz wurde abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm) und das Pellet im verbleibenden Restmedium resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Antikörper

Tab. 2.6: primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Quelle
Anti-FLAG, Peroxidase konjugiert	Monoklonal, Maus	1: 1000	Sigma
Anti-HA	Monoklonal, Ratte	1: 1000	Roche
Anti-HA	Polyklonal, Kaninchen	1: 2000	Sigma
Anti-Als1	Polyklonal, Kaninchen	1: 10000	L.L. Hoyer
Anti-CaPir1	Polyklonal, Kaninchen	1: 1000	Eulogio Valentin
Anti-Actin	Monoklonal, Maus	1: 1000	MP

Tab. 2.7: sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Quelle
Anti-Ratte, Peroxidase konjugiert	Ziege	1: 20000	Pierce
Anti-Kaninchen, Peroxidase konjugiert	Ziege	1: 20000	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.
Anti-Maus, Peroxidase konjugiert	Ziege	1:20000	Pierce
Anti-Ratte, FITC konjugiert	Ziege	1: 100	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.

2.6.2 Präparation von Hefe-Rohextrakten

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis ausgeführt. 20- 50 ml einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,6- 0,8$) wurden geerntet (5 min, 3500 Upm), einmal mit 20 ml dH_2O gewaschen und das Zellpellet über Nacht bei -20 °C eingefroren. Das aufgetaute Pellet wurde in 200µl -500µl Lysis-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 1 % Triton X 100) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit 2/3 Volumen Glasperlen für zweimal 10 min auf dem Vibrax (IKA) bei 2200 Upm mit einer 10 minütigen Pause. Es folgte eine Abtrennung der Glasperlen (2 min, 2000 Upm) und der Zelltrümmer (5min, 3500 Upm). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Rohextrakt für eine Western-Analyse bei -70 °C eingefroren bzw. direkt in die Koimmunopräzipitation eingesetzt.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Es wurden 1-15 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit Wasser verdünnt und mit 0,2 ml „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei RT inkubiert und die Messung erfolgte in einem Photometer bei 595 nm. Als Standard wurde eine Eichkurve mit 1-15 µg BSA erstellt.

2.6.4 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die Luziferase-Aktivität von Rohextrakten wurde unter Verwendung des „Renilla Luciferase Assay System“ der Firma Promega in einem Fluoroskan Ascent Fl Luminometer der Firma Labsystems gemessen. Die eingesetzten Rohextrakte wurden wie unter 2.6.2 beschrieben hergestellt, es wurde jedoch 1x Renilla Luciferase Assay Lysis-Puffer zum Resuspendieren des Zellpellets verwendet. Für die Aktivitätsmessung wurden 100 µl Reaktionsgemisch (99 µl 1x Renilla Luciferase Assay Reaktions-Puffer und 1 µl Renilla Luciferase Substrat) in 96-well Mikrotiterplatten (cliniplate, Labsystems) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Rohextrakt gestartet. Die Lumineszenz wurde dann über einen Zeitraum von 10 sec gemessen. Die Luziferase-Aktivität wurde nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.3) als relative light units (RLU) normalisiert auf den Proteingehalt in µg berechnet.

2.6.5 Koimmunopräzipitation

Für die Koimmunopräzipitation wurden 500 µl Rohextrakt mit 7 µg des primären Antikörpers 1- 4 h auf einem Kippschüttler bei 4 °C inkubiert. Protein A-Sepharose (Zymed Laboratories) wurde dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen (1 min, 13000 Upm) und danach für den gleichen Zeitraum in Lysis-Puffer auf dem Kippschüttler äquilibriert. Nach einem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in einem Volumen Lysispuffer zu einer 50 %igen Lösung resuspendiert. 80 µl Sepharosesuspension sowie die Lösung aus Rohextrakt und Antikörper wurden 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und die Rohextrakt-Antikörper-Lösung zu dem Sepharosepellet gegeben. Diese Suspension wurde wiederum mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C auf dem Kippschüttler inkubiert. Das Präzipitat wurde dreimal mit Lysispuffer und einmal mit PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,4) gewaschen (1 min, 13000 Upm) und die restliche Flüssigkeit mit einer dünnen Glaskapillare abgenommen. Das Sepharosepellet wurde in 60 µl 3x SDS-Probenpuffer (30 % Glycerin; 6 % SDS; 188 mM Tris/HCl pH 6,8; 15 % β-Mercaptoethanol; 0,006 % Bromphenolblau; Laemmli, 1970) resuspendiert und zur Denaturierung der Präzipitate 20 min bei 70 °C erhitzt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden je 25 µl des Überstands auf zwei SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und das präzipitierte sowie das möglicherweise kopräzipitierte Protein durch Immunoblotanalyse mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesen.

2.6.6 PNGase F-Behandlung

Zur gezielten Untersuchung der O-Glykosylierung von Proteinen wurde eine Abspaltung der N-Glykosylketten mit Hilfe von PNGase F (Peptid:N-glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum*, Roche) durchgeführt. PNGase F ist eine Amidase, die zwischen dem Asparagin und dem ersten GlcNAc (N-Acetylglukosamin) der Glykosylketten der N-Glykosylierung spaltet. Für die PNGase F-Behandlung von Proteinen wurde ein Aliquot des Rohextrakts entsprechend 20 µg Protein zunächst mit 1/10 Volumen Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach dieser Denaturierung der Proteine wurden 1/10 Volumen Reaktionspuffer (0,5 M Na-Citrat, pH 7,5) und 1/10 Volumen 10 % NP-40 sowie 1 µl PNGase F (10 U) zugegeben und der Reaktionsansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und in einem Immunoblot analysiert.

2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Es wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit 8 %igen, 10 %igen oder 4- 20 %igen SDS-Gelen der Firma Pierce verwendet. Die Proben wurden mit ½ Volumen 3x SDS-Probenpuffer (2. . .) versetzt und 10 min bei 95 °C oder 20 min bei 70 °C (Membranproteine) denaturiert. Standardmäßig wurden 40 µg Gesamtprotein der Rohextrakte eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem HEPES-Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % (w/v) SDS) bei 150 V.

2.6.8 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran von Millipore) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde mit Methanol vorbehandelt. Der Proteintransfer erfolgte mit dem „XCell Blot Module“ 90 min bei 40 V bzw. über Nacht bei 10 V.

Potentielle unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran wurden für 2 h bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C in 5 % Milchpulver in TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper unter leichtem Schütteln in der gleichen Blockierungslösung für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für 15 min bei RT in TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper (1 h, RT). Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der Peroxidase mit Hilfe des Chemilumineszenz-Substrates „SuperSignal[®] West Dura“ (Pierce) laut Herstellerangaben am LAS1000.

2.6.9 Differentielle Zentrifugation

Zur Lokalisierung von Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten wurde eine Fraktionierung von Zellbestandteilen durch differentielle Zentrifugation von Zelllysaten durchgeführt. Dazu wurden Zellen von 50 ml einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,5-0,8$) geerntet (5 min, 3500 Upm) und einmal mit 20 ml dH₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 1,5 ml Sorbitol-Puffer (1M Sorbitol; 50 mM HEPES, pH 7,5) resuspendiert und nach Zugabe von 50 mM DTT 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) wurde einmal mit 1,5 ml Sorbitol-Puffer gewaschen und die Zellen anschließend in 1 ml SCE (1,2 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA pH 7,0) resuspendiert. Zur Sphäroblastierung der Zellen wurde 30 µl Zymolyase (2,5 mg/ml) zugegeben. Nach 30-45 min Inkubation bei 30 °C wurden die Sphäroblasten geerntet (5 min, 3500 Upm) und der Überstand mit der Periplasmafraktion abgenommen. Die Sphäroblasten wurden in 0,5 ml SCE resuspendiert und nach Zugabe von 1 Volumen Glasperlen 5 min bei 4 °C im Vibrax aufgeschlossen. Von dieser Rohextraktfraktion wurde ein Aliquot von 20 µl abgenommen und die Glasperlen anschließend 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte des Überstands, zunächst 10 min bei 10000 Upm und anschließend 60 min bei 40000 Upm in einer Ultrazentrifuge. Als Fraktionen ergaben sich dabei die Pellets aus den beiden Zentrifugationsschritten sowie der letzte Überstand. Alle Fraktionen wurden mit 1/3 Volumen 4x SDS Probenpuffer versetzt, wobei Pellets in 100 µl des Probenpuffers resuspendiert wurden, und bei -20 °C eingefroren. Bei der anschließenden Immunoblotanalyse zum Nachweis des Proteins wurden äquivalente Aliquots jeder Fraktion eingesetzt, in der Regel 1/5 Volumen der Gesamtfraktion.

2.6.10 Bestimmung der Protein-Mannosyltransferase-Aktivität

Die Protein-Mannosyl-Transferase-(Pmt)-Aktivität verschiedener *Candida*-Stämme wurde mit Hilfe eines *in vitro* Enzymtests bestimmt. Die Enzymaktivität wird dabei anhand der Mannosylierungsrate eines künstlichen Akzeptorpeptids gemessen.

2.6.10.1 Präparation der mikrosomalen Membranfraktion

Für die Durchführung des *in vitro* Enzymtests zur Bestimmung der Protein-Mannosyl-Transferase-Aktivität erfolgte zunächst eine Präparation der mikrosomalen Membranfraktion der zu untersuchenden Stämme. Diese Zellfraktion enthält das Endoplasmatische Retikulum, in dessen Membran die Protein-Mannosyl-Transferasen lokalisiert sind. Zellen von 1000 ml einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,5$) wurden geerntet (10 min, 5000 Upm) und zweimal mit 1000 ml kaltem dH_2O gewaschen (10 min, 5000 Upm). Das Zellpellet wurde gewogen, in 2 Volumen Puffer Tris I (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 15 mM $MgCl_2$; 9 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und 2 Pelletvolumen Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch 7-mal 1 min vortexen mit jeweils 1 min Pause auf Eis. Die Glasperlen wurden 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert und anschließend noch zweimal mit 3 ml Tris I gewaschen (2 min, 2000 Upm). Die gesammelten Überstände wurden vereinigt und zur Abtrennung von Zelltrümmern und schweren Zellkompartimenten 15 min bei 5000 Upm zentrifugiert. In einem letzten Zentrifugationsschritt des Überstands von 1 h 20 min bei 26000 Upm erfolgte schließlich die Sedimentierung der leichten Zellkompartimente, der so genannten mikrosomalen Membranfraktion. Nach Entfernung des Überstands wurde das Membranpellet in 350 μ l Puffer Tris II (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 125 mM $MgCl_2$; 25 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert, die Membransuspension mit einem Glashomogenisator homogenisiert und in Aliquots von 50 μ l bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Proteinbestimmung

Für den Einsatz im Protein-Mannosyl-Transferase-Enzymtest musste zuerst die Proteinkonzentration der Membransuspension bestimmt werden. Dies geschah mit Hilfe der Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Es wurde das „Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson’s Modification“ von Sigma verwendet.

2.6.10.2 Synthese des Substrats Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose

Als Substrat wurde für die *in vitro* Pmt-Reaktion radioaktiv markiertes Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose eingesetzt, so dass die Pmt-Aktivität als Mannosylierungsrate des Peptids mit ^{14}C Mannose gemessen werden konnte. Das Substrat musste hierzu zunächst ebenfalls mit Hilfe einer enzymatischen *in vitro* Reaktion synthetisiert werden, in der die Dolicholphosphat-Mannose-Synthase die Synthese von Dolicholphosphat-Mannose aus Dolicholphosphat und GDP-Mannose katalysiert (Abb. 2.1). Es wurde die Dolicholphosphat-Mannose-Synthase Dpm1 aus *S. cerevisiae* verwendet. Hierzu wurde wie unter 2.6.10.1 beschrieben die mikrosomale Membranfraktion des *S. cerevisiae* Wildtypstamms W303 präpariert und als Quelle für die enzymatische Dpm1-Aktivität in die *in vitro* Reaktion eingesetzt. Als Substrate dienten GDP- ^{14}C Mannose (Guanosin-Diphospho-D- ^{14}C mannose-Ammoniumsalz, 302 mCi mmol^{-1} (370 kBq mmol^{-1}); GE Healthcare) und Dolicholphosphat (C_{90} -Dol-P, Sammlung von Polyprenolen des Instituts für Biochemie und Biophysik, Warschau, Polen; von Jacek Orłowski zur Verfügung gestellt). Für die *in vitro* Synthese wurden GDP- ^{14}C Mannose entsprechend 100000 cpm und Dolicholphosphat im Überschuss (getrocknete Substanz nach Verdampfen des Lösungsmittels Chloroform/Methanol, 3:2) in einem 50 μ l Reaktionsansatz mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 sowie 125 mM $MgCl_2$ und 0,125 % Nonidet/NP40 resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der mikrosomalen Membranfraktion entsprechend 500 μ g Gesamtprotein gestartet und 60 min bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 3:2 Chloroform/ Methanol und 500 μ l dH_2O gestoppt und zur Trennung der Phasen

5 min bei 13000 Upm zentrifugiert, wodurch das Produkt Dolicholphosphat-[¹⁴C]Mannose in der hydrophoben Phase vom ebenfalls radioaktiven Substrat GDP-[¹⁴C]Mannose in der wässrigen Phase separiert wurde. Die hydrophobe Phase mit dem Produkt wurde noch einmal durch Zugabe von 500 µl dH₂O und 2 ml 3:2 Chloroform/ Methanol gewaschen (5 min, 13000 Upm) und die wässrige Phase anschließend entfernt. Die Bestimmung der Radioaktivität des Produkts in einem Szintillationszähler zeigte in der Regel eine Ausbeute von ca. 70000 cpm entsprechend einer 70 % igen Effizienz der Inkorporation von [¹⁴C]Mannose in Dolicholphosphat-[¹⁴C]Mannose. Zusätzlich wurde das radioaktive Produkt in einer Dünnschicht-Chromatographie (DC) überprüft. Hierzu wurden 2 µl, 4 µl und 8 µl des radioaktiven Produkts, sowie als Kontrollen je 1 µl der Substrate GDP-[¹⁴C]-Mannose und Dolicholphosphat auf eine Kieselgel-Chromatographieplatte (Merck) aufgetropft und in einem unpolaren Laufmittel für Lipide (Chloroform/ Methanol/ dH₂O, 65:25:4) aufgetrennt. Die Position des radioaktiven Produkts und der GDP-[¹⁴C]-Mannose wurde anschließend durch eine Autoradiographie der Kieselgelplatte auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Das nicht radioaktive Substrat Dolicholphosphat wurde durch Besprühen der Kieselgelplatte mit wässriger Jodlösung angefärbt. Das radioaktive Produkt der Synthese-Reaktion zeigte das gleiche Laufverhalten wie Dolicholphosphat, während GDP-[¹⁴C]-Mannose als hydrophiler Zucker keine Wanderung unter den gewählten Bedingungen zeigte (Abb. 2.2). Das entstandene Produkt konnte somit als Dolicholphosphat-[¹⁴C]-Mannose bestätigt und in den *in vitro*-Pmt Enzymtest eingesetzt werden.

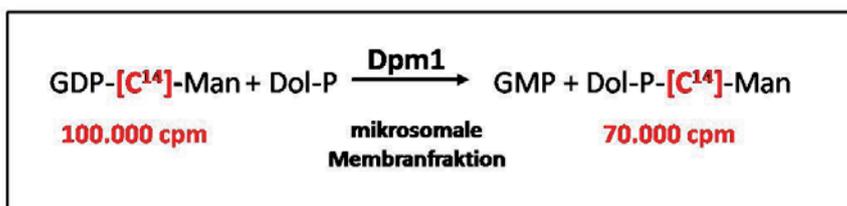
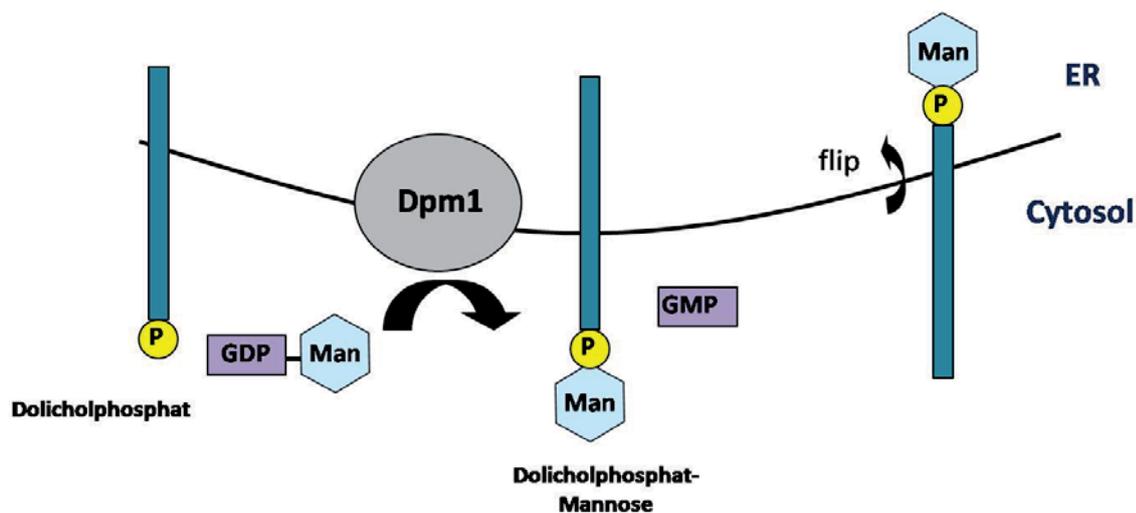


Abb. 2.1: Synthese von Dolicholphosphat-[¹⁴C]-Mannose als Substrat für den Pmt *in vitro*-Enzymtest. Schematische Reaktion der Dolicholphosphat-Mannose-Synthese (Dpm1). In der *in vitro*-Synthese katalysiert Dpm1 der eingesetzten mikrosomalen Membranfraktion die Synthese von Dolicholphosphat-[¹⁴C]Mannose aus GDP-[¹⁴C]Mannose und Dolicholphosphat.

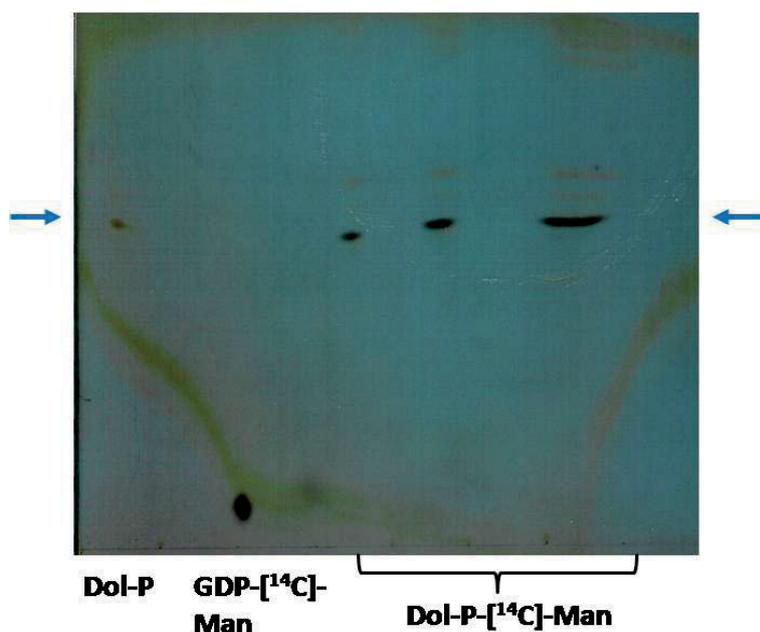


Abb. 2.2:
Dünnschichtchromatographie
und anschließende
Autoradiographie des
radioaktiven Produkts.
 Dol-P, Dolicholphosphat-Mannose;
 GDP- ^{14}C -Man, GDP- ^{14}C -
 Mannose; Dol-P- ^{14}C -Man,
 Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose.
 Es wurde jeweils 1 µl aufgetragen,
 bzw. 2 µl, 4 µl und 8 µl des
 Produkts.

2.6.10.3 Bestimmung der Mannosylierungsaktivität

Für die Messung der Protein-Mannosyltransferase-Aktivität wurde im *in-vitro* Enzymtest ein künstliches Peptid eingesetzt, das durch die Protein-Mannosyltransferase anstelle des Zielproteins mannosyliert wird. Es wurde ein Peptid der Sequenz Ac-DYATAV-NH₂ (JPT) verwendet, dessen Sequenz von Weston *et al.* (1993) für die spezifische Mannosylierung durch Pmt1 optimiert wurde und durch die terminalen Schutzgruppen eine relative Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau aufweist. Das lyophilisierte Peptid wurde in DMSO zu einer 50 mM Lösung resuspendiert.

Für den Pmt *in-vitro* Enzymtest wurde Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose (gelöst in 3:2 Chloroform/ Methanol; vgl. Abschnitt 2.6.10.2) entsprechend 15000 cpm mit 250 µg Phosphatidylcholin (10 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin aus Rinderhirn in Chloroform, Sigma) gemischt und heruntergetrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Pellet in 5 µl 20 % igem Triton X 100 resuspendiert und 5 min in einem Ultraschallwasserbad sonifiziert. Durch die Ultraschallbehandlung bildet das Lipid Phosphatidylcholin kleine Membranvesikel, in die das hydrophobe Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose eingelagert wird. Dieser Prozess erleichtert die Zugänglichkeit des Substrats für das ebenfalls membrangebundene Pmt-Enzym. Für den Reaktionsansatz wurden nun 5 µl des Peptids (50 mM), 10 µl 0,2 M Bicine (pH 7,7) sowie 5 µl dH₂O zugegeben. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 25 µl der auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml verdünnten mikrosomalen Membranen gestartet und 20 min bei 25 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl dH₂O sowie 1 ml 3:2 Chloroform/ Methanol gestoppt und zur Trennung der Phasen 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, das mannosylierte Peptid, ist aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften in der wässrigen Phase gelöst und somit gut von dem hydrophoben Substrat Dolicholphosphat- ^{14}C Mannose separierbar. Zur Ermittlung der Pmt-Aktivität wurde daher die wässrige Phase abgenommen und die Radioaktivität mit Hilfe des Szintillationszählers gemessen. Zur Ermittlung der Hintergrundaktivität wurde eine identische Reaktion, jedoch ohne Akzeptorpeptid gemessen. Die absolute Pmt-Aktivität wurde folgendermaßen ermittelt:

Pmt-Aktivität [cpm] = cpm (wässrige Phase) – cpm (wässrige Phase ohne Peptid)

Für jeden untersuchten Stamm wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, die noch einmal mit einer unabhängigen zweiten Membranpräparation wiederholt wurde.

2.6.11 Aufreinigung von *CaDom34* aus *E. coli*

Die heterologe Produktion in *E. coli* und anschließende Aufreinigung des *C. albicans* Dom34-Proteins erfolgte in Anlehnung an die von Lee *et al.* (2007) für die Aufreinigung des *S. cerevisiae* Dom34-Proteins aus *E. coli* beschriebene Methode. Für die heterologe Produktion des Dom34-Proteins wurde der *E. coli* Standard-Expressionsstamm BL21 mit dem Expressionsvektor pET22b-Dom34 transformiert, der ein Dom34-Fusionsprotein mit einem C-terminalen Deca-Histidin-Epitop unter der Kontrolle des T7-Promotors produziert. Eine 1000 ml Kultur des frisch transformierten Stamms in LB+Ampicillin-Medium (50 µg/ml) mit 1 % Glukose wurde bis zum Erreichen der exponentiellen Phase bei 37 °C inkubiert und die Proteinproduktion bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 1 mM IPTG (100 mM Lösung in 70 % EtOH) induziert. Nach der Induktion wurde die Kultur zur Vermeidung einer Aggregatbildung des überproduzierten Proteins bei einer erniedrigten Temperatur von 20 °C für weitere 24 h inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 Upm. Das Zellpellet wurde in 20 ml Lysis-Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,9; 500 mM NaCl; 10 % Glycerin) mit 20 mM Imidazol resuspendiert und die Zellen anschließend durch die zweimalige Passage der Suspension in einer French-Press lysiert. Das Lysat wurde abzentrifugiert (20 min, 10000 Upm) und bei sichtbaren Trübungen zusätzlich durch einen Papier-Faltenfilter filtriert. Die Reinigung des mit einem zehnfachen Histidin-Epitop fusionierten Dom34-Proteins aus dem *E. coli*-Lysat erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine NiNTA-Matrix mit Hilfe des ÄKTAprime plus nach Herstellerangaben. Zur Elution des Proteins wurde Puffer A mit 500 mM Imidazol verwendet. Die Elutions-Fractionen, für die ein Peak der UV-Absorption eluierte Proteine anzeigte, wurden anschließend in einer SDS-PAGE auf die Größe des eluierten Proteins untersucht. Dazu wurden 20 µl der betreffenden Elutionsfraktionen in einem Gradientengel von 4-20 % aufgetrennt und die Proteinbanden durch eine Coomassie-Färbung (Fertiglösung von Bio-Rad; Biosafe Coomassie, Coomassie Blue G250 Stain, nach Herstellerangaben verwendet) visualisiert. Bei der richtigen Größe des eluierten Proteins wurde die Proteinbande aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Identität des gereinigten Proteins zusätzlich durch eine massenspektrometrische Analyse überprüft.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Immunfluoreszenz

2.7.1.1 Fixieren von Zellen

Zellen einer exponentiellen Kultur (OD₆₀₀= 0,5- 0,8) wurden 30- 90 min mit 4 % Formaldehyd bei 30 °C auf dem Schüttler fixiert. 5 ml der Kultur wurden geerntet (5 min, 3500 Upm) und einmal in 5 ml S-Puffer (50 mM HEPES; 1,2 M Sorbitol; pH 7,5) gewaschen (5 min, 3500 Upm). Die Zellen wurden in 1 ml S-Puffer resuspendiert und konnten so bis zu einer Woche bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert werden.

2.7.1.2 Herstellen der Präparate

Für eine Immunfluoreszenz der Zellen mussten diese zunächst sphäroplastiert werden. Dazu wurden Zymolyase T100 (2,5 mg/ml, 40 µl für 1 ml Zellsuspension eingesetzt) und - Glucuronidase (30 µl) sowie 10 mM DTT (10 µl 1M DTT) zugegeben und die fixierten Zellen 45 min bei 30 °C inkubiert. Nach diesem Schritt mussten die Sphäroplasten sehr vorsichtig behandelt werden. Nach der Sphäroplastierung wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 5000 Upm), in 1 ml S-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und 5 min bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 Upm) und in 200 µl S-Puffer aufgenommen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie der Zellen wurden Poly-Lysin beschichtete Objektträger verwendet. Dazu wurde in jedes Well eines 10-Well-Objektträgers 15 µl einer 0,1 %igen Poly-Lysinlösung gegeben und 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und nach dem Trocknen die Poly-Lysinschicht dreimal mit dH₂O gewaschen.

Zur Fixierung der Zellen auf der Poly-Lysin-Matrix wurden 20 µl der Zellsuspension aufgetropft und 5 min inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden viermal durch tropfenweise Zugabe von PBS und anschließendes Neigen des Objektträgers gewaschen und mussten dabei stets von Puffer benetzt bleiben. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte durch 15 minütige Inkubation der Zellen mit 2 % Milchpulver in PBS.

Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit 40 µl des primären Antikörpers (Anti-HA aus der Ratte, siehe Tab. 2.6), 1:100 in der Blockierungslösung verdünnt, inkubiert. Der sekundäre, Fluorophor-gekoppelte Antikörper (Anti-Ratte, FITC-konjugiert, siehe Tab. 2.7) wurde nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS für 90 min, 1:100 verdünnt in 0,2 % Milchpulver/PBS, in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert.

Zur Fluoreszenzfärbung des Kerns wurde nach dem Waschen mit PBS 20 µl DAPI (1 µg/ml) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Flüssigkeit gründlich entfernt und Anti-Fade (Pro-Long Gold Anti-Fade von Sigma) in die Wells gegeben, das laut Herstellerangaben aushärten gelassen wurde. Vor der Mikroskopie des Präparats wurde das Deckglas vollständig luftdicht mit Nagellack versiegelt und konnte so auch längere Zeit im Dunkeln aufbewahrt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung der *dom34*- und *pmt1 dom34*-Mutanten

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Dom34 in *S. cerevisiae* eine Rolle bei der *O*-Glykosylierung spielt (Finck *et al.*, 1996). So wiesen verschiedene Proteine wie α -Agglutinin, Chitinase oder hIGF-1 (human Insulin-like Growth Factor 1) eine reduzierte *O*-Glykosylierung in einer *dom34*-Mutante auf. Zudem konnte ein synthetischer Phänotyp von *DOM34* und *PMT1* in einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante beobachtet werden (Wickert, 1998). In ersten Untersuchungen in *C. albicans* konnte von Kluge (2006) jedoch kein Phänotyp einer Deletionsmutante von *DOM34* nachgewiesen werden, der eine Beteiligung von Dom34 an der *O*-Glykosylierung in diesem Organismus belegen würde, wie Hypersensitivitäten gegenüber verschiedenen Substanzen oder ein direkter *O*-Glykosylierungs-Defekt einzelner glykosylierter Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine weitere Charakterisierung des *DOM34*-Gens in *C. albicans* erfolgen. Dabei sollte im Speziellen aufgeklärt werden, ob *DOM34* parallel wie aus *S. cerevisiae* bekannt auch in *C. albicans* an der *O*-Glykosylierung beteiligt ist, obwohl die *Cadom34*-Mutante keinen vergleichbaren Phänotyp zeigte. Insbesondere sollte deshalb in verschiedenen genetischen Untersuchungen eine mögliche Beziehung zwischen *DOM34* und dem Gen der Protein-*O*-Mannosyltransferase *PMT1* untersucht werden, wie sie in *S. cerevisiae* als weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Dom34 an der *O*-Glykosylierung beobachtet werden konnte (Wickert, 1998). Unter diesem Aspekt sollte in einem ersten Schritt die phänotypische Charakterisierung einer Doppelmutante von *DOM34* und *PMT1* im Vergleich mit den entsprechenden *dom34*- und *pmt1*-Einzelmутanten erfolgen.

3.1.1 Konstruktion der *dom34*- und *dom34 pmt1*-Mutanten

In der Arbeit von Kluge (2006) wurde bereits eine *dom34 pmt1*-Doppeldelentionsmutante (SK53) konstruiert und verschiedene Untersuchungen mit diesem Stamm durchgeführt. In den ersten Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich jedoch eine offenbar unvollständige Disruption beider Allele des *PMT1*-Gens in diesem Stamm, da in quantitativen RT-PCR Analysen noch das *PMT1*-Transkript nachweisbar war. Aus diesem Grund erfolgte zunächst die Konstruktion eines neuen *dom34 pmt1*-Doppeldelentionsstamms. Von Kluge wurden neben der Mutante SK53 noch weitere Stämme mit Deletionen des *DOM34*- und *PMT1*-Gens konstruiert, darunter der Stamm SK24 (*pmt1* Δ ::*hisG*/*pmt1* Δ ::*hisG dom34* Δ ::*FRT*/*dom34* Δ ::*FRT* $\Delta ura3$::*imm434*/ Δ *ura3*::*imm434*). Für SK24 wurde die erfolgreiche vollständige Disruption beider Allele des *DOM34*- bzw. *PMT1*-Gens in einer quantitativen RT-PCR Analyse bestätigt, so dass dieser Stamm als Ausgangspunkt für die Analyse der *dom34 pmt1*-Doppelmutante dienen konnte (vgl. Abb. 3.10; gezeigt ist der *URA3*-rekonstituierte Stamm JH24-4). Für die phänotypische Charakterisierung der Mutanten sollte eine Rekonstituierung des *URA3*-Gens am eigenen Genlocus erfolgen, um Phänotypeffekte auszuschließen, die durch Positionseffekte der Expression des *URA3*-Gens am Integrationsort entstehen können (Cheng *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1998). Die Rekonstituierung des *URA3*-Gens erfolgte nach der von Prill (2004) beschriebenen Methode. Dazu wurde aus dem Plasmid HB5 (Losberger und Ernst, 1989) ein 4,3 kb großes *Pst*I- und *Xho*I-Fragment isoliert, das den genomischen *URA3*-Lokus enthält. Der Stamm SK24 wurde mit dem Fragment transformiert und anschließend auf SD-Minimalmedium selektiert. Die erhaltenen Transformanten wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden i-p2-*URA3*ver und p3-*URA3*ver auf eine korrekte Integration am *URA3*-Genlocus überprüft. Da in dieser Arbeit

auch die *dom34*-Mutante noch einmal parallel zu der *dom34 pmt1*-Doppelmutante in den gleichen Versuchsreihen untersucht werden sollte, erfolgte auch für die von Kluge konstruierte *dom34*-Mutante SK47 (*dom34Δ::FRT/dom34Δ::FRT Δura3::imm434/Δura3::imm434*) eine Rekonstituierung des *URA3*-Gens nach der beschriebenen Methode. Für die folgende Phänotypisierung der Mutanten wurden jeweils zwei unabhängige der *URA3*-rekonstituierten Stämme verwendet. Die *URA3*-rekonstituierten Stämme der *dom34*-Mutante SK47 wurden JH47-1 und JH47-2 genannt (beide *dom34Δ::FRT/dom34Δ::FRT ura3Δ::imm434/URA3*), die *URA3*-rekonstituierten Stämme der *pmt1 dom34*-Mutante SK24 wurden JH24-4 und JH24-5 genannt (beide *pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG dom34Δ::FRT/dom34Δ::FRT ura3Δ::imm434/URA3*).

3.1.2 Sensitivitäten der Mutanten

In einer vergleichenden Analyse der Phänotypen von *pmt1*-Mutante, *dom34*-Mutante und *pmt1 dom34*-Doppelmutante sollte nun eine potentielle genetische Interaktion zwischen den beiden Genen untersucht werden, wie sie in *S. cerevisiae* in Form eines synthetischen Phänotyps der *pmt1 dom34*-Doppelmutante nachgewiesen wurde.

3.1.2.1 Sensitivität gegen Hygromycin B

Der Phänotyp einer *pmt1*-Mutante umfasst unter anderem Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Substanzen wie Aminoglykosiden und verschiedenen Zellwand destabilisierenden Agenzien sowie eine Temperatursensitivität (Timpel *et al.*, 1998; Prill 2004). Aus bisher unbekanntem Gründen zeigen viele Glykosylierungsmutanten eine solche Sensitivität gegen Aminoglykoside wie Hygromycin B. Diese zu den Antibiotika gehörende Stoffgruppe wirkt inhibierend auf die Proteinbiosynthese am Ribosom. So induziert Hygromycin B Fehler in der Proteinbiosynthese durch Bindung der kleinen Ribosomenuntereinheit (Brodersen *et al.*, 2000). Daher sollten die *dom34*- und *pmt1 dom34*-Mutante gezielt auf eine solche, typischerweise bei Glykosylierungsmutanten beobachtete Sensitivität hin untersucht werden. Wie in Abb. 3.1 zu erkennen ist, zeigte die *pmt1*-Mutante die bekannte Hypersensitivität gegen Hygromycin B.

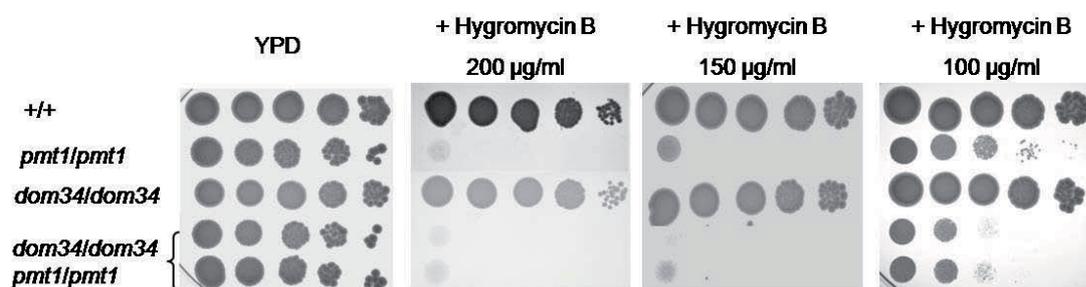


Abb. 3.1: Hygromycin B-Sensitivität der *dom34*- und *pmt1*-Mutanten.

Aus Übernachtskulturen der Stämme CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), JH47-1 (*dom34/dom34*), JH24-4 (*pmt1/pmt1 dom34/dom34*) und JH24-5 (*pmt1/pmt1 dom34/dom34*) wurden jeweils Verdünnungsreihen von 10^5 bis 10 Zellen hergestellt und jede Verdünnung in einem Volumen von 5 µl auf YPD und YPD mit unterschiedlichen Konzentrationen Hygromycin B getropft. Die Kolonien wurden 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Bei einer Konzentration von 200 µg/ml Hygromycin B wuchs die *pmt1*-Mutante nicht mehr. Für die *dom34*-Mutante konnte dagegen bei keiner der getesteten Konzentrationen eine erhöhte Sensitivität gegen das Aminoglykosid beobachtet werden. Die *pmt1 dom34*-Doppelmutante zeigte ebenfalls eine so starke Sensitivität gegenüber Hygromycin B, dass sie bei einer Konzentration von 200 µg/ml wie die *pmt1*-Mutante nicht mehr wachsen konnte. Aus diesem Grund blieb bei dieser hohen Konzentration eine mögliche Verstärkung des *pmt1*-Phänotyps durch die zusätzlich eingeführte Deletion des *DOM34*-Gens unsichtbar und musste in einem anderen Konzentrationsbereich betrachtet werden. Bei einer geringeren Konzentration von 100 µg/ml Hygromycin B war die *pmt1 dom34*-Doppelmutante deutlich sensibler als die nur mäßig sensitive *pmt1*-Mutante. Diese verstärkte Sensitivität der Doppelmutante im Vergleich zur *pmt1*-Mutante war auch bei 150 µg/ml Hygromycin B zu beobachten. Bezüglich einer Hygromycin B-Sensitivität zeigen *PMT1* und *DOM34* daher einen synthetischen Phänotyp.

3.1.2.2 Temperatursensitivität und Sensitivität gegen SDS

Die *pmt1*-Mutante ist sensitiv gegenüber einer erhöhten Wachstumstemperatur und kann bei 42 °C nicht mehr wachsen (Timpel *et al.*, 1998). Auch die Zugabe von SDS im Medium wirkt inhibierend auf das Wachstum der Mutante (Prill, 2004). Es sollte daher untersucht werden, ob der beobachtete synthetische Effekt von *DOM34* und *PMT1*-Deletionen auch im Bezug auf diese weiteren Merkmale des *pmt1*-Phänotyps auftritt. Es war jedoch nicht möglich, eine Verstärkung des *pmt1*-Phänotyps in der *pmt1 dom34*-Doppelmutante nachzuweisen, da schon die *pmt1*-Mutante selbst keinerlei Wachstum bei den getesteten erhöhten Wachstumstemperaturen zeigte.

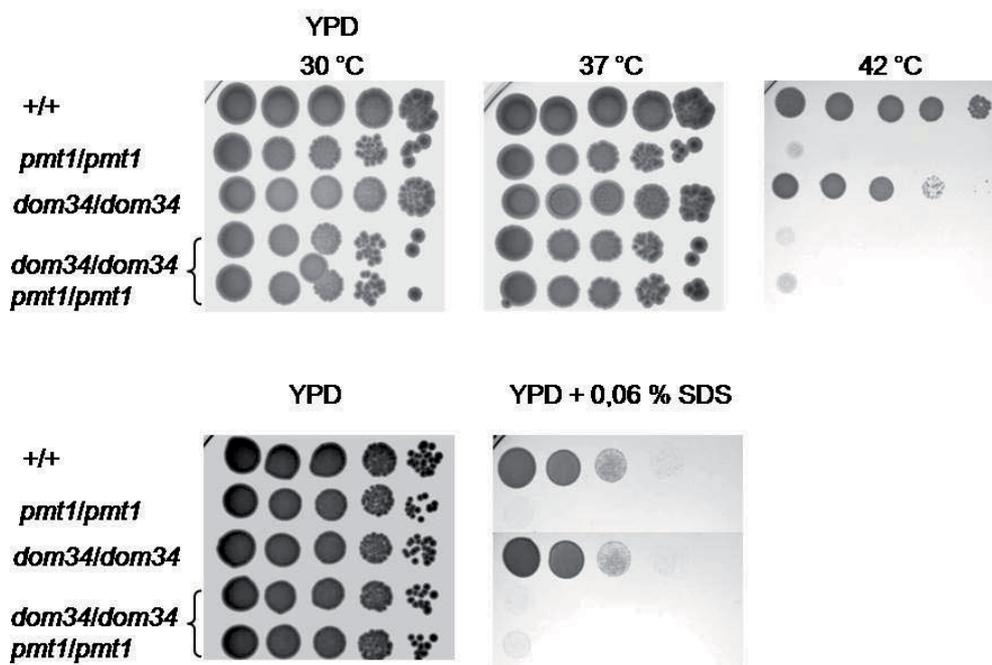


Abb. 3.2: Temperatur-Sensitivität und SDS-Sensitivität der *dom34*- und *pmt1*-Mutanten.

Die Verdünnungen der Stämme wurden wie oben beschrieben auf YPD oder YPD mit SDS getropft und 1-2 Tage bei 30 °C (SDS-Sensitivität) bzw. 37 °C und 42 °C inkubiert (Temperatursensitivität).

So waren sowohl die *pmt1 dom34*-Doppelmutante als auch die *pmt1*-Mutante so stark sensitiv gegen eine erhöhte Wachstumstemperatur von 42 °C (Abb. 3.2), 41 °C und 40 °C (Daten nicht gezeigt), dass sie nicht mehr wachsen konnten. Bei niedrigeren Wachstumstemperaturen von 37 °C (Abb. 3.2) und 39 °C (Daten nicht gezeigt) zeigten dagegen beide Mutanten keine Wachstumsdefekte. Auch für das Wachstum auf SDS konnte kein synthetischer Effekt der *DOM34* und *PMT1* Mutation in der Doppelmutante beobachtet werden, da die *pmt1*-Mutante selbst bereits bei einer Konzentration von 0,06 % SDS kein Wachstum zeigte (Abb. 3.2). Für die *dom34*-Mutante wurde von Kluge (2006) als einziger Phänotyp ein Wachstumsdefekt bei 42 °C beschrieben. Für die hier getesteten *URA3*-rekonstituierten *dom34*-Mutanten konnte jedoch weder gegen eine erhöhte Wachstumstemperatur noch gegen SDS eine Sensitivität bestätigt werden (Abb. 3.2). Es konnte somit kein Phänotyp für eine alleinige Deletion des *DOM34*-Gens beobachtet werden.

3.2 Überexpression von *DOM34* in der *pmt1*-Mutante

In den vorausgegangenen Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine genetische Interaktion zwischen dem *DOM34*- und dem *PMT1*-Gen, da eine Doppelmutante beider Gene einen synthetischen Phänotyp bezüglich einer Hygromycin B-Sensitivität zeigte. Um eine vermutete Interaktion beider Gene weiter zu bestätigen, sollte untersucht werden, ob es ebenfalls möglich ist, den *pmt1*-Phänotyp durch eine Überexpression von *DOM34* zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurde *DOM34* in der *pmt1*-Mutante von Plasmid pSK2 unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors überexprimiert. Die Genexpression ist bei diesem Promotor durch Methionin und Cystein reprimiert. Als Negativkontrolle wurde die *pmt1*-Mutante mit dem entsprechenden Leervektor pSP38 transformiert. Alternativ erfolgte die *DOM34*-Überexpression mit Hilfe des Plasmids pJB34 unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors, der durch Glucose reprimiert wird. Als Negativkontrolle dienten Stämme mit dem Leervektor pBI-1. Die Überexpression des *DOM34*-Gens wurde für alle verwendeten Stämme mit Hilfe der quantitativen RT-PCR überprüft und betrug etwa das Drei- bis Vierfache des Expressionsniveaus von *DOM34* im Wildtyp (vgl. Abschnitt 3.5, Abb 3.11).

3.2.1 Sensitivitäten der Mutanten

3.2.1.1 Sensitivität gegen Hygromycin B

Die Stämme wurden zunächst wieder auf ihre Sensitivität gegenüber Hygromycin B untersucht. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von *DOM34* zu einer deutlich verringerten Sensitivität der *pmt1*-Mutante führt (Abb. 3.3, Überexpression von Plasmid pSK2). Dieser Effekt wurde bei beiden unabhängigen Transformanten beobachtet, wohingegen Transformanten mit dem Leervektor diese Auswirkungen nicht zeigten. Entgegen der Erwartungen fand eine Überexpression von *DOM34* auch auf YPD-Medium statt, das den *MET3*-Promotor durch seinen Gehalt an Methionin und Cystein reprimieren sollte. Die schwache Repression des *MET3*-Promotors wurde jedoch auch schon von Prill (2004) für eine Expression von *PMT2* beschrieben.

3.2.1.2 Temperatursensitivität

Bei der ebenfalls untersuchten Temperatursensitivität der *pmt1*-Mutante war der Effekt einer *DOM34*-Überexpression noch deutlicher zu beobachten. Die *pmt1*-Mutante zeigt eine wesentlich verringerte Sensitivität gegenüber einer Wachstumstemperatur von 42 °C, wenn *DOM34* überexprimiert wird (Abb. 3.2, Überexpression von Plasmid pSK2). Dieser Befund

konnte außerdem durch die Überexpression des *DOM34*-Gens vom alternativen Plasmid pJB34 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.3 Sensitivität gegen SDS

Es wurde wiederum auch das Wachstum der *pmt1*-Mutante auf Medium mit SDS untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss einer *DOM34*-Überexpression auf den SDS-Phänotyp der Mutante gezeigt werden.

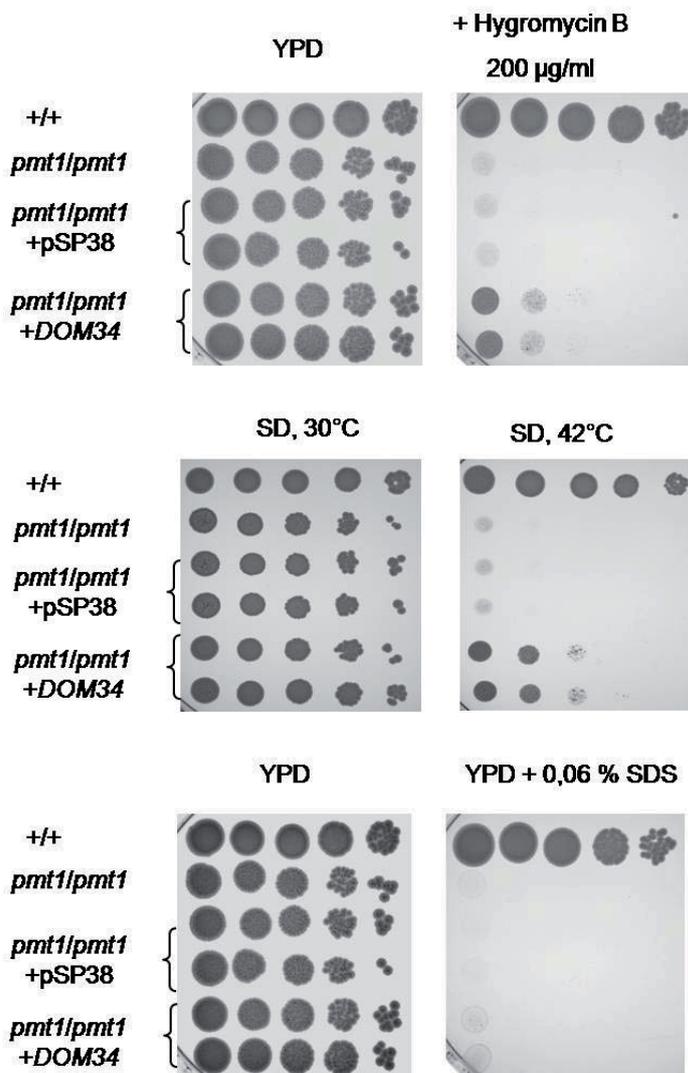


Abb. 3.3: Einfluss der Überexpression von *DOM34* auf die Sensitivitäten der *pmt1*-Mutante.

Je zwei Transformanten der *pmt1*-Mutante mit *DOM34*-Überexpressionsvektor (CAP1-3121 + pSK2) und dem Leervektor (CAP1-3121 + pSP38) wurden bezüglich ihrer Hygromycin B-Sensitivität, Temperatur-Sensitivität und ihrer SDS-Sensitivität miteinander verglichen. Die Verdünnungen der verschiedenen Stämme wurden wie oben beschrieben auf die angegebenen Medien getropft.

3.2.2 Hyphenbildung

Verschiedene äußere Stimuli wie die Anwesenheit von *N*-Acetylglukosamin, Serum oder eine Umgebungstemperatur von 37 °C induzieren bei *C. albicans* die Bildung von Hyphen. Es konnte gezeigt werden, dass die *pmt1*-Mutante nicht mehr in der Lage ist Hyphen auszubilden (Timpel *et al.*, 1998). Da eine *DOM34*-Überexpression verschiedene Sensitivitäts-Phänotypen der *pmt1*-Mutante supprimieren konnte, sollte untersucht werden ob ebenfalls eine Suppression des Hyphenwachstum-Phänotyps durch die Überexpression von *DOM34* stattfindet. Dazu wurde die Hyphenbildung der verschiedenen Stämme auf „Spider“-Medium bzw. Serum getestet. Es zeigte sich, dass die *pmt1*-Mutante bei einer Überexpression von *DOM34* einzelne Hyphen ausbildet. Dieser Einfluss konnte besonders deutlich bei einer Hypheninduktion auf Spider-Medium, aber auch bei Serum gezeigt werden (Abb. 3.4).

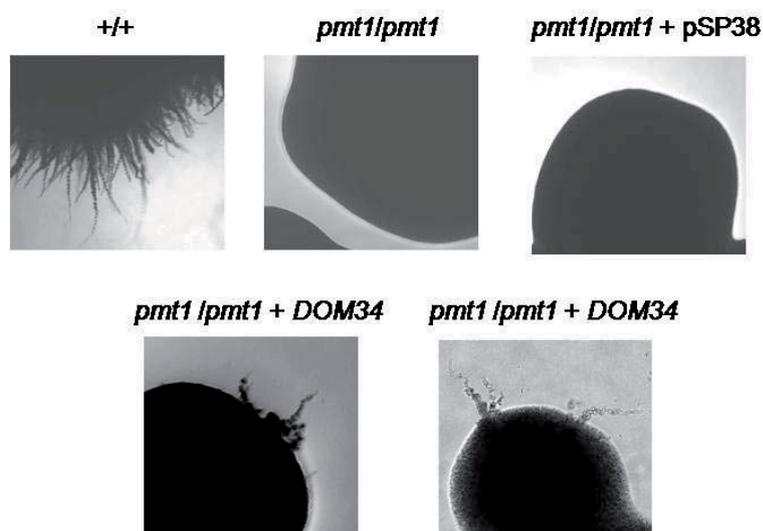


Abb. 3.4: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf das Hyphenwachstum der *pmt1*-Mutante. Die Hyphenbildung auf Spider-Medium der verschiedenen Stämme wurde nach 2-5 Tagen Inkubation bei 37 °C mikroskopiert.

3.2.3 O-Glykosylierung von Pmt1-Substraten

Wie in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, werden verschiedene Phänotypen einer *pmt1*-Mutante wie Sensitivitäten und defekte Hyphenbildung durch eine Überexpression von *DOM34* supprimiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine genetische Interaktion zwischen *PMT1* und *DOM34* vorliegt und *DOM34* offensichtlich eine Rolle bei der *O*-Glykosylierung spielt. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob sich ein direkter Einfluss von *DOM34* auf die *O*-Glykosylierung von Proteinen nachweisen lässt. In früheren Arbeiten konnten einige Zielproteine von Pmt1 identifiziert werden. So zeigen beispielsweise die Proteine Als1, Pir1 und Kre9 eine veränderte *O*-Glykosylierung in einer *pmt1*-Mutante (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2004; Prill, 2000). Es sollte daher überprüft werden, ob eine Überexpression von *DOM34* auch einen direkten Einfluss auf den Phänotyp einer reduzierten *O*-Glykosylierung dieser Zielproteine in einer *pmt1*-Mutante hat.

3.2.3.1 Als1

Als1 (*orf6.1115*) ist ein Zellwandprotein der Als-Proteinfamilie, die mindestens acht Mitglieder umfasst (Sheppard *et al.*, 2004). Mit einer Größe von 1260 Aminosäuren hat es eine theoretische molekulare Masse von 133 kDa. In Immunoblot-Analysen mit einem Als1-Antiserum wird es jedoch bei einer molekularen Masse von über 250 kDa detektiert (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2004). Eine kleinere Form des Proteins läuft bei einer molekularen Masse von etwa 155 kDa. In der *pmt1*-Mutante läuft die große Form des Proteins niedriger als im Wildtyp (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2004). Es wurden Zellextrakte einer *DOM34*-Überexpression in der *pmt1*-Mutante im Vergleich mit dem Leervektor und dem Wildtyp untersucht. Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, zeigt Als1 in der *pmt1*-Mutante das erwartete, vom Wildtyp abweichende Laufverhalten, es ist jedoch kein Unterschied zwischen dem Leervektor und der Überexpression von *DOM34* zu erkennen. Das Laufverhalten von Als1 in der *pmt1*-Mutante wird daher nicht von *DOM34* beeinflusst.

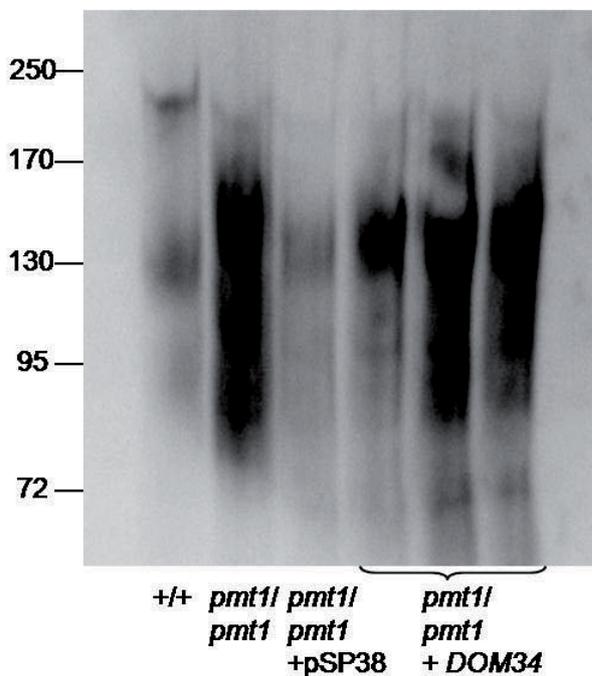


Abb. 3.5: Immunoblotanalyse des Pmt1-Substrats Als1 bei *DOM4*-Überexpression.

Zur Analyse des Laufverhaltens von Als1 in der *pmt1*-Mutante mit und ohne *DOM34*-Überexpression wurden die Rohextrakte der Stämme CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), sowie CAP1-3121 (*pmt1/pmt1*), transformiert mit dem *DOM34*-Überexpressionsvektor bzw. dem Leervektor (pSP38), in einer 8 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein mit einem Anti-Als1 Serum detektiert.

3.2.3.2 Pir1

Pir1 ist ebenfalls ein Zellwandprotein, das kovalent an β 1,3-Glukan gebunden ist und in zwei Allelen vorkommt (*orf19.220* und *orf19.7851*). Es ist homolog zu Pir2 aus *S. cerevisiae* und repräsentiert das einzige Mitglied der Pir-Protein Familie in *C. albicans*. Das Protein besteht aus 346 Aminosäuren und hat eine theoretische molekulare Masse von 36,5 kDa. Mit einem Anti-Serum gegen ScPir2 konnten mehrere Formen des Proteins nachgewiesen werden, von denen die größte bei 250 kDa läuft, und zwei weitere bei etwa 90 kDa und 65 kDa (Prill, 2004). In der *pmt1*-Mutante konnte anstelle distinkter Banden dagegen nur ein Proteinschmier zwischen 55 kDa und 80 kDa detektiert werden. Das verwendete Anti-Serum gegen ScPir2 erkennt jedoch nicht spezifisch ScPir2 bzw. CaPir1, sondern eine Reihe verschiedener mit ScPir2 verwandte Proteine (Russo *et al.*, 1992; Kandasamy *et al.*, 2000). In dieser Arbeit

wurde ein Anti-Serum gegen *CaPir1* eingesetzt, das in einem Immunoblot spezifisch das *CaPir1* Protein erkennt (Eulogio Valentin, persönliche Mitteilung). Mit diesem Serum ergibt sich ein abweichendes Bandenmuster des Proteins. Sowohl im Wildtyp als auch in den verschiedenen *pmt1*-Stämmen wird Pir1 als Schmier zwischen 150 kDa und weit über 250 kDa detektiert (Abb. 3.6).

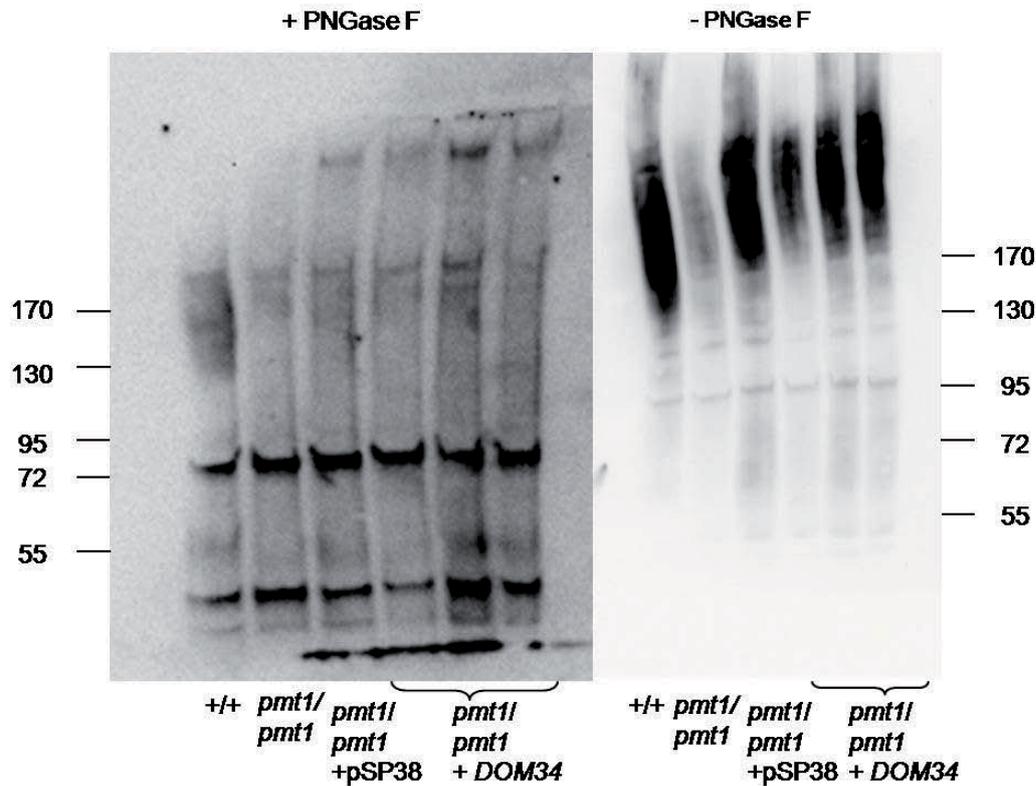


Abb. 3.6: Immunoblotanalyse des Pmt1-Substrats Pir1 bei *DOM34*-Überexpression.
 Rohextrakte der Stämme wurden jeweils zur Entfernung der *N*-Glykosylierung mit PNGaseF behandelt und unbehandelt in einer 8 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein mit einem Anti-Pir1 Antiserum detektiert.

Um die *N*-Glykosylierung des Proteins zu beseitigen wurde eine PNGaseF-Behandlung der Rohextrakte durchgeführt. Nach Entfernung der *N*-Glykosylketten kann das Protein in allen Stämmen in Form mehrerer diffuser Banden im Bereich zwischen 150 kDa und 200 kDa und zweier intensiver, scharf abgegrenzter Einzelbanden auf einer Laufhöhe von 80 kDa und etwa 40 kDa nachgewiesen werden. Diese Banden entsprechen vermutlich verschiedenen *O*-Glykosylierungsformen von Pir1. Es kann jedoch kein Unterschied im Laufverhalten des Proteins zwischen dem Wildtyp und der *pmt1*-Mutante nachgewiesen werden, wie sie von Prill unter Verwendung des ScPir2 Anti-Serums beobachtet wurde. Ein *O*-Glykosylierungsdefekt von Pir1 in der *pmt1*-Mutante kann somit nicht bestätigt werden.

3.2.3.3 Kre9

Kre9 (*orf19.5861*) ist ein sekretiertes Protein, das an der Synthese des β 1,6-Glukans beteiligt ist. Für ein Kre9^{Flag} Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass es in der *pmt1*-Mutante ein

beschleunigtes Laufverhalten im Vergleich zum Wildtyp zeigt (Prill, 2000). Das Kre9^{Flag} Fusionsprotein wurde dazu unter der Kontrolle des *ACT1*-Promotors von Plasmid pSP9 exprimiert. Um die Auswirkungen einer *DOM34*-Überexpression auf den *O*-Glykosylierungsdefekt von Kre9 in der *pmt1*-Mutante untersuchen zu können, mussten die Gene beider Plasmide, dem *KRE9-FLAG* Plasmid pSP9 und dem *DOM34*-Überexpressionsvektor, im gleichen Stamm exprimiert werden. Da beide Plasmide *URA3* als Selektionsmarker tragen und daher nicht gleichzeitig in die *pmt1*-Mutante transformiert werden konnten, sollte ein Plasmid konstruiert werden, das beide Gene exprimiert. Dazu wurde ein Fragment aus *KRE9-FLAG* und dem Aktinpromotor aus pSP9 mit *SmaI* ausgeschnitten und das Plasmid pJB34, das *DOM34* unter der Kontrolle des *PCK*-Promotors exprimiert (vgl. Abschnitt 3.2), mit *EcoRV* linearisiert. Die kohäsiven Enden wurden aufgefüllt und das Fragment mit dem Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid zur gleichzeitigen Expression von *KRE9-FLAG* und *DOM34* wurde pJB34-AKF genannt. Zum Vergleich des Laufverhaltens von Kre9^{Flag} in der *pmt1*-Mutante mit und ohne *DOM34*-Überexpression wurde der *pmt1*Δ-Stamm CAP1-3121 mit den Plasmiden pJB34-AKF bzw. pSP9 transformiert. Zum Vergleich des Laufverhaltens von Kre9^{Flag} im Wildtyp wurde außerdem der Stamm CAI4 mit Plasmid pSP9 transformiert.

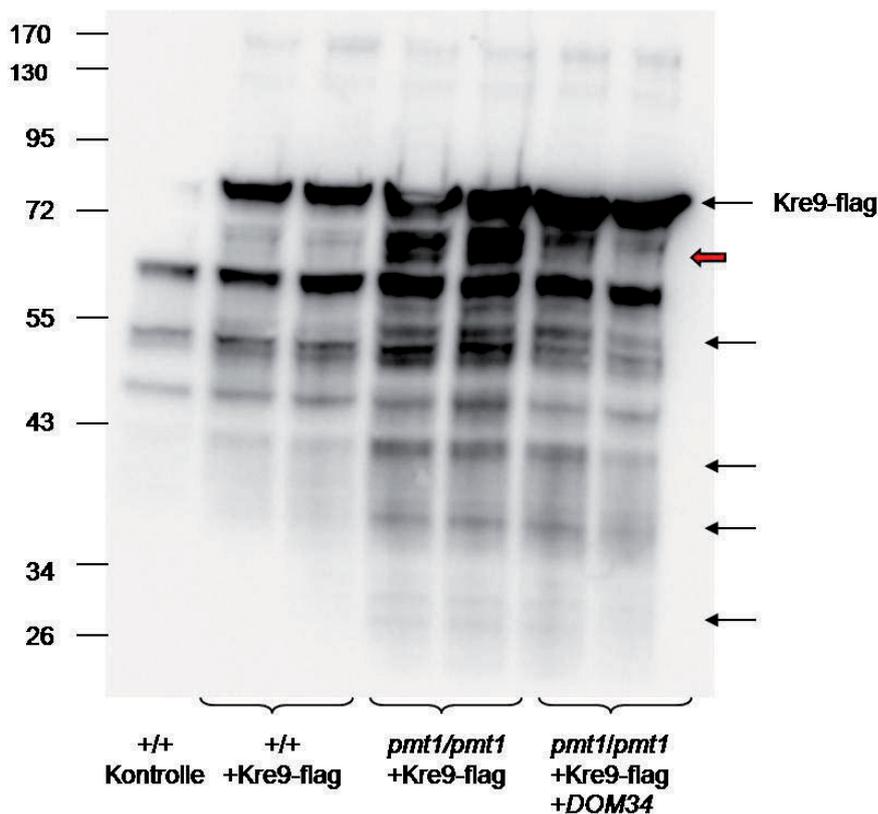


Abb. 3.7: Immunoblotanalyse des Pmt1-Substrats Kre9 bei *DOM34*-Überexpression.

Rohextrakte von jeweils zwei Kre9^{Flag} exprimierende Transformanten des Wildtyps (CAI4 + pSP9), der *pmt1*-Mutante (CAP1-3121 + pSP9) und der *DOM34*-Überexpression in der *pmt1*-Mutante (CAP1-3121 + pJB34-AKF) wurden in einer 10 %-igen SDS-Page aufgetrennt und das Protein mit einem Anti-Flag Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein Rohextrakt des Wildtyps CAF2-1 ohne Kre9^{Flag} Plasmid aufgetragen (+/+). Die schwarzen Pfeile markieren verschiedene Laufformen von Kre9^{Flag}. Der rote Pfeil markiert die bei einer *DOM34*-Überexpression reduziert auftretende 70 kDa-Laufform von Kre9^{Flag} in der *pmt1*-Mutante.

Das Kre9^{Flag} Fusionsprotein hat eine molekulare Masse von 29 kDa. Wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist, kann das Protein im Wildtyp bei einer Laufhöhe von etwa 75 kDa detektiert werden. Eine weitere, schwache Bande ist bei etwa 40 kDa zu erkennen und stellt vermutlich eine unvollständig glykosylierte Form des Proteins dar. Drei weitere Banden bei 50 kDa, 55 kDa und 65 kDa treten in allen Spuren auf, es handelt sich jedoch um unspezifische Hintergrundbanden der Detektion mit dem Anti-Flag Antikörper, da sie auch bei der Negativkontrolle des Wildtypprohextrakts ohne Kre9^{Flag} Expression vorhanden sind. In der *pmt1*-Mutante sind im Gegensatz zum Wildtyp verschiedene Laufformen des Proteins zu sehen. Die größte Form läuft etwas niedriger als die Bande bei 75 kDa im Wildtyp. Eine weitere Form kann als eine intensive Doppelbande bei etwas weniger als 70 kDa detektiert werden, die durch die reduzierte *O*-Glykosylierung des Proteins in der *pmt1*-Mutante erklärt werden kann. Darüber hinaus treten weniger intensive Banden bei 55 kDa, 40 kDa, 36 kDa und 30 kDa auf, die vermutlich verschiedene unvollständig glykosylierte Formen von Kre9^{Flag} repräsentieren. Bei einer Überexpression von *DOM34* tritt die intensive Doppelbande der *pmt1*-Mutante bei 70 kDa kaum oder gar nicht auf, wohingegen die größere Form unterhalb von 75 kDa verstärkt als intensivere Bande detektiert wird. Eine Überexpression von *DOM34* scheint offensichtlich die in der *pmt1*-Mutante hauptsächlich auftretende unvollständig glykosylierte Form von Kre9^{Flag} zu reduzieren zugunsten einer stärker glykosylierten, größeren Form des Proteins. Der Phänotyp einer reduzierten *O*-Glykosylierung der Zielproteine einer *pmt1*-Mutante scheint zumindest im Fall des Kre9-Proteins durch eine Überexpression von *DOM34* teilweise supprimiert zu werden.

3.3 Phänotypisierung einer *pmt5 dom34*-Doppelmutante

In den vergangenen Abschnitten konnte anhand einer deutlichen genetischen Interaktion zwischen *DOM34* und *PMT1* gezeigt werden, dass *DOM34* in den Prozess der *O*-Glykosylierung involviert ist. In weiteren Untersuchungen sollte als nächstes überprüft werden, welcher genetische Zusammenhang zwischen *DOM34* und anderen *PMT*-Genen besteht. Im phylogenetischen Stammbaum der Protein-*O*-Mannosyltransferasen gehört neben *Pmt1* auch *Pmt5* zur *Pmt1*-Subfamilie und zeigt somit den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *Pmt1* (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Es wäre daher denkbar, dass ein enger Zusammenhang der Funktion dieser beiden Mannosyltransferasen besteht. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob ebenfalls eine Interaktion zwischen *DOM34* und *PMT5* beobachtet werden kann. Im Gegensatz zu *PMT1* zeigt eine *pmt5*-Deletionsmutante keinen der in den letzten Abschnitten beschriebenen Phänotypen einer *pmt1*-Mutante. Es sollte trotzdem eine *pmt5 dom34*-Doppelmutante konstruiert und untersucht werden, ob möglicherweise die zusätzliche Deletion von *DOM34* zur Ausprägung eines Phänotyps führt.

3.3.1 Konstruktion der *pmt5 dom34* Doppelmutante

Als Ausgangsstamm für die Konstruktion dieser Mutante wurde der homozygote *dom34Δ*-Deletionsstamm SK47 (Kluge, 2006) verwendet, in dem mit Hilfe der *URA*-Blaster Methode in zwei aufeinanderfolgenden Schritten beide *PMT5*-Allele disruptiert werden sollten wie von Klinkert zur Herstellung der homozygoten *pmt5*-Mutante beschrieben (Klinkert, 2002). Hierfür wurde zunächst das 5121 bp große Disruptionsfragment, bestehend aus der *hisG-URA3-hisG*-Sequenz und den flankierenden *PMT5*-homologen Bereichen, mit *SacI* und *SpeI* aus Plasmid pBK-5 ausgeschnitten. Der *URA3*-auxotrophe Stamm SK47 wurde mit dem Disruptionsfragment transformiert und die Transformanten mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf die korrekte Integration des Fragments in eines der beiden *PMT5*-Allele überprüft. Bei korrekter Integration ergab sich mit den Primern p-URA3-v und v-PMT5-1 ein Fragment von

2,3 kb und mit den Primern pcURA3 und p-PMT5-1 ein Fragment von 2,4 kb. Die Stämme JH5 und JH8 zeigten die erwartete Fragmentgröße (Daten nicht gezeigt) und wurden anschließend zur Wiederherstellung der *URA3*-Auxotrophie für den zweiten Disruptionsschritt auf FOA selektiert. Die resultierenden Stämme JH5-3 und JH8-5 wurden erneut mit dem *PMT5*-Disruptionsfragment transformiert. Die Transformanten wurden wiederum mit Hilfe der angegebenen Primer in einer Kolonie-PCR überprüft. Nach dem Verlust des *URA3*-Gens im ersten disruptierten *PMT5*-Allel können diese Primer hier nicht mehr binden, durch den Nachweis der integrierten *URA3*-Disruptionskassette kann jedoch nicht die erneute Integration in das bereits disruptierte *PMT5*-Allel ausgeschlossen werden. Zur weiteren Überprüfung der Transformanten wurde daher ein Southernblot durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA von jeweils 3 in der Kolonie-PCR positiv getesteten Transformanten von JH5-3 und JH8-5 präpariert und mit *EcoRI* geschnitten. Als Sonde für den spezifischen Nachweis der Fragmente des *PMT5*-Lokus wurde aus Plasmid pBK-Pmt5b mit *SacI* und *Clal* ein 660 bp großes Fragment ausgeschnitten. Mit dieser Sonde ergibt sich für das Wildtyp-Allel eine Bande von 2,6 kb, nach Integration der *URA*-Disruptionskassette eine Bande von 2,4 kb und für das disruptierte *pmt5Δ*-Allel nach Verlust des *URA3* eine Bande von 4,1 kb (Klinkert, 2002). Es wurden der Stamm CAI4 (Wildtyp), der Ausgangsstamm SK47 (*dom34Δ/dom34Δ*), die beiden unabhängigen *PMT5*-Halbdisruptanten Stämme JH5 und JH8 (*dom34Δ/dom34Δ pmt5Δ::hisG-URA3-hisG/PMT5*) vor der FOA-Selektion, JH5-3 und JH8-5 nach der FOA-Selektion (*dom34Δ/dom34Δ pmt5Δ::hisG /PMT5*) sowie die 6 Transformanten der Disruption des zweiten *PMT5*-Allels JH5-3-1, JH-5-3-2, JH-5-3-4 und JH8-5-10, JH-8-5-11, JH-8-5-14 untersucht. Wie erwartet zeigten CAI4 und SK47 nur die 2,6 kb Bande des Wildtypparallels. JH5 und JH8 zeigten jeweils eine 2,6 kb Wildtyp-Bande sowie die 2,4 kb *pmt5Δ::hisG-URA3-hisG* Bande, an deren Stelle in den Stämmen JH5-3 und JH8-5 nach der FOA-Selektion die 4,1 kb *pmt5Δ::hisG* Bande auftrat. Von den getesteten Transformanten zeigten der Stamm JH5-3-1 und JH8-5-11 die Banden der vollständigen Disruption beider *PMT5*-Allele (*dom34Δ/dom34Δ pmt5Δ::hisG/pmt5Δ::hisG-URA3-hisG*), die 4,1 kb *pmt5Δ::hisG* Bande und eine 2,4 kb *pmt5Δ::hisG-URA3-hisG* Bande (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde für beide Stämme das Fehlen des *PMT5*- und des *DOM34*-Transkripts in einer quantitativen RT-PCR Analyse bestätigt. Diese unabhängigen Stämme JH5-3-1 und JH8-5-11 wurden für die phänotypischen Untersuchungen der *pmt5 dom34* Doppelmutante eingesetzt.

3.3.2 Sensitivitäten der Mutanten

Da eine *pmt5*-Mutante außer in einem speziellen *in vitro*-Infektionsmodell keinen bekannten Phänotyp zeigt (Prill *et al.*, 2005), sollten die *pmt5 dom34*-Doppelmutanten auf die gleichen Sensitivitäten wie zuvor die *pmt1 dom34*-Doppelmutante untersucht werden, die häufig bei Glykosylierungsmutanten auftreten. Zunächst wurde die Hygromycin B-Sensitivität der beiden *pmt5 dom34*-Doppelmutanten getestet. Wie erwartet zeigt die *pmt5*-Mutante keinen Wachstumsdefekt auf Hygromycin B, es konnte jedoch auch keine erhöhte Hygromycin B-Sensitivität der beiden *pmt5 dom34*-Doppelmutanten beobachtet werden. Auch gegenüber einer erhöhten Wachstumstemperatur von 42 °C oder SDS zeigten die *pmt5 dom34* -Stämme keinen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp. Es kann daher insgesamt kein Phänotyp für eine *pmt5 dom34*-Doppelmutante und somit kein Effekt der alleinigen Deletion von *DOM34* und *PMT5* nachgewiesen werden. Die Deletion von *DOM34* führt scheinbar nur bei gleichzeitiger Deletion von *PMT1* zur Ausprägung eines synthetischen Phänotyps. Da gleichzeitig die Überexpression von *DOM34* den *pmt1*-Phänotyp unterdrückt, ist jedoch denkbar, dass an diesem Effekt indirekt andere Pmt-Isoformen wie Pmt5 beteiligt sind.

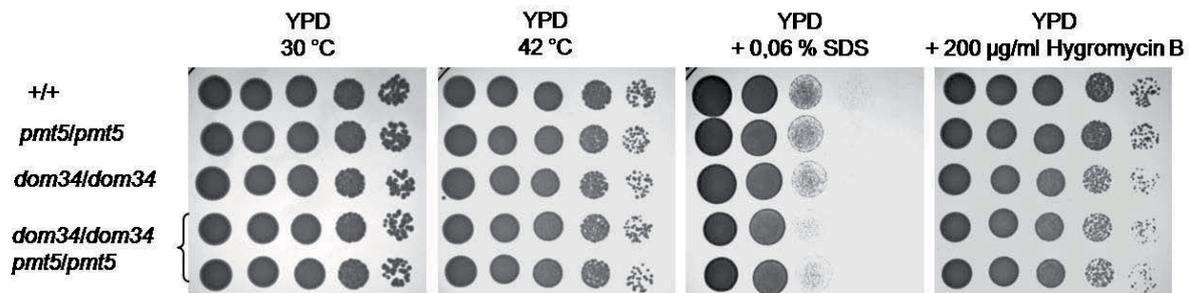


Abb. 3.8: Sensitivitäten der *dom34 pmt5*-Mutante.

Das Wachstum bei 42 °C, auf Hygromycin B und SDS der Stämme JH5-3-1 bzw. JH8-5-11 (*dom34/dom34 pmt5/pmt5*) und der Stämme CAF2-1 (+/+), SPCa10 (*pmt5/pmt5*) und JH47-1 (*dom34/dom34*) wurde verglichen. Die Verdünnungen der verschiedenen Stämme wurden wie in Abb. 3.1 beschrieben auf die angegebenen Medien getropft.

3.4 Einfluss anderer Pmt-Isoformen

Da eine Überexpression von *DOM34* zu einer Suppression verschiedener *pmt1*-Phänotypen führt, insbesondere auch einer Verminderung der *O*-Glykosylierungsdefekte von Pmt1-Substrat-Proteinen, sollte untersucht werden, ob andere Pmt-Isoformen an diesem Suppressionseffekt beteiligt sind. Durch Untersuchung von Doppelmutanten von *pmt1* und jeweils einer weiteren Pmt-Isoform in *DOM34*-Überexpressionsexperimenten sollte geklärt werden, ob die einzelnen Pmt-Isoformen für die Suppression des *pmt1*-Phänotyps benötigt werden. Da sowohl eine *pmt1 pmt2*-Doppelmutante als auch eine und *pmt1 pmt4*-Doppelmutante nicht lebensfähig sind, konnte nur eine *pmt1 pmt5*- sowie eine *pmt1 pmt6*-Doppelmutante untersucht werden. Für die Suppressionsversuche mussten diese Doppelmutanten mit dem *DOM34*-Überexpressionsplasmid transformiert werden, weshalb *URA3*-auxotrophe Stämme benötigt wurden. Es wurden der bereits *URA3*-auxotrophe Stamm CPP1121 (*pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt6Δ::hisG/pmt6Δ::hisG Δura3::imm434/Δura3::imm434*) (Timpel *et al*, 1999) sowie Stamm P15-274 (*pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt5Δ::hisG-URA3-hisG/pmt5Δ::hisG*) (Klinkert, persönliche Mitteilung) verwendet, bei dem zunächst vor der Transformation eine *URA3*-Auxotrophie hergestellt werden musste.

3.4.1 Konstruktion einer *URA3*-auxotrophen *pmt1 pmt5*-Doppelmutante

Zur Herstellung einer *URA3*-Auxotrophie wurde der Stamm P15-274 auf Medium mit 0,02 % 5-Fluoroorotsäure (FOA) ausplattiert. Eine Metabolisierung des FOA durch das *URA3*-Genprodukt ist toxisch für die Zelle, so dass nur Zellen überleben können, die das *URA3*-Gen durch intrachromosomale Rekombination zwischen den beiden flankierenden homologen *hisG*-Sequenzen verloren haben. Die auf diesem Medium gewachsenen Kolonien wurden durch PCR mit den Primern v-Pmt5-1 und p-Pmt5-1 auf den tatsächlichen Verlust des *URA3*-Gens überprüft, wobei sich ein 2,5 kb großes Fragment des *pmt5Δ::hisG*-Allels ergab. Der für die weiteren Versuche verwendete, *URA*-auxotrophe Stamm wurde P15-274-1 (*pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG pmt5Δ::hisG/pmt5Δ::hisG Δura3::imm434/Δura3::imm434*) genannt.

3.4.2 Sensitivitäten der Mutanten

Um zu klären, ob eine Überexpression von *DOM34* auch bei einer Doppeldeletion von *PMT1* und *PMT5* beziehungsweise *PMT1* und *PMT6* noch den *pmt1*-Phänotyp supprimieren kann, wurden die Stämme P15-274-1 und CPP1121 ebenfalls mit pSK2 und SP38 transformiert. Die erhaltenen Stämme wurden daraufhin auf ihre Sensitivität gegenüber Hygromycin B sowie einer Temperatur von 42 °C getestet, den Bedingungen, bei denen eine Suppression des Phänotyps durch *DOM34*-Überexpression in der *pmt1*-Mutante beobachtet werden konnte.

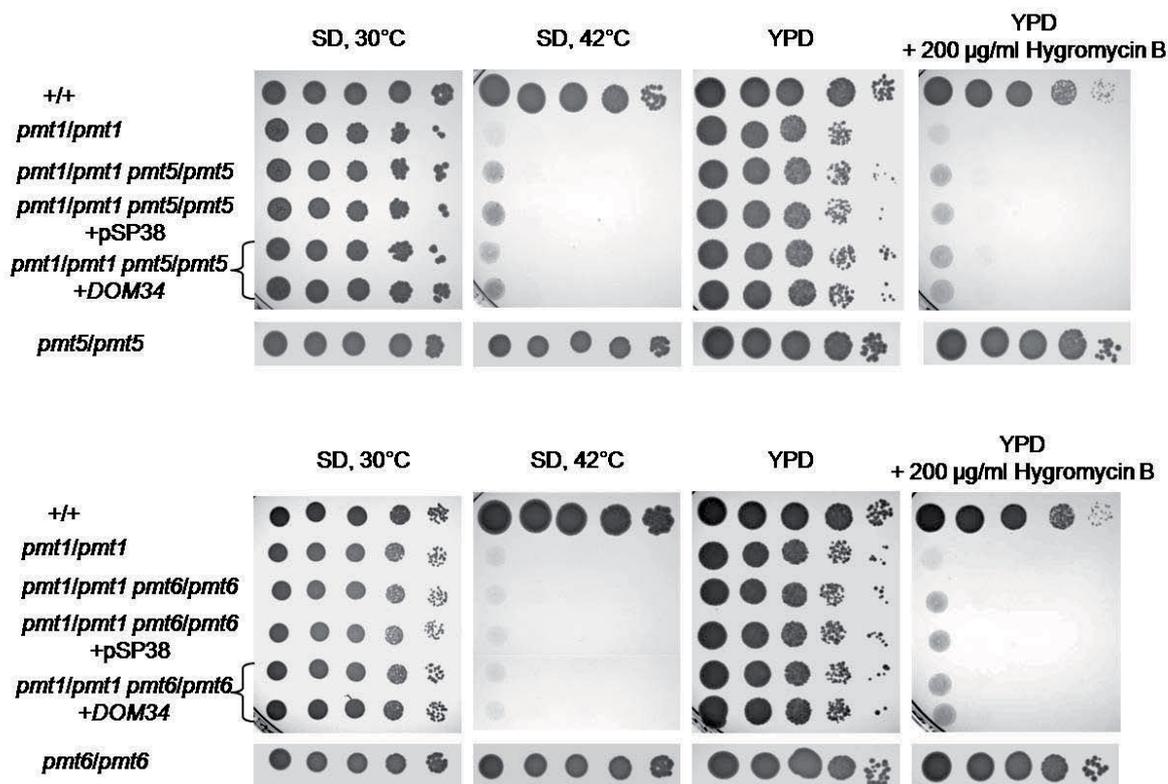


Abb. 3.9: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf die Sensitivitäten der *pmt1pmt5* und *pmt1pmt6* Doppelmutanten. Zwei Transformanten der *pmt1pmt5*-Doppelmutante P15-274-1 + pSK2 (*pmt1/pmt1 pmt5/pmt5* + *DOM34*) wurden mit den Stämmen P15-2741 + pSP38 (*pmt1/pmt1 pmt5/pmt5* + Leervektor), CAF2-1 (*+/+*), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*) und P15-274 (*pmt1/pmt1 pmt5/pmt5*) verglichen. Die zwei Transformanten der *pmt1pmt6*-Doppelmutante CPP1121 + pSK2 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6* + *DOM34*) wurden mit den Stämmen CPP1121 + pSP38 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6* + Leervektor), CAF2-1 (Wildtyp), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa8 (*pmt6/pmt6*) und CPP112 (*pmt1/pmt1 pmt5/pmt5*) verglichen. Die Verdünnungen der verschiedenen Stämme wurden wie in Abb. 3.1 beschrieben auf die angegebenen Medien getropft.

In Abbildung 3.9 ist zu erkennen, dass weder die *pmt5*- noch die *pmt6*-Einzelmutante sensitiv gegenüber Hygromycin B oder Wachstum bei 42 °C ist. Die beobachtete Sensitivität der *pmt1 pmt5*- bzw. *pmt1 pmt6*-Doppelmutante ist daher ausschließlich auf die Deletion von *PMT1* zurückzuführen. Wie zu sehen ist, hat die Überexpression von *DOM34* keinen Einfluss auf die Sensitivitäten der *pmt1 pmt5*-Doppelmutante. Das gleiche Ergebnis kann für die *pmt1 pmt6*-Doppelmutante beobachtet werden. Bei einer zusätzlichen Deletion von *PMT5* oder *PMT6* in der *pmt1*-Mutante kann die *DOM34*-Überexpression den *pmt1*-Phänotyp also nicht mehr supprimieren, woraus man schließen kann, dass die von *PMT5*- und *PMT6* codierten Protein-*O*-Mannosyltransferasen für die Suppression notwendig sind.

3.5 Einfluss von *DOM34* auf die Expression der *PMT*-Gene

In den letzten Abschnitten wurde beschrieben, dass eine Deletion von *PMT1* und *DOM34* zu einem synthetischen Phänotyp einer Doppelmutante führt, wogegen eine *DOM34*-Überexpression zu einer Suppression des *pmt1*-Phänotyps führt. An dieser Suppression scheinen andere *Pmt*-Isoformen wie *PMT5* und *PMT6* beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass *DOM34* ein Regulator der *Pmt*-Isoformen sein könnte. Eine solche *PMT*-Regulation durch *DOM34* könnte dabei auf verschiedenen Ebenen stattfinden. So könnte *DOM34* die Expression der *PMT*-Gene auf der Ebene der Transkription regulieren, oder auch als Regulator der Translation der *Pmt*-Proteine fungieren. Denkbar wäre auch eine Regulation der enzymatischen *Pmt*-Aktivität. In einem ersten Versuch sollte zunächst der Einfluss von *DOM34* auf die Expression der *PMT*-Gene untersucht werden. Dazu wurden die Transkriptspiegel aller *PMT*-Gene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR in verschiedenen Stämmen ermittelt. Als erstes wurden die Auswirkungen einer Deletion des *DOM34*-Gens in den *dom34*-Stämmen JH47-1 (*dom34Δ / dom34Δ*) und JH24-1 (*pmt1Δ / pmt1Δ dom34Δ / dom34Δ*) im Vergleich zum Wildtyp CAF2-1 bzw. der *pmt1*-Mutante SPCa2 betrachtet.

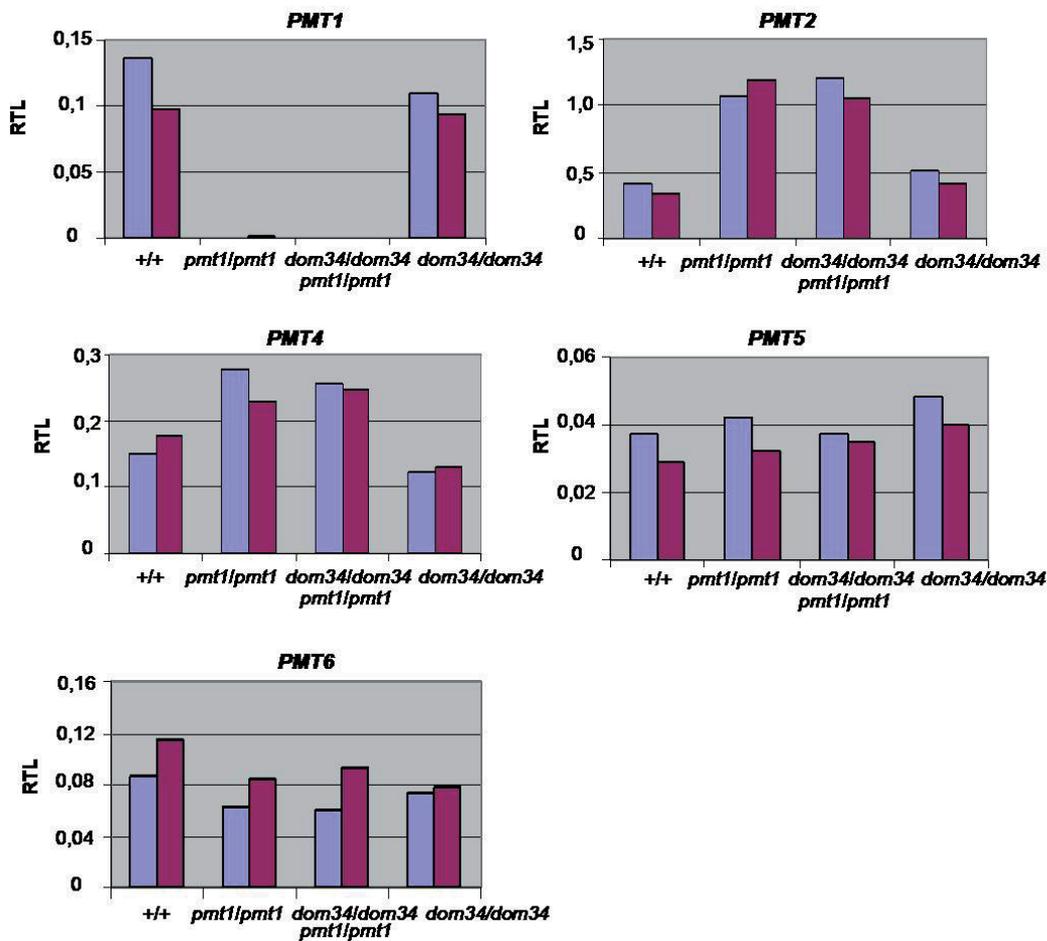


Abb. 3.10: Relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in *dom34* und *pmt1*-Mutanten.

Die relativen Transkriptspiegel (RTL) der *PMT*-Gene in den Stämmen CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), JH24-4 (*pmt1/pmt1 dom34/dom34*) und JH47-1 (*dom34/dom34*) wurden durch quantitative RT-PCR mit Aktin als Referenzgen ermittelt. Die beiden Balken jedes Stamms zeigen die beiden PCR-Messungen mit unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, hat die Deletion des *DOM34*-Gens keine Auswirkung auf die Expression der *PMT*-Gene, da für kein *PMT*-Gen eine Änderung des Transkriptspiegels in der *dom34*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen ist. In der *pmt1*-Mutante kommt es, wie bereits von Cantero *et al.* (2007) beschrieben, zu teilweise starken Veränderungen der Expression anderer *PMT*-Gene wie *PMT2* und *PMT4*, jedoch bleibt auch diese Änderung unbeeinflusst durch die zusätzliche Deletion von *DOM34* in der Doppelmutante.

Als nächstes wurde ein möglicher Effekt der *DOM34*-Überexpression auf die Expression der übrigen *PMT*-Gene in der *pmt1*-Mutante untersucht. Die Überexpression von *DOM34* erfolgte wie schon in Abschnitt 3.2 beschrieben von Plasmid pSK2. Es wurden zwei unabhängige Überexpressions-Transformanten getestet und die Überexpression des *DOM34*-Gens durch quantitative RT-PCR bestätigt (Abb. 3.11).

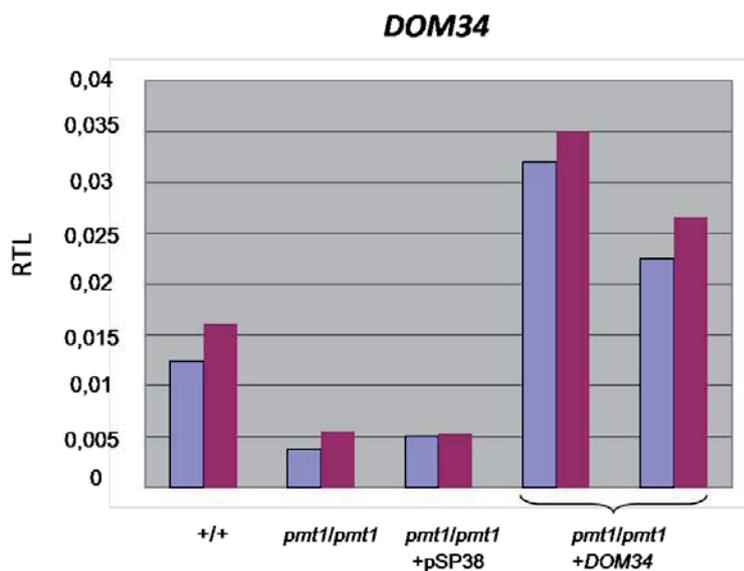


Abb. 3.11: Relativer Transkriptspiegel des *DOM34*-Gens in den *DOM34*-Überexpressionsstämmen der *pmt1*-Mutante. Der relative Transkriptspiegel (RTL) des *DOM34*-Gens in den Stämmen CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), CAP1-3121 + pSP38 (*pmt1/pmt1* + Leervektor) und zwei Transformanten des Stamms CAP1-3121 + pSK2 (*pmt1/pmt1* + *DOM34*) wurde durch quantitative RT-PCR mit Aktin als Referenzgen ermittelt. Die beiden Balken jedes Stamms zeigen die beiden PCR Messungen mit unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

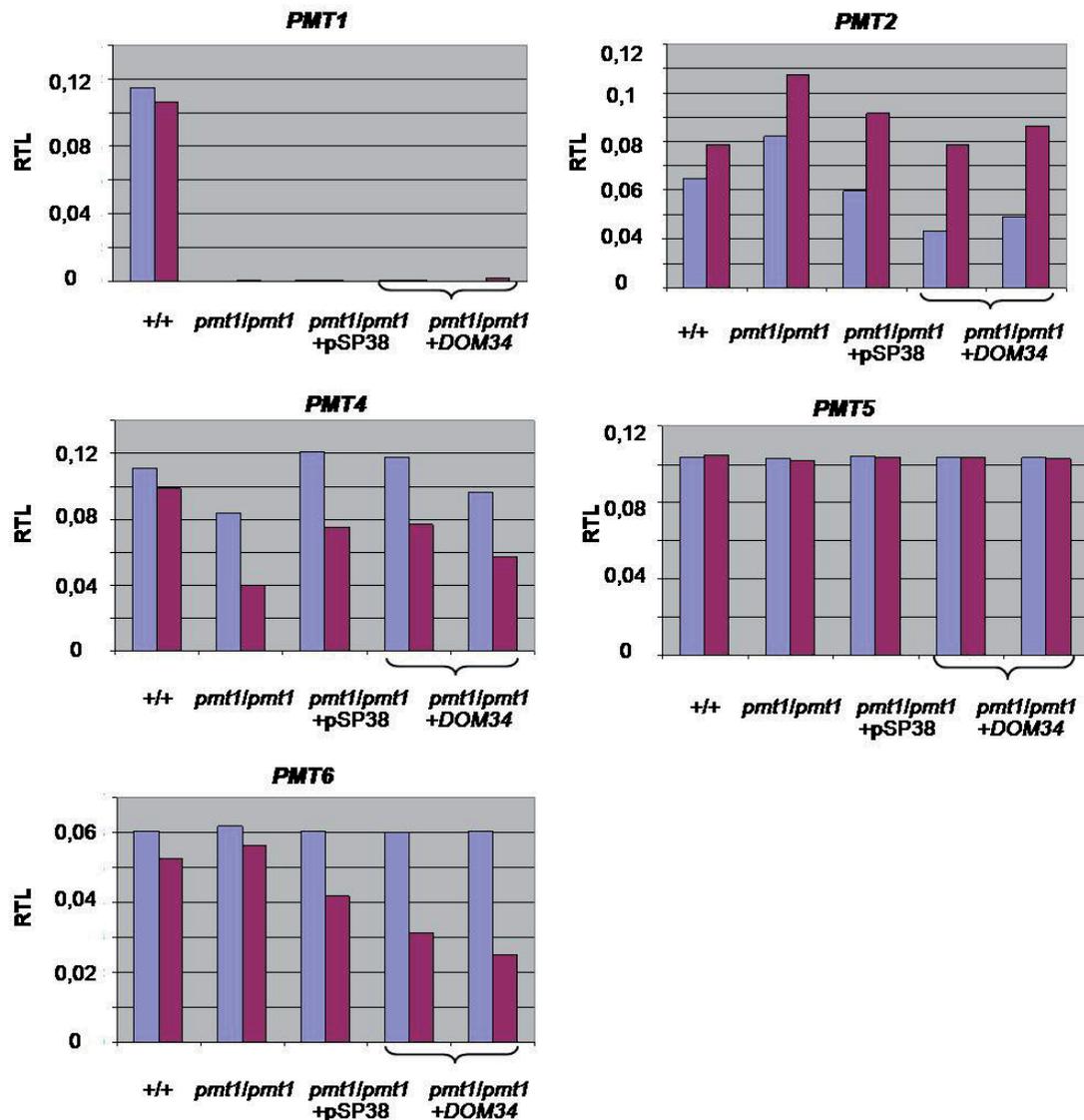


Abb. 3.12: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf die relativen Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der *pmt1*-Mutante. Die relativen Transkriptspiegel (RTL) der *PMT*-Gene in den Stämmen CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), CAP1-3121 + pSP38 (*pmt1/pmt1* + Leervektor) und zwei Transformanten des Stamms CAP1-3121 + pSK2 (*pmt1/pmt1* + *DOM34*) wurden durch quantitative RT-PCR mit Aktin als Referenzgen ermittelt. Die beiden Balken jedes Stamms zeigen die beiden PCR Messungen mit unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

Es zeigte sich, dass auch für die Überexpression von *DOM34* keine Änderung der *PMT* - Transkriptspiegel beobachtet werden kann (Abb. 3.12). Es kann daher insgesamt kein Einfluss von *DOM34* auf die Expression der *PMT*-Gene nachgewiesen werden.

3.6 Expression des *DOM34*-Gens in den *pmt*-Mutanten

Bei der Untersuchung einer *DOM34*-Überexpression in der *pmt1*-Mutante konnte zwar kein Einfluss auf die Expression der anderen *PMT*-Gene festgestellt werden, bei der Kontrolle des *DOM34*-Überexpressionzustands in den verschiedenen Stämmen durch quantitative RT-PCR fiel jedoch dagegen ein veränderter Transkriptspiegel des *DOM34*-Gens selbst in der *pmt1*-Mutante auf. Im Gegensatz zu einem dreifach bis vierfach erhöhten Expressionsniveau von *DOM34* in den Transformanten der *pmt1*-Mutante CAP-3121 mit dem Überexpressionsvektor zeigte sich sowohl in der *pmt1*-Mutante SPCa2 als auch dem *pmt1*-Kontrollstamm CAP1-3121 mit dem Leervektor eine deutliche Erniedrigung des *DOM34*-Transkriptspiegels im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.11). Um diese Veränderung der Transkription des *DOM34*-Gens in der *pmt1*-Mutante noch einmal zu bestätigen, und zu überprüfen ob ein solcher Effekt auch in den anderen *pmt*-Mutanten auftritt, wurde nochmals gezielt der *DOM34*-Transkriptspiegel in der *pmt1*-Mutante SPCa2 sowie den anderen *pmt*-Mutantenstämmen SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*) und SPCa8 (*pmt6/pmt6*) bestimmt (vgl. Abb. 3.13).

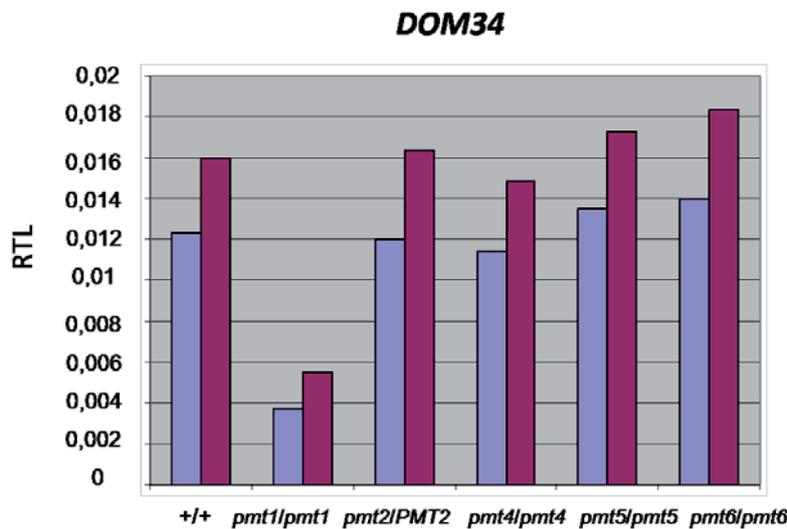


Abb. 3.13: Relativer Transkriptspiegel des *DOM34*-Gens in den verschiedenen *pmt*-Mutanten. Der relative Transkriptspiegel (RTL) des *DOM34*-Gens in den Stämmen CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4/pmt4*), SPCa10 (*pmt5/pmt5*) und SPCa8 (*pmt6/pmt6*) wurde durch quantitative RT-PCR mit Aktin als Referenzgen ermittelt. Die beiden Balken jedes Stamms zeigen die beiden PCR Messungen mit unabhängigen RNA-Präparationen (biologische Replikate).

Es zeigte sich, dass die Expression des *DOM34*-Gens in der *pmt1*-Mutante tatsächlich reproduzierbar um das Drei- bis Vierfache gegenüber dem Wildtypniveau reduziert war. In allen anderen *pmt*-Mutanten konnte dagegen kein solcher Effekt beobachtet werden, die *DOM34*-Expression unterschied sich hier nicht von der des Wildtyps.

3.7 Einfluss von *DOM34* auf die enzymatische Pmt-Aktivität

Da kein Einfluss von Dom34 auf die Expression der *PMT*-Gene beobachtet werden konnte, sollte in einem nächsten Ansatz überprüft werden, ob Dom34 möglicherweise direkt die enzymatische Aktivität der Pmt-Proteine reguliert. Durch Bestimmung der Proteinmannosyltransferase-Aktivität verschiedener *dom34*-Deletionsstämme einerseits und *DOM34*-Überexpressionsstämme andererseits sollte untersucht werden, ob eine Abhängigkeit der enzymatischen Pmt-Aktivität von *DOM34* besteht.

Bei der *O*-Glykosylierung katalysieren die in der ER-Membran lokalisierten Protein-*O*-Mannosyltransferasen den kotranslationalen Transfer des ersten Mannose-Rests auf das Zielprotein. Die Mannose wird dabei vom Donor Dolicholphosphat-Mannose auf einen Serin- oder Threoninrest des Proteins übertragen (vgl. Abbildung 3.14). Zur experimentellen Bestimmung der Enzymaktivität der Protein-*O*-Mannosyltransferasen wurde ein Pmt *in-vitro* Assay eingesetzt (Weston *et al.*, 1993). In diesem Assay wird die Pmt-Aktivität anhand der Mannosylierungsrate eines künstlichen Zielpeptids mit [¹⁴C]-Mannose gemessen, indem isolierte ER-Membranen der verschiedenen Stämme mit den darin enthaltenen Protein-*O*-Mannosyltransferasen in einen Reaktionsansatz mit Dolicholphosphat-[¹⁴C]-Mannose als Mannosequelle und dem Peptid als Akzeptor der Mannoseübertragung eingesetzt werden (siehe Abschnitt 2.6.10).

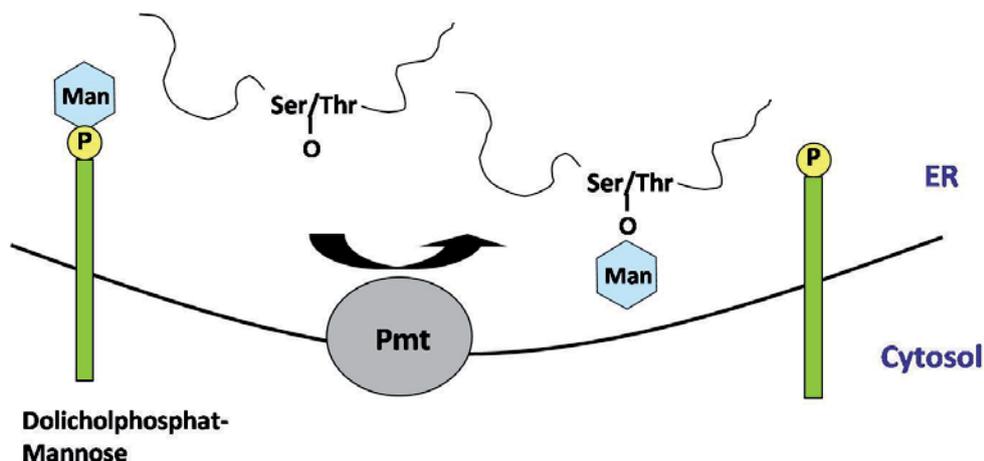


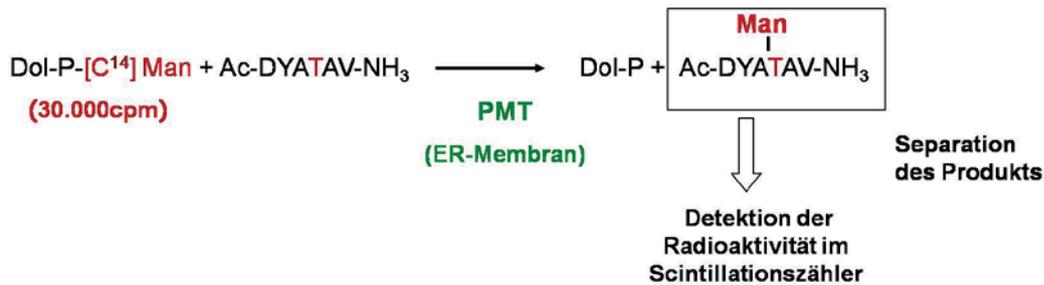
Abb. 3.14: Schema der Protein-Mannosylierung durch die Protein-*O*-Mannosyltransferasen. Der Mannoserest (Man) wird durch die Protein-*O*-Mannosyltransferase (Pmt) auf den Sauerstoff (O) eines Serin (Ser) oder Threonin (Thr) des Zielproteins übertragen.

Die Versuchparameter des Assays, insbesondere die Struktur des Akzeptorpeptids, wurden von Weston *et al.* (1993) für die Mannosylierung durch Pmt1 optimiert. In Abbildung 3.15 ist die Proteinmannosyltransferase-Aktivität der Serie von *dom34Δ*-Deletionsstämmen dargestellt. Die Aktivität entspricht dem Mannose-Einbau in das Produkt und wurde ermittelt, indem die Radioaktivität des Produkts abzüglich der Hintergrundaktivität in cpm gemessen wurde. Wie deutlich zu erkennen ist, sinkt die im Wildtyp gemessene Aktivität in der *pmt1*-Mutante auf einen kaum detektierbaren Wert ab. Die in diesem Pmt-Assay gemessene Pmt-Aktivität entspricht somit ausschließlich der Aktivität von Pmt1, vermutlich da das eingesetzte Akzeptorpeptid spezifisch für Pmt1 ist und von anderen Pmt-Isoformen nicht mannosyliert wird. Da kein Unterschied der Aktivität der *dom34*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp messbar ist, wird die enzymatische Aktivität von Pmt1 offensichtlich nicht durch

3. Ergebnisse

Dom34 beeinflusst. Ebenso kann keine Veränderung der Aktivität der *pmt1 dom34*-Doppelmutante im Vergleich zur *pmt1*-Einzelmutante beobachtet werden, da eine möglicherweise noch weiter verringerte Aktivität aufgrund der sehr kleinen Werte nicht sichtbar wäre.

(A)



(B)

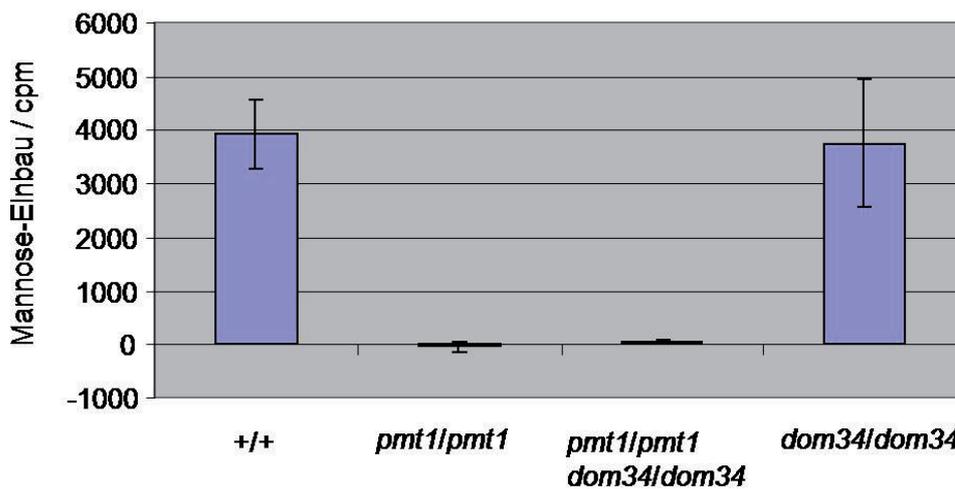


Abb. 3.15: Mannosylierungsaktivität der *dom34*- und *pmt1*-Mutanten.

(A) Schema des *in-vitro* Pmt-Assays. Es wurden 30000 cpm Dolicholphosphat-[¹⁴C]Mannose eingesetzt und die Radioaktivität des Produkts bestimmt. (B) Mannosylierungsaktivitäten der Mutanten. Die dargestellte Mannosylierungsaktivität der einzelnen Stämme entspricht der gemessenen Radioaktivität des Produkts abzüglich der Hintergrundaktivität des Assays ohne Akzeptorpeptid. Für jeden Stamm wurde eine Dreifachbestimmung zweier unabhängiger Membranpräparationen durchgeführt.

In einer zweiten Versuchsreihe konnte, wie in Abbildung 3.16 zu erkennen ist, jedoch auch kein Einfluss einer Überexpression von *DOM34* in der *pmt1*-Mutante, wie eine Erhöhung der geringen Aktivität der *pmt1*-Mutante durch eine Stimulation anderer Pmts, nachgewiesen werden. Ein Einfluss von Dom34 auf die Aktivität anderer Pmt-Isoformen ist trotz der Ergebnisse dieser Messungen jedoch möglich, da die vermutete Steigerung der Aktivität anderer Pmt-Isoformen aufgrund des verwendeten, Pmt1-spezifischen Peptids im Rahmen dieses Assays nicht messbar ist.

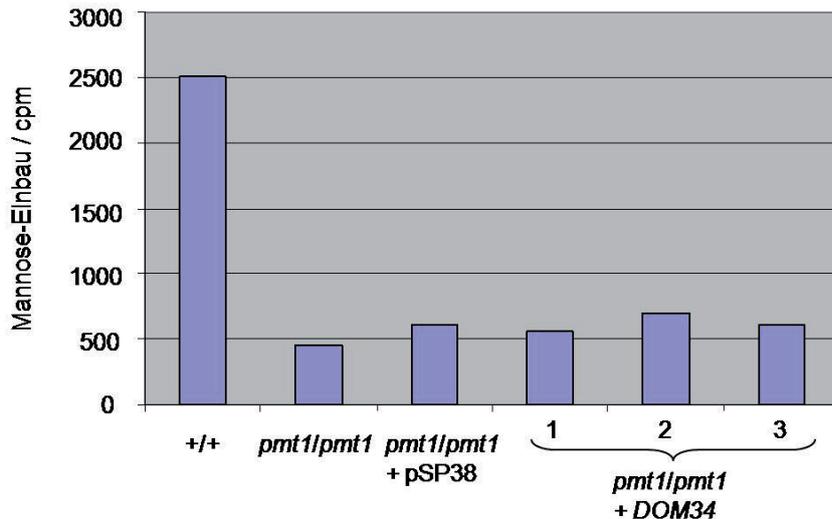


Abb. 3.16: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf die Mannosylierungsaktivität der *pmt1*-Mutante. Dargestellt ist die Mannosylierungsaktivität von drei Transformanten (1, 2, 3) der Überexpression von *DOM34* in der *pmt1*-Mutante (CAP1-3121 + pSK2) im Vergleich zum Leervektor (CAP1-3121 + pSP38).

3.8 Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion von Dom34 und Pmt-Proteinen

Da in den letzten Abschnitten eine Regulation der *PMT*-Transkripte durch Dom34 ausgeschlossen werden konnte und ein Einfluss auf die enzymatische Pmt-Aktivität experimentell nicht nachweisbar war, sollte als weiterer Ansatz eine potentielle direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen Dom34 und den Protein-*O*-Mannosyltransferasen untersucht werden. Es erfolgte eine gezielte Überprüfung einer Interaktion zwischen Dom34 und Pmt1 bzw. Pmt2 mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation der jeweiligen Proteine.

Für eine Co-Immunopräzipitation müssen die mit unterschiedlichen Epitopen markierten Proteine zusammen in einem Stamm exprimiert werden. Es wurden daher zunächst Stämme konstruiert, die Epitop-markierte Versionen von Pmt1 und Dom34 bzw. Pmt2 und Dom34 coexprimieren. Zu diesem Zweck wurden Stämme von Inga Schmidt verwendet, in denen die Protein-*O*-Mannosyltransferasen mit dem HA-Epitop markiert waren (Schmidt, 2007). Diese Stämme exprimieren über den *SAT1*-Marker mit einem dreifachen HA-Epitop markierte Versionen von Pmt1 (Stamm CIS23) bzw. Pmt2 (Stamm CIS25), so dass für die Expression eines weiteren Epitop-markierten Proteins in diesen Stämmen der *URA3*-Marker zur Verfügung stand. Das für die *DOM34*-Überexpression verwendete Plasmid pSK2 exprimiert eine mit dem Flag-Epitop markierte Version von Dom34. Durch Transformation der Stämme CIS23 und CIS25 mit Plasmid pSK2 wurden auf diese Weise Stämme hergestellt, die gleichzeitig Pmt1^{HA} und Dom34^{Flag}, bzw. Pmt2^{HA} und Dom34^{Flag} produzierten. Zunächst wurde die Interaktion von Pmt1 und Dom34 untersucht. In einer Expressionskontrolle der Stämme wurde zunächst überprüft, ob die untersuchten Proteine produziert wurden und im eingesetzten Rohextrakt detektierbar waren. In Abbildung 3.17 ist zu erkennen, dass sowohl Dom34^{Flag} als auch Pmt1^{HA} in den jeweiligen Stämmen nachgewiesen werden konnten. Es folgte die Präzipitation von Pmt1^{HA} mit einem Anti-HA Antikörper. Neben dem beide Proteine exprimierenden Stamm wurden als Kontrollen der Co-Präzipitation außerdem Stämme eingesetzt, die nur jeweils das eine der markierten Proteine Pmt1^{HA} oder Dom34^{Flag} produzierten, sowie der Wildtyp ohne Epitop-Markierungen. Auf diese Weise können falsch positive Signale ausgeschlossen werden, die beispielsweise durch eine Co-Präzipitation unspezifischer Proteine mit Pmt1^{HA} oder eine selbstständige Bindung von Dom34-Flag an die Sepharosematrix entstehen können. Wie zu sehen ist, wurde Pmt1^{HA} erfolgreich präzipitiert,

3. Ergebnisse

jedoch konnte Dom34 nicht copräzipitiert werden. Es war daher keine Interaktion zwischen Pmt1 und Dom34 nachweisbar.

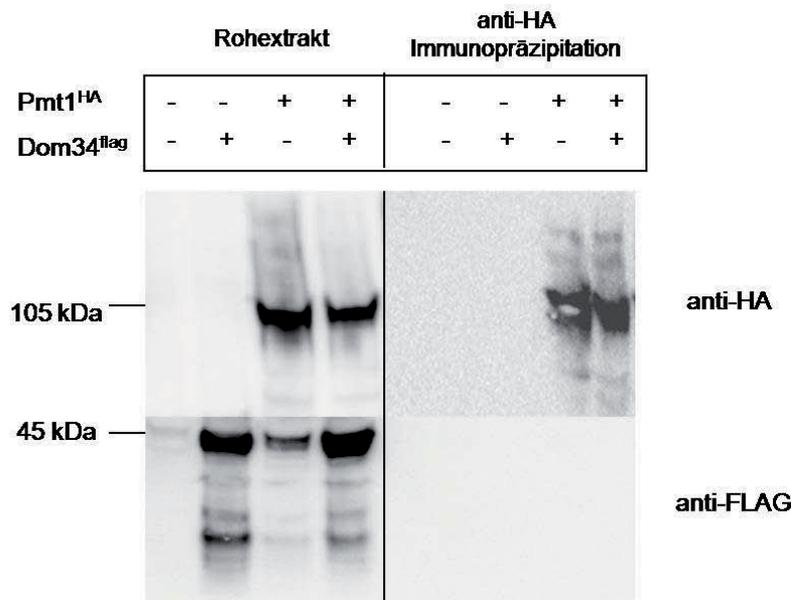


Abb. 3.17: Co-Immunopräzipitation von Pmt1^{HA} und Dom34^{Flag}. Expressionskontrolle: Die in der Immunopräzipitation eingesetzten Rohextrakte der Stämme SC5314 (Wildtyp), CAI4 + pSK2 (Wildtyp + *DOM34^{Flag}*), Pmt1-HA(URA) (*PMT1/PMT1^{HA}*) und CIS23 + pSK2 (*PMT1/PMT1^{HA}* + *DOM34^{Flag}*) wurden in einem Immunoblot mit einem anti-HA bzw. anti-Flag Antikörper auf die Detektierbarkeit der Proteine Pmt1^{HA} und Dom34^{Flag} überprüft (links). Immunopräzipitation: Die Rohextrakte wurden mit einem anti-HA Antikörper präzipitiert und das Präzipitat mit einem anti-HA sowie einem anti-Flag Antikörper in getrennten Immunoblots untersucht (rechts).

Weiterhin wurde die Interaktion von Pmt2 und Dom34 nach dem gleichen Prinzip untersucht, jedoch präzipitiert Dom34 auch nicht mit Pmt2 (Abbildung 3.18).

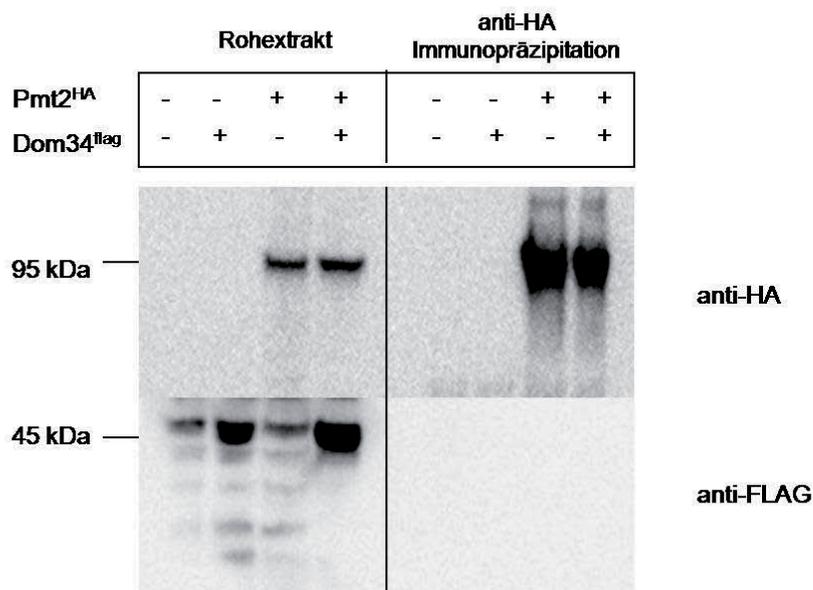


Abb. 3.18: Co-Immunopräzipitation von Pmt2^{HA} und Dom34^{Flag}. Für die Co-Immunopräzipitation von Pmt2^{HA} und Dom34^{Flag} wurden Rohextrakte der Stämme SC5314 (Wildtyp), CAI4 + pSK2 (Wildtyp + *DOM34^{Flag}*), Pmt2-HA(URA) (*PMT2/PMT2^{HA}*) und CIS25 + pSK2 (*PMT2/PMT2^{HA}* + *DOM34^{Flag}*) verwendet.

Somit konnte ebenfalls keine direkte Interaktion von Dom34 mit Pmt2 gezeigt werden. Eine Interaktion von Dom34 mit anderen Proteinmannosyltransferasen wurde nicht untersucht, da Versuche einer Epitopmarkierung von Pmt4, Pmt5 oder Pmt6 erfolglos blieben (Schmidt, 2007).

3.9 Einfluss von Dom34 auf die Protein-Translation

3.9.1 Quantifizierung des Pmt1-Proteins

Eine weitere Möglichkeit der Pmt-Regulation neben der Expressionskontrolle der *PMT*-Gene und einer direkten Beeinflussung der Funktion des Proteins besteht in der Regulation der Translation der Pmt-Proteine durch *DOM34*. Ein wichtiger Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion bei der Translation ergibt sich dabei aus der Proteinstruktur von Dom34. Bei den Dom34-Proteinen und den homologen Pelota-Proteinen handelt es sich um eine hochkonservierte Proteinfamilie mit Mitgliedern in zahlreichen Organismen. Die Dom34/Pelota-Proteine weisen eine große Homologie zum eukaryotischen Terminationsfaktor eRF1 auf, der an dem Terminationsschritt der Proteintranslation beteiligt ist, und enthalten insbesondere konservierte eRF1-Domänen (Frolova *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2007; vgl. Abb. 3.22). In einigen Organismen wie *Drosophila* und der Maus führen Deletionen von Pelota zu einer gestörten Embryonalentwicklung, die man auf eine fehlerhafte Regulation der Proteintranslation zurückführt (Eberhart und Wasserman, 1995; Adham *et al.* 2002). In *Saccharomyces* scheint Dom34 mit dem kleinen G-Protein Hbs1, das ebenfalls Homologie zu einem Translationsfaktor aufweist, an der Translation einiger mRNAs beteiligt zu sein (Davis und Engebrecht, 1998; Carr-Schmid *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob Dom34 auch in *C. albicans* eine Funktion bei der Translation hat und möglicherweise an der Translation der Protein-*O*-Mannosyltransferasen beteiligt ist, sollte zunächst die Auswirkung einer *DOM34*-Überexpression auf die Proteinbiosynthese von Pmt1 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde wiederum der im letzten Abschnitt beschriebene Stamm CIS23 von Inga Schmidt verwendet, in dem Pmt1 mit dem HA-Epitop markiert war, so dass ein quantitativer Nachweis des Pmt1-Proteins möglich war. Durch Transformation mit dem *DOM34*-Überexpressionvektor und alternativ dem Leervektor konnte auf diese Weise die in den Zellen synthetisierte Menge des Pmt1-Proteins in Abhängigkeit von *DOM34* untersucht werden. Zur vergleichenden Quantifizierung von Pmt1 in den verschiedenen Stämme wurde Rohextrakt entsprechend äquivalenten Gesamtproteinmengen in einem Immunoblot analysiert. Um sicherzustellen, dass tatsächlich gleiche Gesamtproteinmengen eingesetzt wurden, wurde zusätzlich das Aktin-Protein als interner Mengenstandard mit Hilfe eines Anti-Aktin Serums nachgewiesen. Es wurden jeweils vier unabhängige Transformanten des Pmt1^{HA} produzierenden Stamms mit bzw. ohne *DOM34*-Überexpression verglichen und unterschiedliche Gesamtproteinmengen zwischen 2 µg und 50 µg hinsichtlich einer optimalen Quantifizierbarkeit der Pmt1^{HA} Bande getestet. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, lässt sich das Pmt1^{HA} Protein gut bei einer eingesetzten Gesamtproteinmenge von 5 µg quantifizieren.

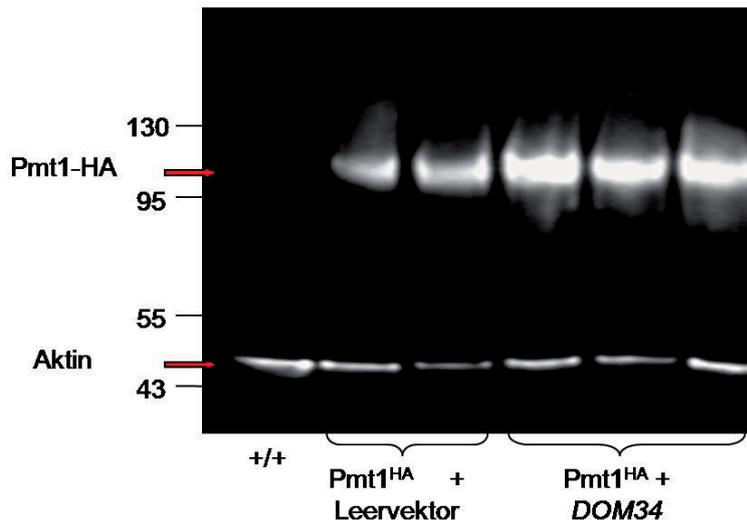


Abb. 3.19: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf die *Pmt1*-Proteinmenge.

Das $Pmt1^{HA}$ -Protein wurde in einem anti-HA Immunoblot quantifiziert. Es wurde Rohextrakt entsprechend 5 μ g Gesamtprotein jedes Stamms eingesetzt und als zusätzlicher Proteinmengenstandard Aktin mit einem anti-Aktin Antikörper detektiert. Zwei Transformanten des Stamms CIS23 + pSP38 (*PMT1/PMT1*^{HA} + Leervektor) wurden mit drei Transformanten des Stamms CIS23 + pSK2 (*PMT1/PMT1*^{HA} + *DOM34*) verglichen, als Negativkontrolle diente CAF2-1 (+/+).

Es ist erkennbar, dass bei einer Überexpression von *DOM34* ein intensiveres Signal für $Pmt1^{HA}$ detektiert werden kann im Vergleich zum Leervektor ohne *DOM34*-Überexpression. Die Intensität der Aktin-Bande bleibt dabei gleich, so dass von gleichen analysierten Gesamtproteinmengen ausgegangen werden kann. Die Überexpression von *DOM34* in den jeweiligen Stämmen wurde ebenfalls in einem Immunoblot überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Quantifizierung scheinen daher darauf hinzuweisen, dass eine Überexpression von *DOM34* zu einer erhöhten Menge des *Pmt1*-Proteins in der Zelle führt.

3.9.2 Rolle regulatorischer Elemente im *PMT1*-Transkript

Da sich im letzten Abschnitt erste Hinweise auf einen Einfluss von Dom34 auf die Proteinmenge von *Pmt1* ergaben, sollte eine mögliche Funktion von Dom34 bei der Translation des *Pmt1*-Proteins weiter untersucht werden. Durch eine 5'-RACE-PCR wurde von Pilar Dominguez-Cantero die Position des Transkriptionsstarts für das *PMT1*-Gen bestimmt. Der Startpunkt der Transkription der *PMT1*-mRNA liegt demnach 192 bp stromaufwärts des *PMT1*-Startcodons (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe des Programms RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools) konnte weiterhin ein wiederholtes Motiv der Sequenz CAACCA als potentielles regulatorisches Element des *PMT1*-Promotorbereichs identifiziert werden. Dieses CAACCA-Motiv findet sich in mehreren Wiederholungen im Bereich zwischen -170 bp und -191 bp vor dem Startcodon des *PMT1*-Gens und ist somit Teil des 5'-UTR der *PMT1*-mRNA (vgl. Abb. 3.20). Eine Fusion des *PMT1*-Promotors mit Luziferase als Reportergen zeigte, dass eine Deletion des *PMT1*-Promotorbereichs von -192 bp bis -170 bp zu einer deutlich verringerten Expression des Reporters führte. Bei dem CAACCA-Motiv könnte es sich daher möglicherweise um regulatorische Sequenzen für die Translation der *PMT1*-mRNA handeln. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob ein Einfluss von Dom34 auf die Expression der Luziferase-

PMT1-Promotor Konstrukte inklusive der Region -192 bis -170 des *PMT1*-5'-UTR bzw. bei Deletion dieses Bereichs besteht.

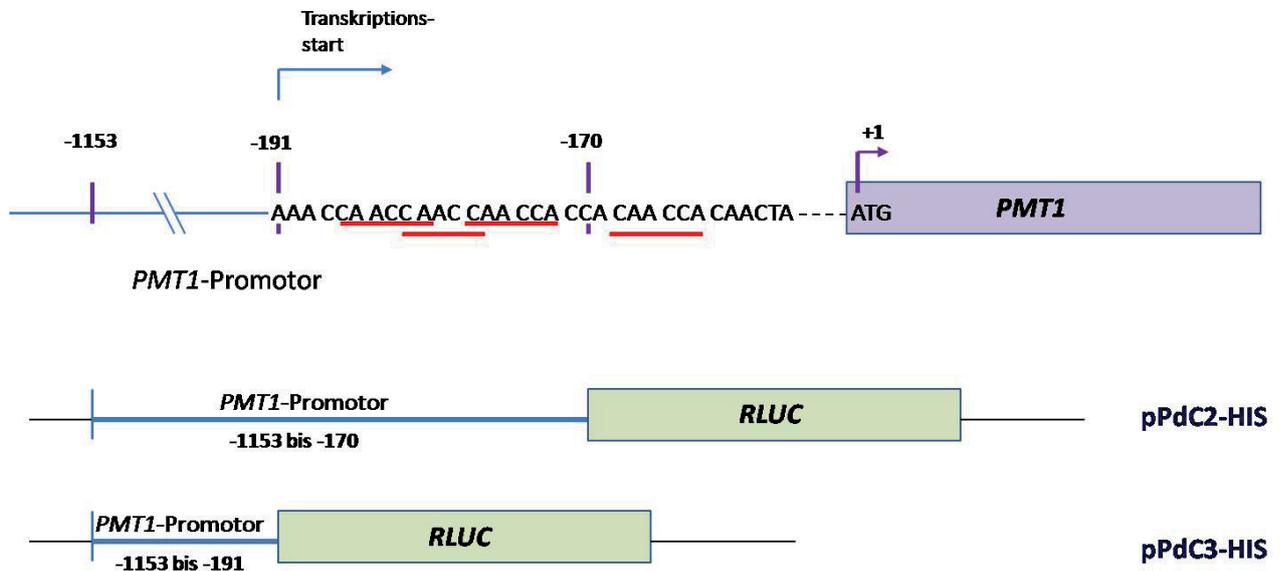


Abb. 3.20: Schematische Übersicht der regulatorischen Region des *PMT1*-Gens.

Dargestellt ist die relative Position des Transkriptionsstarts der *PMT1*-mRNA und der regulatorischen Motive im 5'-UTR. Das sich wiederholende Motiv der Sequenz CAACCA ist rot unterstrichen.

+1 markiert den Translationsstart des *PMT1*-Gens am Startcodon. Plasmid pPdC2-HIS enthält eine Fusion des *PMT1*-Promotors von Position -1153 bis -170 mit dem Luziferasegen, Plasmid pPdC3-HIS eine Fusion des *PMT1*-Promotors ohne den regulatorischen Bereich von Position -192 bis -170 mit dem Luziferasegen.

Für die Untersuchung des *PMT1*-Promotors wurden von Pilar Dominguez-Cantero die Plasmide pPdC2 mit dem vollständigen Promotor (-1153 bp bis -170 bp vor Translationsstart) und pPdC3 mit Deletion der regulatorischen CAACCA-reichen Region (-1153 bp bis -192 bp vor Translationsstart), jeweils fusioniert mit dem Luziferasegen als Reporter, verwendet und für die Messung der Luziferase-Aktivität in Stamm CAI4 in den genomischen *PMT1*-Promotor integriert (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob Dom34 ebenfalls einen Einfluss auf die Expressionsstärke des Reporters hat und ob eine Abhängigkeit von den regulatorischen Motiven des *PMT1*-Transkripts besteht, sollte die Auswirkung einer *DOM34*-Überexpression auf die Luziferase-Aktivität beider *PMT1*-Promotor-Fusionskonstrukte untersucht werden. Hierzu musste das *DOM34*-Überexpressionsplasmid gleichzeitig in Stämme mit dem integrierten Luziferaseplasmid pPdC2 bzw. pPdC3 transformiert werden. Da alle Plasmide *URA3* als Selektionsmarker tragen, wurde der *URA3*-Marker in Plasmid pPdC2 und pPdC3 gegen den *HIS1*-Marker ausgetauscht. Zunächst wurden die Plasmide pPdC2 und pPdC3 mit *MfeI* im *URA3*-Gen linearisiert und das *HIS1*-Gen aus Plasmid pGEM-HIS1 mit *BamHI* und *MscI* ausgeschnitten. Danach wurden die kohäsiven Enden der Fragmente aufgefüllt und das *HIS1*-Gen durch Ligation in Plasmid pPdC2 bzw. pPdC3 integriert, so dass der *URA3*-Marker durch die Insertion nicht mehr funktionell war. Die entstandenen Plasmide mit dem *HIS1*-Selektionsmarker wurden pPdC2-HIS bzw. pPdC3-HIS genannt und jeweils nach Linearisierung mit *BstI* 1107 in den *PMT1*-Promotor des *URA3*- und *HIS1*-auxotrophen

Stamms RM1000 integriert. Die genomische Integration in einfacher Kopie wurde für beide Plasmide in einer Southern-Blot Analyse bestätigt (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung). Danach erfolgte die Transformation der resultierenden Stämme mit dem *DOM34*-Überexpressionsvektor pSK2 bzw. dem Leervektor pSP38. Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Luziferase-Aktivität der verschiedenen Stämme.

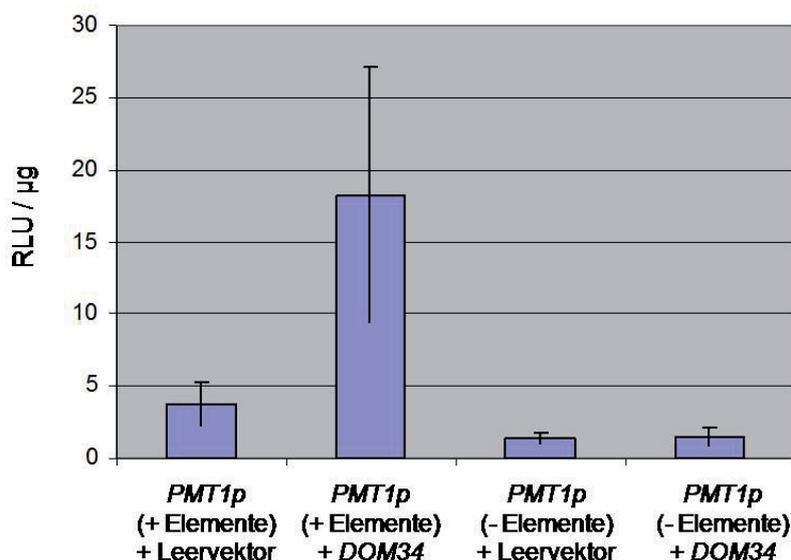


Abb. 3.21: Einfluss der *DOM34*-Überexpression auf die Luziferase-Aktivität verschiedener *PMT1*-Promotor-*RLUC*-Fusionen. Die Luziferase-Aktivität von je drei Transformanten des Stamms RM1000 + pPdC2-HIS + pSP38 (vollständiger *PMT1*-Promotor [-1153 bp bis -170 bp] + Leervektor), RM1000 + pPdC2-HIS + pSK2 (vollständiger *PMT1*-Promotor [-1153 bp bis -170 bp] + *DOM34*), RM1000 + pPdC3-HIS + pSP38 (verkürzter *PMT1*-Promotor [-1153 bp bis -192 bp] + Leervektor) und RM1000 + pPdC3-HIS + pSK2 (verkürzter *PMT1*-Promotor [-1153 bp bis -192 bp] + *DOM34*) wurde in einer Doppelbestimmung ermittelt und bezüglich der eingesetzten Proteinkonzentration normalisiert.

Wie erwartet zeigt das Konstrukt mit dem *PMT1*-Promotor inklusive des Bereichs von -192 bis -170 ohne Überexpression von *DOM34* eine deutlich höhere Luziferase-Aktivität als der verkürzte *PMT1*-Promotor mit Deletion der regulatorischen Region von -192 bis -170. Wird *DOM34* überexprimiert, lässt sich noch eine sehr deutliche Steigerung dieser Aktivität beobachten. Während die Luziferase-Aktivität des vollständigen *PMT1*-Promotors ohne *DOM34*-Überexpression doppelt so hoch liegt wie die der verkürzten *PMT1*-Promotor Version, führt eine Überexpression von *DOM34* zu einer nochmals 5-fachen Erhöhung der Aktivität des vollständigen *PMT1*-Promotors. Dieser Effekt einer *DOM34*-Überexpression tritt nicht bei einer Deletion der regulatorischen Region im verkürzten *PMT1*-Promotor auf. Die Überexpression von *DOM34* scheint daher die Expression des Reportergens in Abhängigkeit von dem CAACCA-reichen regulatorischen Bereich zwischen -192 und -170 deutlich zu verstärken. Da kein Einfluss von *Dom34* auf den Transkriptspiegel von *PMT1* nachgewiesen werden konnte, und die regulatorischen Motive Teil des 5'-UTR des *PMT1*-Transkripts sind, beeinflussen die CAACCA Motive vermutlich nicht als regulatorische Elemente des Promotors die Transkription des *PMT1*-Gens, sondern stellen vermutlich regulatorische Sequenzen für die Translation der *PMT1*-mRNA dar. Diese Ergebnisse stellen somit einen weiteren Hinweis auf eine Rolle von *Dom34* bei der Proteintranslation und im Speziellen der Translation des *Pmt1*-Proteins dar. Bei der Bestimmung des

Transkriptionsstarts der anderen Proteinmannosyltransferasen zeigte sich, dass *PMT5* die identischen Motive am Anfang des Transkripts aufweist wie *PMT1* (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung). Möglicherweise ist Dom34 daher auch an der Translation des Pmt5-Proteins beteiligt, was mit Hilfe von Reporterfusionen des *PMT5*-Promotors wie im Fall von *PMT1* in zukünftigen Experimenten aufgeklärt werden soll.

3.10 Funktionsanalyse eines mutierten Dom34^{Glu21-Ala}

Ein neuerer Aspekt der Funktion von Dom34, neben der schon früher vermuteten Rolle als Translationsfaktor, ist die Beteiligung des Dom34-Proteins am sogenannten „mRNA no-go-decay“. Bei diesem Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle werden mRNAs mit einer Blockade des Ribosoms während der Translation erkannt und durch eine Endonuklease gespalten. Von Doma und Parker konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Dom34 zusammen mit Hbs1 am no-go-decay beteiligt ist (Doma und Parker, 2006). Weiterhin konnte von Lee *et al.* (2007) für ein Mitglied der Proteinfamilie, dem Pelota-Protein aus *Thermoplasma acidophilum* (*Ta*), die Proteinstruktur mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt werden. Die Aminosäuresequenz im Bereich der wichtigen Strukturmerkmale ist dabei innerhalb der Dom34/Pelota-Proteine konserviert. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt ist, ist das Dom34-Protein aus drei Domänen aufgebaut.

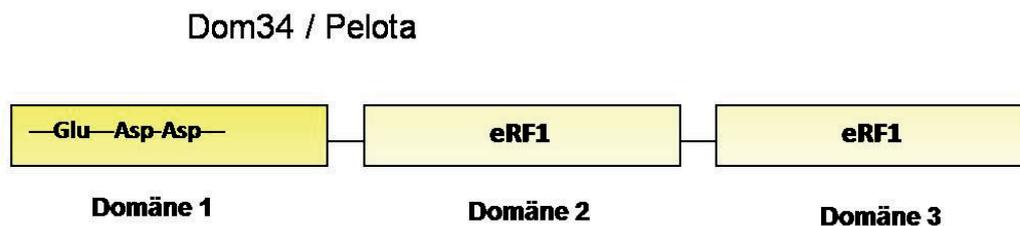


Abb. 3.22: Schematischer Aufbau der Proteine der Dom34/Pelota-Familie.

Glu, Asp, Asp bezeichnet die konservierten Aminosäuren in Domäne 1 der Dom34/Pelota-Proteine, eRF1 bezeichnet die Homologie der Domäne 2 und 3 zu entsprechenden Domänen des eukaryotischen Translations-Terminationsfaktors eRF1.

Domäne 2 und Domäne 3 weisen wie im letzten Abschnitt erläutert Homologie zur entsprechenden Domäne von eRF1 auf. Domäne 1 zeigt dagegen eine völlig von Domäne 1 des eRF1-Proteins abweichende Struktur und andere Motive, was auf eine von eRF1 abweichende Funktion des Dom34-Proteins hinweist. Es konnte gezeigt werden, dass *TaPelota* und *ScDom34* eine Endoribonuclease-Aktivität haben, weshalb von den Autoren postuliert wurde, dass Dom34 die Funktion der RNase im no-go-decay übernimmt (Lee *et al.*, 2007). Durch Deletionsanalysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Domäne 1 die Ribonuclease-Funktion des Proteins vermittelt und drei konservierte Aminosäuren vermutlich Teil des aktiven Zentrums sind. Insbesondere zeigte eine mutierte Version des *TaPelota*-Proteins mit einem Austausch der konservierten Glutaminsäure 18 keine RNase-Aktivität mehr. Ob Dom34 auch in *Candida* eine solche RNase-Funktion aufweist und ein mRNA-Kontrollmechanismus wie der no-go decay existiert ist bisher unbekannt. Da die Glutaminsäure an Position 18 essentiell für die Funktion des *TaPelota*-Proteins und in allen Dom34/Pelota-Proteinen konserviert ist, sollte zunächst untersucht werden, ob diese Aminosäure auch in *Candida* eine Bedeutung für die Funktion von Dom34 hat. Dazu sollte derselbe Austausch der konservierten Glutaminsäure wie in *TaPelota* vorgenommen und danach geprüft werden, ob dieses mutierte Dom34-Protein noch funktionell in der

Suppression der verschiedenen *pmt1*Δ-Phänotypen ist. Zunächst wurde die konservierte Glutaminsäure, im *CaDom34*-Protein an Position 21 (ClustalW-Alignment *CaDom34*; Kluge, 2006), im *Dom34*-Überexpressionsvektor pSK2 mit Hilfe einer Mutagenese-PCR mit den Primern *Dom34*(Glu-Ala)for und *Dom34*(Glu-Ala)rev wie in *TaPelota* gegen einen Alaninrest ausgetauscht. Das entstandene Plasmid zur Überexpression des mutierten *Dom34*_{Glu21-Ala} wurde pSK2mut genannt. Abbildung 3.23 zeigt die Auswirkungen der Überexpression des mutierten *Dom34*-Proteins auf die verschiedenen *pmt1*-Phänotypen.

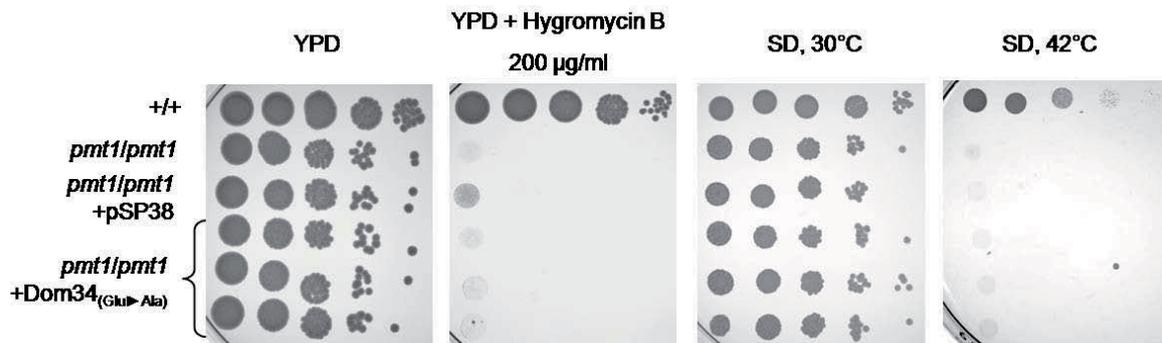


Abb. 3.23: Einfluss der Überexpression eines mutierten *DOM34*_{Glu21-Ala} auf den *pmt1*-Phänotyp.

Die Stämme CAF2-1 (+/+), SPCa2 (*pmt1/pmt1*), CAP1-3121 + pSP38 (*pmt1/pmt1* + Leervektor) und drei Transformanten des Stamms CAP1-3121 + pSK2mut (*pmt1/pmt1* + *DOM34*_{Glu21-Ala}) wurden auf ihre Sensitivität gegenüber Hygromycin B und einer erhöhten Wachstumstemperatur von 42 °C untersucht. Die Verdünnungen der verschiedenen Stämme wurden wie in Abb 3.1 beschrieben auf die angegebenen Medien getropft.

Wie deutlich zu erkennen ist, supprimiert eine überexprimierte *Dom34*_{Glu21-Ala}-Version weder den Temperaturphänotyp noch den Hygromycin B-Phänotyp einer *pmt1*-Mutante, wie dies für die Überexpression des unveränderten *Dom34* beobachtet werden kann. Da der Austausch von Glutaminsäure 21 offensichtlich zu einem Funktionsverlust des *Dom34*-Proteins führt, ist diese konservierte Aminosäure wie in *TaPelota* auch in *Candida* essentiell für die Funktion von *Dom34*. Da der Glutaminsäurerest notwendig für die RNase-Funktion von *TaPelota* ist, könnte das Ergebnis auf eine mögliche RNase-Funktion von *Dom34* auch in *Candida* hindeuten. Das *Dom34*-Protein könnte jedoch auch eine andere Funktion in *Candida* haben, die aber durch die gleichen konservierten Reste vermittelt werden kann, wie etwa eine RNA-Bindung im Rahmen der Translation. In weiteren Experimenten sollte deshalb versucht werden, die genaue Funktion von *Dom34* in *Candida* weiter aufzuklären.

3.11 Aufreinigung von *CaDom34* aus *E. coli*

Für weitere Funktionsanalysen von *Dom34* sollte das Protein isoliert werden. Das isolierte *Dom34*-Protein sollte dann zum einen in einen RNase-Assay eingesetzt werden, um eine mögliche Ribonuklease-Funktion von *Dom34* in *Candida* überprüfen zu können. Weiterhin sollte mit dem Protein eine *in vitro*-Translation durchgeführt werden um die postulierte Funktion von *Dom34* bei der Translation bestimmter Proteine direkt zu untersuchen. Um möglichst einfach und effizient größere Mengen des Proteins zu erhalten, sollte *CaDom34* heterolog in *E. coli* produziert werden. Das Zielprotein wird dabei fusioniert mit einem Poly-Histidin-Epitop von einem *E. coli*-Expressionsvektor überproduziert und kann nach Lyse der

Zellen mit Hilfe von Affinitätschromatographie über eine Nickel-NTA-Matrix aufgereinigt werden. Zunächst musste der *CaDOM34*-ORF in einen geeigneten Expressionsvektor für die Produktion in *E. coli* kloniert werden. Es wurden verschiedene *E. coli*-Standardexpressionsvektoren getestet, bei denen das Protein regulierbar unter der Kontrolle des T7-Promotors produziert wird. Nach erfolglosen Proteinreinigungsversuchen mit Vektoren, die das Protein N-terminal mit einem Hexa-Histidin-Tag fusioniert exprimieren, wurde schließlich der Vektor pET22b verwendet, der eine C-terminale Fusion des Proteins mit einem Deca-Histidin-Tag exprimiert. Zunächst wurde in einer PCR mit den Primern Dom34-NdeI-FW und Dom34-XhoI-RV-Stopp der *DOM34-ORF* amplifiziert. Als Template diente dabei genomische DNA aus *C. albicans*. Durch die verwendeten Primer wurde das PCR-Produkt gleichzeitig mit Überhängen versehen, die am 5'-Ende die *NdeI*-Erkennungssequenz und am 3'-Ende die *XhoI*-Erkennungssequenz enthielten. Durch Schneiden des PCR-Produkts mit *NdeI* und *XhoI* entstanden so kohäsive Enden für eine Ligation mit dem Vektor. Das Fragment wurde in den ebenfalls mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET22b integriert (Michaela Geradts und Denis Tielker, pers. Mitteilung). Der resultierende Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt) und pET22b-Dom34 genannt. Für die Proteinproduktion wurde der *E. coli*-Stamm BL21 eingesetzt und mit pET22b-Dom34 transformiert. Zur Vermeidung einer Aggregatbildung des Dom34-Proteins wurde nach der Induktion eine niedrige Inkubationstemperatur von 20 °C gewählt (Lee *et al.*, 2007). Unter Verwendung des Vektors pET22b-Dom34 mit C-terminaler Deca-Histidin-Fusion konnte Dom34 erfolgreich aus *E. coli* über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt werden. Wie in Abbildung 3.24 deutlich zu erkennen ist, ist bei einer Elution mit 500 mM Imidazol in den Fraktionen 17-20 eine Proteinbande auf der Höhe von 45- 50 kDa nachweisbar. Durch Massenspektrometrie wurde bestätigt, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um Dom34 handelt.

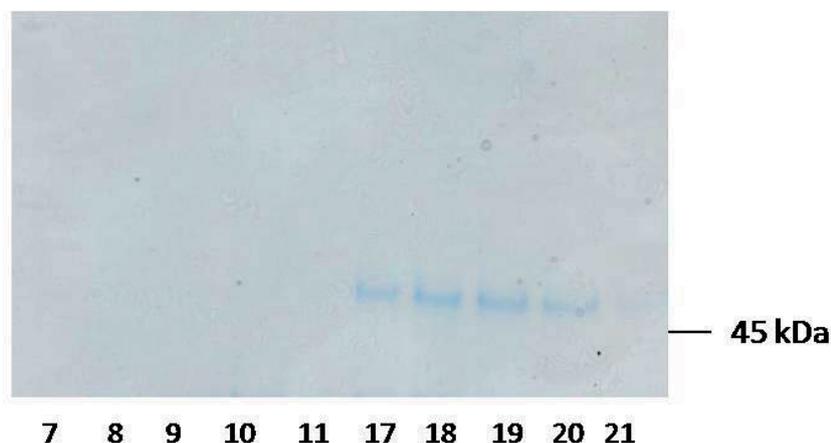


Abb. 3.24: Aufreinigung von *CaDom34* nach heterologer Expression in *E. coli*.

Nach dem Zellaufschluss wurde das Dom34-Protein aus dem gefilterten Rohextrakt mit Hilfe des ÄKTaprime plus über eine NiNTA-Matrix aufgereinigt. Gezeigt ist die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung der verschiedenen Protein-haltigen Fraktionen (7-11, 17-21) nach Elution mit 500 mM Imidazol.

In nachfolgenden Arbeiten wurde der *DOM34 E. coli*-Expressionsvektor pET22b-Dom34 noch modifiziert. Bei der Sequenzierung von pET22b-Dom34 aus verschiedenen Transformanten während der Konstruktion des Vektors fielen mehrere Basenaustausche der codierenden *DOM34*-Sequenz auf, die in den verschiedenen Transformanten mit unterschiedlicher Häufigkeit immer wieder auftraten. Solche unterschiedlichen Sequenzen des codierenden Bereichs eines Gens können bei diploiden Organismen durch abweichende Sequenzen der beiden Allele eines Gens bezüglich einzelner Basen hervorgerufen werden. Da sich durch die genomische Amplifikation des *DOM34*-Gens unterschiedliche Sequenzen ergaben, sollte die Sequenz des *DOM34*-Überexpressionsvektors pSK2 verwendet werden, bei deren Expression eine Funktionalität des Dom34-Proteins in Form des Einflusses auf den *pmt1*-Phänotyp nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurde die codierende *DOM34*-Sequenz noch einmal von Plasmid pSK2 als Template amplifiziert und wie oben beschrieben in pET22b integriert (Simone Esch, persönliche Mitteilung). In einer weiteren Optimierung des *DOM34*-Expressionsvektors soll zudem durch eine Mutagenese eine Anpassung der *DOM34*-Gensequenz für die Expression in *E. coli* entsprechend des abweichenden Codon-Gebrauchs von *C. albicans* vorgenommen werden. In *C. albicans* wird das Codon CUG nicht wie in den meisten anderen Organismen, einschließlich *E. coli*, in Leucin, sondern Serin übersetzt (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995), was theoretisch zu einer Funktionseinschränkung des Proteins bei einer heterologen Expression in *E. coli* führen könnte. Für die Funktionalität des Dom34-Proteins in den folgenden Experimenten, insbesondere dem Nachweis einer RNase-Aktivität, ist dieser Aminosäureaustausch jedoch vermutlich von geringer Bedeutung, da das einzige CUG-Codon des *DOM34*-Gens für ein Serin in Domäne 3 des Dom34-Proteins codiert, die für eine RNase-Aktivität des *TaPelota*- und *ScDom34*-Proteins nicht benötigt wird (Lee *et al.*, 2007).

3.12 RNase-Aktivität von Dom34

In ersten Versuchen wurde das mit pET22b-Dom34 in *E. coli* produzierte, gereinigte Dom34-Protein auf eine potentielle Ribonuklease-Aktivität untersucht. Unter den von Lee *et al.* (2007) für den Nachweis der Ribonuklease-Aktivität von *TaPelota* und *ScDom34* beschriebenen Bedingungen konnte jedoch keine eindeutige RNase-Aktivität von Dom34 gegenüber einem Gesamt-RNA Substrat aus *C. albicans* nachgewiesen werden (Simone Esch, persönliche Mitteilung).

3.13 Lokalisation von Dom34

Im Rahmen einer möglichst vollständigen Untersuchung der Funktion von Dom34 sollte auch die intrazelluläre Lokalisation des Proteins analysiert werden. Dies sollte zum einen durch einen mikroskopischen Nachweis des Proteins mit Hilfe von Immunofluoreszenz und andererseits durch fraktionierte Zentrifugation erfolgen. Bei der fraktionierten Zentrifugation von Zelllysaten werden die verschiedenen Zellkomponenten durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte mit zunehmenden Umdrehungszahlen nach ihren Sedimentationseigenschaften separiert. Durch eine anschließende Westernblotanalyse der einzelnen Fraktionen kann so die Verbreitung des untersuchten Proteins in den einzelnen Zellkompartimenten analysiert werden. Wie schon für die Co-Immunopräzipitation wurde für die Lokalisationsexperimente zunächst ein Wildtypstamm verwendet, der das Dom34-Protein als Flag-markierte Version von Plasmid pSK2 exprimiert. Erste Versuche einer fraktionierten Zentrifugation mit diesem Stamm zeigten jedoch, dass sich Dom34^{Flag} aufgrund starken Hintergrunds schwer eindeutig in den einzelnen Zellfraktionen detektieren ließ (Daten nicht

gezeigt). Da das mit dem Flag-Epitop markierte Dom34-Protein auch in vorherigen Westernblot-Analysen immer starke Nebenbanden zeigte (vgl. Abschnitt 3.5 und Abb. 3.25), sollte Dom34 für die Lokalisation, insbesondere auch für die geplante Immunofluoreszenz, mit einem alternativen Epitop markiert werden. Da in *C. albicans* andere Proteine wie Pmt1 und Pmt2 erfolgreich mit dem HA-Epitop markiert wurden (vgl. Abschnitt 3.5), sollte dieses Epitop auch für Dom34 verwendet werden. Dabei sollte eine genomische Markierung durch Fusion eines *DOM34*-Allels mit dem HA-Epitop erfolgen. Diese Methode bietet gegenüber einer Plasmidexpression des markierten Proteins den zusätzlichen Vorteil, dass keine Überexpression durch zusätzlich in die Zelle gebrachte Kopien des Gens vorliegt und möglicherweise das Ergebnis einer Lokalisation des Proteins verfälscht.

3.13.1 Markierung von Dom34 mit dem HA-Epitop

Die Markierung erfolgte über homologe Rekombination mit einem PCR-generierten Fragment, wie von Inga Schmidt für die Markierung von Pmt1 und Pmt2 mit dem HA-Epitop beschrieben (Schmidt, 2007). Als Template diente das Plasmid p3HA-URA3, welches das HA-Epitop in dreifacher Kopie sowie den *URA3*-Marker für die Selektion in *Candida* trägt. Für die Amplifikation des Fragments wurden die Primer Dom34-HA-for und Dom34-HA-rev verwendet, die etwa 100 bp lange Überhänge mit Homologie zum genomischen *DOM34*-Lokus enthielten. Die Homologie wurde dabei so gewählt, dass durch homologe Rekombination bei der anschließenden Transformation des PCR-Produkts das HA-Epitop über einen Linker aus drei Glycin-Resten mit dem *DOM34*-Gen fusioniert wird (Abbildung 3.25).

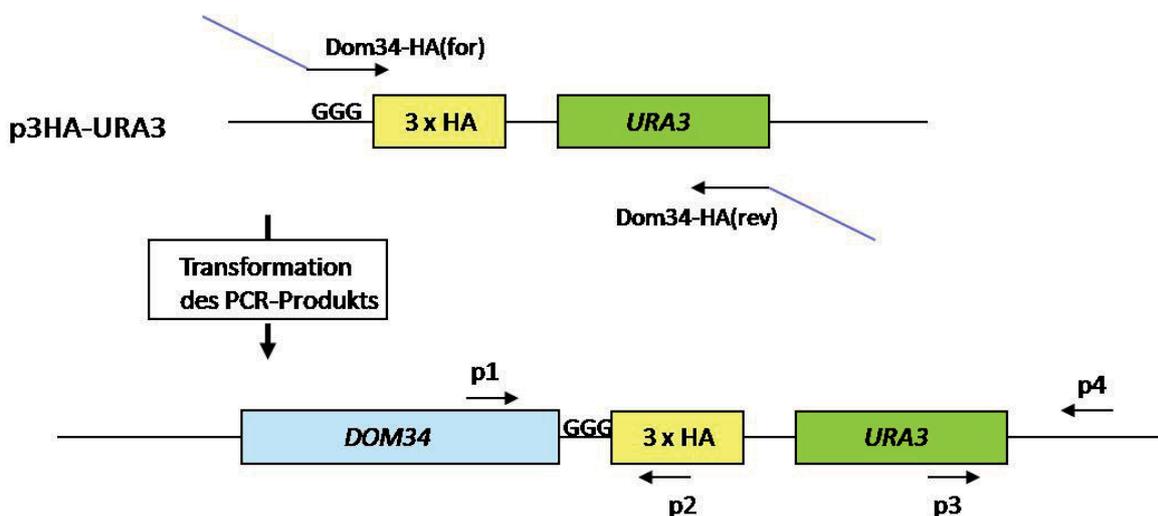


Abb. 3.25: Schema der genomischen Markierung von *DOM34* mit dem HA-Epitop.

Schwarze Pfeile symbolisieren die Primer zur Amplifikation des *HA-URA3*-Fragments bzw. die Primer zur Überprüfung der Integration. **p1**: p1-Dom34-HA, **p2**: p2-Dom34-HA, **p3**: p3-Dom34-HA, **p4**: p4-Dom34-HA.

Das PCR-Produkt mit einer Länge von 2,8 kb wurde in den Wildtypstamm CAI4 transformiert. Die korrekte Integration des Fragments stromabwärts des *DOM34*-Gens wurde in einer Kolonie-PCR mit den Primerpaaren p1-Dom34-HA und p2-Dom34-HA sowie p3-Dom34-HA und p4-Dom34-HA überprüft, wobei sich Fragmentgrößen von 462 bp bzw. 720 bp ergaben. Die verifizierten Transformanten wurden anschließend in einer

Westernblotanalyse auf die Produktion des markierten Dom34^{HA} Proteins überprüft. Von den fünf untersuchten Transformanten konnte bei Nr. 2 und 3 eine Bande bei ca. 45 kDa detektiert werden, was der erwarteten Größe des Dom34^{HA} Proteins entspricht (Abb. 3.26). Im Gegensatz zum bisher eingesetzten Dom34^{Flag} kann das neu markierte Dom34^{HA} Protein in einer intensiven Einzelbande ohne Hintergrundbanden detektiert werden und eignet sich daher besser für die anschließenden Lokalisationsversuche des Dom34-Proteins. Die beiden unabhängigen Dom34^{HA} markierten Stämme wurden JHCa1-1 und JHCa1-2 genannt.

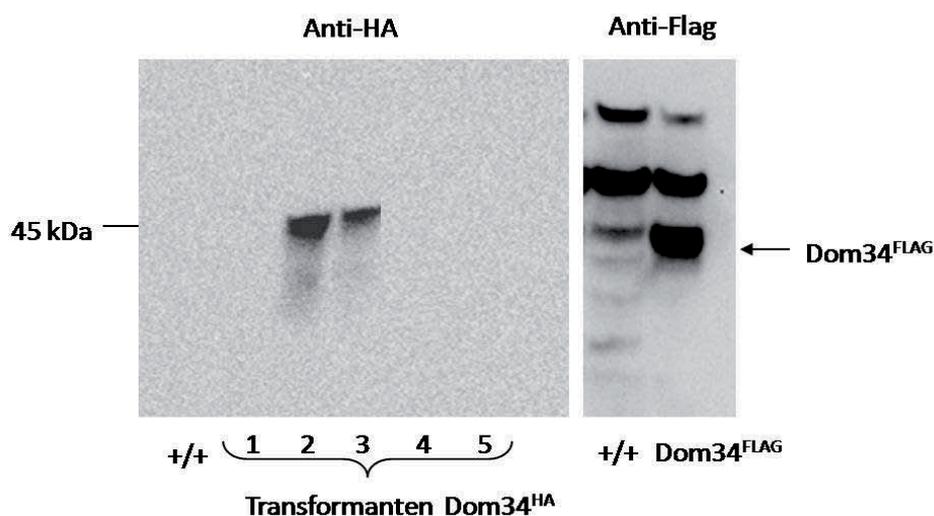


Abb. 3.26: Immunoblotanalyse der Dom34^{HA}-Stämme. Fünf Transformanten des *HA-URA3*-Fragments im Stamm CAI4 wurden auf die Detektierbarkeit des Epitop-markierten Dom34^{HA}-Proteins in einem Anti-HA Immunoblot überprüft (links). Als Vergleich wurde das Dom34^{Flag}-Protein im Stamm CAI4 + pSK2 in einem Anti-Flag Immunoblot detektiert (rechts).

3.13.2 Fraktionierte Zentrifugation

Bei der Lokalisation von Dom34 durch fraktionierte Zentrifugation wurden beide unabhängigen Dom34^{HA}-Stämme parallel untersucht sowie außerdem der Pmt1^{HA}-markierte Stamm Pmt1-HA(URA) (vgl. Abschnitt 3.5) als Kontrolle und Marker für die Fraktion des endoplasmatischen Retikulums (ER). Für die Separierung der einzelnen Zellkompartimente wurden die Zellen zunächst sphäroplastierte, die Sphäroplasten aufgeschlossen und das Zelllysate anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten von 10000 \times g und 100000 \times g fraktioniert. Als Zellfraktionen ergeben sich bei der Sphäroplastierung die periplasmatische Fraktion und nach dem Zellaufschluss der Rohextrakt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 10000 \times g sedimentieren die schwereren Zellorganellen im Pellet, so dass diese Fraktion den Zellkern und das ER enthält. Bei 100000 \times g sedimentieren auch alle übrigen Zellorganellen, diese Fraktion enthält den Golgi und alle kleineren Membrankompartimente wie Lysosomen. Die letzte Fraktion, der Überstand nach Zentrifugation bei 100000 \times g, enthält nur noch das Cytosol. Abbildung 3.27 zeigt die Westernblot-Analyse der Fraktionierung für die beiden Dom34^{HA}-Stämme und den Pmt1^{HA}-Stamm.

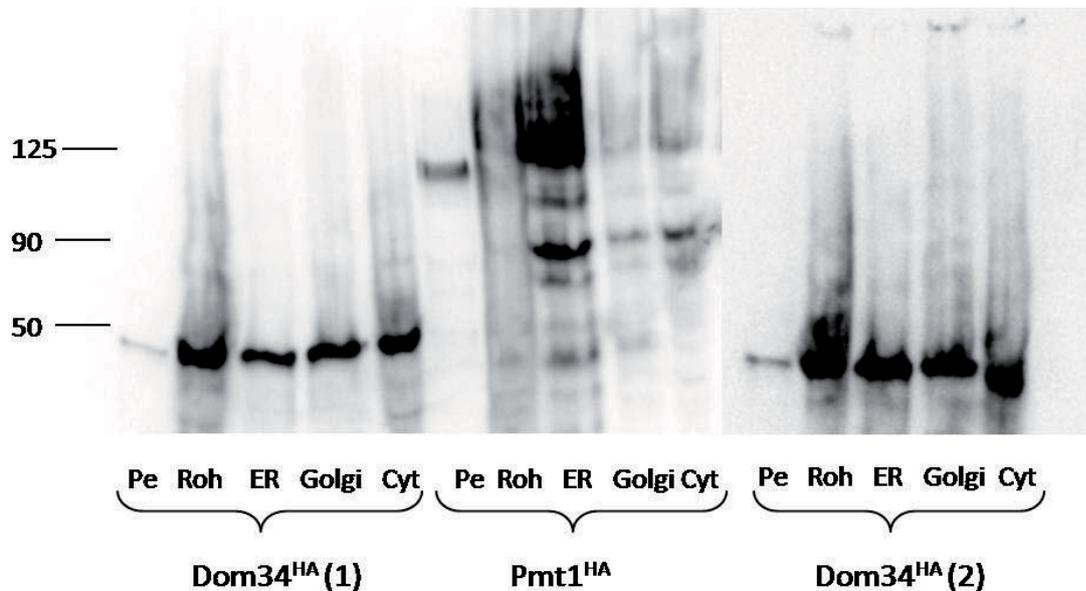


Abb. 3.27: Lokalisation des Dom34^{HA}-Proteins durch fraktionierte Zentrifugation.
 Rohextrakte der Stämme JHCa1-1 (*DOM34/DOM34^{HA}*), JHCa1-2 (*DOM34/DOM34^{HA}*) und Pmt1-HA(URA) (*PMT1/PMT1^{HA}*) wurden durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte fraktioniert. Gleiche Aliquots entsprechend $\frac{1}{5}$ Gesamtvolumen jeder Fraktion wurden in einer Immunoblotanalyse mit einem Anti-HA Antikörper analysiert. Pe: Periplasma; Roh: Rohextrakt; ER: Endoplasmatisches Retikulum (Pellet nach 10000 x g Zentrifugation); Golgi (Pellet nach 100000 x g Zentrifugation); Cyt: Cytosol (Überstand nach 100000 x g Zentrifugation)

Wie gut zu sehen ist, wird Pmt1^{HA} hauptsächlich in der ER-Fraktion detektiert, was der natürlichen Lokalisation des Proteins entspricht und als Kontrolle die erfolgreiche Fraktionierung der Zellbestandteile belegt. Die anderen Zellfraktionen enthalten nur geringe Mengen des Pmt1-Proteins. Lediglich in der periplasmatischen Fraktion ist ebenfalls eine dünne Bande des Proteins nachweisbar. Diese ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der Sphäroplastierung immer ein gewisser Anteil der Zellen lysiert und somit keine reine Periplasma-Fraktion gewonnen werden kann. Für Dom34^{HA} zeigte sich dagegen, dass das Protein mit einer gleichmäßigen Verteilung in relativ äquivalenten Mengen in allen Fraktionen detektiert wird. Diese Beobachtung bestätigte sich bei der Untersuchung des zweiten unabhängigen Dom34^{HA} Stamms. Das Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation legt somit nahe, dass Dom34 nicht spezifisch in einem Zellkompartiment lokalisiert ist, sondern gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt vorliegt.

3.13.3 Immunofluoreszenz von Dom34^{HA} (*C. albicans*)

Mit den neu konstruierten Dom34^{HA}-Stämmen sollte zugleich auch eine Immunofluoreszenz des Dom34^{HA}-Proteins durchgeführt werden. Das Protein wurde in *Candida* Hefe-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzantikörpern markiert. Anschließend wurde die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopie der Zellen zeigt Abbildung 3.28.

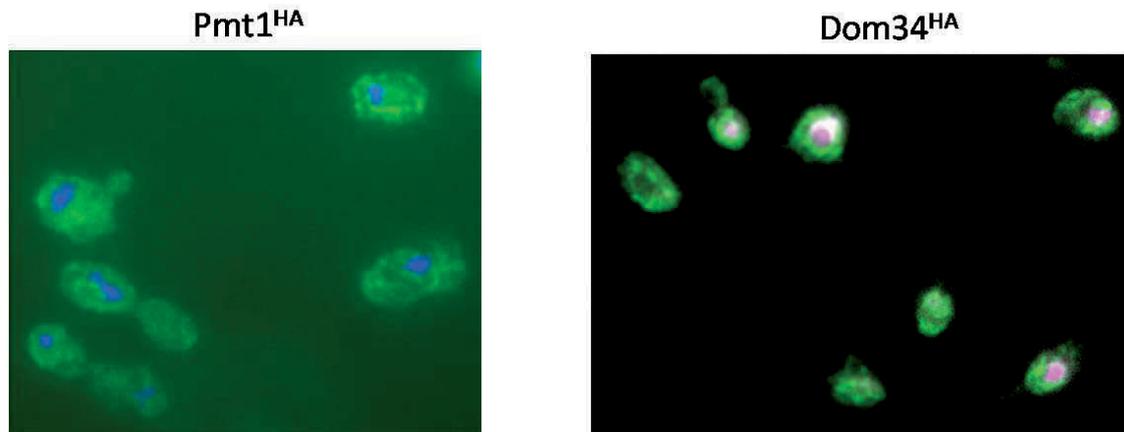


Abb. 3.28: Immunofluoreszenz des Dom34^{HA}-Proteins (*C. albicans*).

Zellen des Stamms JHCa1-1 (*DOM34/DOM34^{HA}*) und Pmt1-HA(URA) (*PMT1/PMT1^{HA}*) wurden mit Formaldehyd fixiert und mit einem primären Anti-HA und einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper Fluoreszenz-markiert (grüne Färbung). Der Kern wurde durch eine Färbung mit DAPI (blaue/violette Färbung) markiert und die Zellen mit einem Apotom-Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss mikroskopiert.

Als Vergleich diente wie in Abschnitt 3.10.2 beschrieben der Stamm Pmt1-HA(URA) mit dem Pmt1^{HA}-Protein als Marker für das ER. Für Pmt1^{HA} ergab sich in der Fluoreszenzmikroskopie wie von Inga Schmidt (Schmidt, 2007) beschrieben eine ringförmige oder netzartige Lokalisierung des Proteins um den Kern herum, das typische Erscheinungsbild eines ER-assoziierten Proteins. Die Fluoreszenz des Dom34^{HA}-Proteins zeigte dagegen hauptsächlich eine diffuse Verteilung im gesamten Zelllumen. Eine ringförmige Konzentration des Fluoreszenzsignals, ähnlich der Pmt1^{HA}-Fluoreszenz, konnte darüber hinaus in einigen Zellen beobachtet werden und könnte auf eine mögliche ER-Assoziation des Dom34-Proteins zusätzlich zu der beobachteten cytosolischen Lokalisation in diesen Zellen hindeuten. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie bestätigt jedoch insgesamt das Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation, dass Dom34 keine ausschließliche, spezifische Beschränkung auf ein einzelnes Zellkompartiment aufweist.

3.14 Immunofluoreszenz von Dom34^{HA} (*S. cerevisiae*)

Auch in *S. cerevisiae* wurde die Lokalisation von Dom34 noch nicht eindeutig aufgeklärt. Im Rahmen der Charakterisierung von *DOM34* in *S. cerevisiae* (Wickert, 1998) wurde lediglich eine fraktionierte Zentrifugation durchgeführt, in der sich das Dom34-Protein hauptsächlich in der ER Fraktion nachweisen ließ. Aus diesem Grund sollte für eine vollständige Charakterisierung auch noch in *S. cerevisiae* eine Immunofluoreszenz des Dom34-Proteins durchgeführt werden. Hierzu wurde wie von Wickert beschrieben (Wickert, 1998) der *S. cerevisiae*-Stamm SEY-6210 mit dem Plasmid pSW25 transformiert, das *DOM34* ebenfalls fusioniert mit dem HA-Epitop unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors exprimiert. Zunächst wurden Rohextrakte von Galaktose-induzierten Zellen in einer Westernblot-Analyse auf die Detektierbarkeit des Dom34^{HA} Proteins überprüft (Daten nicht gezeigt). Da das Protein gut mit einem Anti-HA-Antikörper nachweisbar war, wurden diese Stämme für die anschließende Immunofluoreszenz eingesetzt.

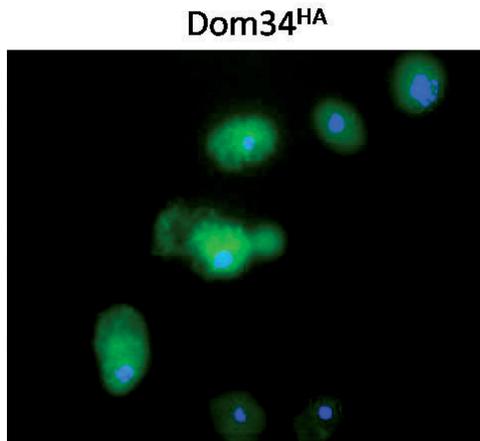


Abb. 3.29: Immunofluoreszenz des Dom34^{HA}-Proteins (*S. cerevisiae*).

Es wurden Zellen des Stamms SEY-6210 + pSW25 (Wildtyp + *DOM34*^{HA}) untersucht. Die Fluoreszenzmarkierung des Dom34^{HA}-Proteins erfolgte wie in Abb. 3.28 beschrieben.

Die Mikroskopie der Zellen zeigte eine Fluoreszenz in der gesamten Zelle, jedoch besonders intensiv konzentriert in vielen einzelnen granulären Strukturen (vgl. Abb. 3.29). Diese Konzentration des Proteins in einzelnen Punkten kann jedoch ein Artefakt darstellen, da es sich hier um eine Überexpression von *DOM34* durch eine zusätzliche Kopie des Gens auf einem Plasmid handelt. Die Fluoreszenzmikroskopie von Dom34^{HA} in *S. cerevisiae* deutet somit im Gegensatz zum Ergebnis der fraktionierten Zentrifugation von Wickert (1998) eher auf eine Verteilung des Proteins in der ganzen Zelle hin. Eine solche Verteilung entspräche den Beobachtungen in *C. albicans*.

4. Diskussion

C. albicans ist einer der wichtigsten humanpathogenen Pilze, der insbesondere bei immunsupprimierten Personen zu gefährlichen systemischen Infektionen führen kann. Eine bedeutende Rolle für die Pathogenität des Pilzes spielen dabei verschiedene *O*-glykosylierte Proteine, die sowohl spezifisch als Adhäsine, als auch unspezifisch durch hydrophobe Wechselwirkungen der Mannoproteine der Zellwand die Adhäsion an Wirtsepithelien vermitteln. Auch weisen verschiedene Protein-*O*-Manosyltransferase-Mutanten Defekte in der Hyphenmorphogenese auf, die ebenfalls eine elementar wichtige Pathogenitätseigenschaft darstellt. In *S. cerevisiae* wurde Dom34 als ein Faktor identifiziert, der an der *O*-Glykosylierung verschiedener Proteine in diesem Organismus beteiligt ist (Finck *et al.*, 1996; Wickert, 1998). Insbesondere konnte eine genetische Interaktion zwischen *DOM34* und *PMT1* nachgewiesen werden (Wickert, 1998).

4.1 *DOM34* und *PMT1* zeigen genetische Interaktion in *C. albicans*

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Dom34 auch in *C. albicans* die *O*-Glykosylierung beeinflusst. Obwohl eine *dom34*-Mutante keinen direkten Glykosylierungsphänotyp in Form hypoglykosylierter Proteine oder anderer *O*-Glykosylierung-spezifischer Defekte wie in *S. cerevisiae* zeigte (Kluge, 2006; diese Arbeit), konnte durch die verschiedenen Untersuchungen der Protein-*O*-Mannosyltransferase-Mutante *pmt1* nachgewiesen werden, dass eine genetische Interaktion zwischen *DOM34* und *PMT1* existiert. Der synthetische Phänotyp einer Doppeldeletionsmutante von *DOM34* und *PMT1* einer verstärkten Sensitivität gegenüber Hygromycin B belegt diese genetische Interaktion ebenso wie die beobachtete Suppression der *pmt1*-Sensitivitäten gegenüber Hygromycin B und einer Temperatur von 42 °C durch eine *DOM34*-Überexpression (vgl. Abb. 3.1 und 3.3). Während der Wachstumsphänotyp der *pmt1*-Mutante bei 42 °C vermutlich durch den Funktionsverlust einzelner Proteine verursacht wird, die als Folge fehlender *O*-Glykane bei einer erhöhten Temperatur instabil sind, ist die Ursache der Hypersensitivität einiger *O*- und *N*-Glykosylierungsmutanten gegen das Aminoglykosid Hygromycin B unklar (Dean, 1995). Aminoglykoside wie Hygromycin B binden an die kleine Ribosomenuntereinheit und inhibieren dadurch die Translokation der Polypeptidkette und letztlich die Proteinbiosynthese (Rao und Grollman, 1967; Brodersen *et al.*, 2000). Ein Versuch einer Erklärung der erhöhten Sensitivität von Glykosylierungsmutanten ist die Hypoglykosylierung eines Multi-Drug Resistance- (MDR)-Transporters, der in Wildtypzellen Substanzen wie Aminoglykoside aus der Zelle schleust (Sanglard *et al.*, 1997). Das Auftreten einer genetischen Interaktion von *DOM34* und *PMT1* im Bezug auf diese Phänotypen allein könnte nicht zwangsläufig als Beweis einer Beteiligung von Dom34 an der *O*-Glykosylierung bewertet werden, da theoretisch auch andere Funktionen eines Gens bei einer Deletion zu solchen Phänotypen führen und somit einen synthetischen Phänotyp mit einer *O*-Glykosylierungsmutante oder dessen Suppression über einen anderen, von der *O*-Glykosylierung unabhängigen Mechanismus hervorrufen können. So könnte ein Einfluss von *DOM34* auf die Hygromycin B-Sensitivität der Zelle beispielsweise durch eine direkte Wirkung des Dom34-Proteins auf die ribosomalen Untereinheiten ohne eine Einflussnahme auf *O*-Glykosylierungs-Defekte vermittelt werden. Die Hygromycin B-Sensitivität des Wildtyps wird jedoch nicht durch eine

DOM34-Überexpression beeinflusst, wie es im Falle eines solchen unabhängigen Mechanismus erwartet werden könnte.

4.2 Dom34 beeinflusst die *O*-Glykosylierung von Kre9 unter Beteiligung von *PMT5* und *PMT6*

Eine Überexpression von *DOM34* supprimierte den Hyphenbildungs-Defekt einer *pmt1*-Mutante auf festen Induktionsmedien (vgl. Abb. 3.4). Die Filamentierungsphänotypen der einzelnen *pmt*-Mutanten werden dabei vermutlich nicht durch defekte Strukturproteine ausgelöst, da die *pmt*-Mutanten Hyphen in flüssigem Induktionsmedium bilden können, sondern resultieren vermutlich teilweise aus der Unterglykosylierung von Komponenten der verschiedenen Signalwege, die die Hyphenbildung unter unterschiedlichen Umweltbedingungen induzieren (Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Dies konnte im Fall der *pmt6*-Mutante gezeigt werden, deren Filamentierungsphänotyp durch Überproduktion von Komponenten solcher Signalwege, wie Efg1 und Tpk2 des cAMP-abhängigen Hypheninduktionswegs oder Cph1 und Cek1 des MAP-Kinase-Wegs, unterdrückt wird (Timpel *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre denkbar, dass Dom34 ebenfalls eine Komponente der in *pmt*-Mutanten unterbrochenen Signalwege stimuliert, oder direkt den Defekt der *O*-Glykosylierung aufhebt. Einen eindeutigen Nachweis der direkten oder indirekten Beteiligung von *DOM34* an der *O*-Glykosylierung stellt die Suppression der reduzierten *O*-Glykosylierung eines Zielproteins dar. Während der *O*-Glykosylierungsdefekt der Pmt1-Zielproteine Als1 und Pir1 durch *DOM34* unbeeinflusst bleibt, wird durch Überexpression von *DOM34* für die *O*-Glykosylierung von Kre9 in der *pmt1*-Mutante teilweise der Wildtypstatus erreicht (vgl. Abb. 3.7). Diese Rekonstituierung der *O*-Glykosylierung eines Pmt1-Zielproteins durch *DOM34* kann durch einen stimulierenden Einfluss von Dom34 auf andere Pmt-Isoformen erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl *PMT5* als auch *PMT6* für die Suppression der verschiedenen Sensitivitäten der *pmt1*-Mutante durch *DOM34* benötigt werden (vgl. Abb. 3.9). Es kann daher vermutet werden, dass eine stimulierende Wirkung von *DOM34* auf Pmt5 und Pmt6 für die partielle Kompensation des *O*-Glykosylierungsphänotyps der *pmt1*-Mutante verantwortlich ist. Ein stimulierender Einfluss von *DOM34* auf Pmt5 und Pmt6 würde auch die gezeigte Rekonstituierung der *O*-Glykosylierung eines Pmt1-Zielproteins durch *DOM34* erklären, während kein Effekt für die anderen untersuchten Pmt1-Substrate nachgewiesen wurde. Pmt5 und Pmt6 stellen vermutlich Protein-*O*-Mannosyltransferasen mit einer ausgeprägten Substratspezifität dar. Während sowohl Pmt1, als auch Pmt2 und Pmt4 wahrscheinlich eine große Zahl unterschiedlicher Zielproteine *O*-glykosylieren, und in Folge dessen vermutlich eine geringere Substratspezifität aufweisen, wird angenommen, dass Pmt5 und Pmt6 nur wenige spezifische Zielproteine bedienen (Prill *et al.* 2005). Es ist daher anzunehmen, dass durch die Stimulierung von Pmt5 und Pmt6 der *O*-Glykosylierungsdefekt einzelner Pmt1-Zielproteine wie beispielsweise Kre9 kompensiert werden kann, jedoch nicht der übrigen Pmt1-Substrate. Ein interessanter Nebenaspekt bezüglich der Konstruktion der *pmt1 pmt5*-Mutante ist die nachgewiesene Lebensfähigkeit einer solchen Doppel-Deletionsmutante, die Rückschlüsse auf die Dimer-Bildung der Pmt-Isoformen in *C. albicans* zulässt. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Heterodimere von Pmt1/Pmt2 sowie Pmt3/Pmt5, sowie in geringerem Ausmaß Pmt1/Pmt3 und Pmt2/Pmt5 gebildet werden, in denen jeweils ein Mitglied der Pmt1-

Subfamilie mit einem Mitglied der Pmt2-Subfamilie einen Komplex eingeht (Girrbach und Strahl, 2003). Zudem wurde nachgewiesen, dass die Komplexbildung von Pmt1 und Pmt2 essentiell für deren Mannosyltransferase-Aktivität ist (Gentzsch *et al.*, 1995). Bei einer Heterodimerisierung der Pmt-Isoformen nach dem gleichen Prinzip wie in *S. cerevisiae* würde man in *C. albicans* die Bildung eines Pmt1/Pmt2-Heterodimers sowie eines Pmt5/Pmt2-Heterodimers erwarten, da Pmt3 in *C. albicans* nicht existiert. In einer *pmt1 pmt5*-Doppeldeletionsmutante könnte jedoch keine Heterodimer-Bildung zwischen Mitgliedern der Pmt1- und Pmt2-Familie erfolgen, da alle Mitglieder der Pmt1-Familie in *C. albicans* deletiert sind. Aufgrund der Notwendigkeit der Komplexbildung für die enzymatische Aktivität der Pmt-Isoformen des Pmt1/Pmt2-Dimers in *S. cerevisiae* und der Letalität einer Mutante ohne Pmt2-Aktivität in *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005) wäre davon auszugehen, dass eine *pmt1 pmt5*-Doppeldeletionsmutante im Falle einer Dimer-Bildung von Pmt1 und Pmt2 in *C. albicans* letal wäre. Obwohl von Schmidt (2007) ein Heterodimer von Pmt1 und Pmt2 postuliert wurde, ist auf Grundlage der gleichzeitigen Deletion von *PMT1* und *PMT5* der in dieser Arbeit untersuchten *pmt1 pmt5*-Doppeldeletionsmutante anzunehmen, dass ein Pmt1/Pmt2 Heterodimer nicht die essentielle, enzymatisch aktive Form der Pmt1- bzw. Pmt2-Komplexbildung wie in *S. cerevisiae* ist. Möglicherweise tritt in *C. albicans* stattdessen ein Pmt2-Homodimer als katalytisch aktiver Komplex auf. Die Existenz eines solchen Komplexes wurde ebenfalls von Schmidt (2007) bestätigt.

4.3 Die Expression der *PMT*-Gene wird nicht durch *Dom34* beeinflusst

Durch verschiedene Ansätze sollte der Angriffspunkt der postulierten Stimulation der Protein-*O*-Mannosyltransferasen durch *DOM34* aufgeklärt werden. Eine *DOM34*-abhängige Regulation der Pmt-Isoformen auf der transkriptionellen Ebene wurde durch quantitative RT-PCR Analysen sowohl der verschiedenen *dom34*- und *pmt1*-Deletionsstämme, als auch der *DOM34*-Überexpressionsstämme der *pmt1*-Mutante ausgeschlossen, da in diesen Stämmen keine Änderung des Expressionslevels einzelner *PMT*-Gene beobachtet werden konnte, die für den synthetischen Phänotyp beziehungsweise die Kompensation des *pmt1*-Phänotyps verantwortlich sein könnten (vgl. Abb. 3.10 und 3.11). Auch konnte kein Nachweis einer Stimulation der enzymatischen Aktivität der Protein-*O*-Mannosyltransferasen durch *DOM34* in einem *in vitro* Pmt-Enzymtest erbracht werden (vgl. Abb. 3.14 und 3.15). Die Ergebnisse dieser Pmt-Aktivitätsbestimmung schließen die vermutete Stimulation von Pmt5 und Pmt6 durch *DOM34* jedoch keineswegs aus, da der *in vitro* Pmt-Test keine Aussage über einen möglichen Einfluss auf die Aktivität von Pmt5 oder Pmt6 zulässt. Der von Weston *et al.* (1993) etablierte Pmt-Enzymtest wurde bezüglich der Sequenz und Struktur des verwendeten Akzeptorpeptids für die Mannosylierung durch Pmt1 optimiert. Wie den Daten in Abb. 3.14 zu entnehmen ist, wird bei der Verwendung dieses Peptids tatsächlich nur die Mannosylierungsaktivität von Pmt1 bestimmt, da in der *pmt1*-Mutante keinerlei Aktivität einer Mannosylierung durch andere Pmt-Isoformen detektierbar war. Dementsprechend war es nicht möglich, für die Überexpression von *DOM34* in der *pmt1*-Mutante eine gesteigerte Mannosylierungsaktivität der übrigen Proteinmannosyltransferasen zu überprüfen. Die einzige Aussage, die auf der Basis der Ergebnisse des *in vitro* Pmt-Tests getroffen werden kann, ist somit, dass eine *DOM34*-Deletion keinen Einfluss auf die Aktivität von Pmt1 hat. Für den Nachweis einer *DOM34*-abhängigen Stimulation von Pmt5 und Pmt6 müsste die

Sequenz des im Enzymtest verwendeten Akzeptorpeptids für die Mannosylierung durch diese Proteinmannosyltransferasen modifiziert werden, was aufgrund der unbekanntenen Erkennungssequenz der *O*-Glykosylierung für die verschiedenen Pmt zum momentanen Zeitpunkt nicht realisierbar ist.

Eine direkte Protein-Protein-Interaktion, als anderer Hinweis auf eine potentielle unmittelbare Beeinflussung einzelner Pmt-Proteine, konnte ebenfalls weder zwischen Dom34 und Pmt1, noch für Dom34 und Pmt2 nachgewiesen werden (vgl. Abb 3.16 und 3.17).

4.4 Dom34 stimuliert die Translation des Pmt1-Proteins

Durch die Quantifizierung der in Abhängigkeit von einer *DOM34*-Überexpression im Vergleich zum Wildtyp synthetisierten Pmt1-Proteinmenge konnte erstmals ein regulatorischer Einfluss von *DOM34* auf die Proteintranslation als möglicher Mechanismus der Beeinflussung der *O*-Glykosylierung nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein Anstieg der Menge des Pmt1-Proteins in den Zellextrakten der *DOM34*-Überexpressionsstämme (vgl. Abb. 3.18). In den Untersuchungen der Rolle von *DOM34* bei der Expression verschiedener Fusionen des *PMT1*-Promotors mit dem *RLUC*-Reportergen wurde zudem ein starker positiver Einfluss von *DOM34* auf die Reportergenexpression gefunden, der möglicherweise von einem Motiv der Sequenz CAACCA im 5'-UTR des *PMT1*-Transkripts abhängig ist (Abb. 3.20). Diese Beobachtungen deuten stark daraufhin, dass Dom34 an der Regulation der Translation des Pmt1-Proteins über ein regulatorisches Motiv der Sequenz CAACCA im 5'-UTR des *PMT1*-Transkripts beteiligt ist. Theoretisch wäre auch denkbar, dass das identifizierte Motiv ein regulatorisches Element der Transkription ist und nicht eine verstärkte Translation, sondern eine vermehrte Transkription zur gesteigerten Expression des Reporters führte, da das Motiv außerhalb des codierenden Bereichs des *PMT1*-Gens liegt, und somit nicht nur Teil des Transkripts, sondern auch Teil der Promotorregion ist. Solche regulatorischen Elemente, die stromabwärts der TATA-Box des Promotors im bereits transkribierten Bereich liegen, sind an der Regulation der Transkription mancher Gene beteiligt. So konnte für das *SRP1*-Gen in *S. cerevisiae* eine Regulation der Transkription durch eine solche „downstream activating sequence“ beobachtet werden, die im Fall von *SRP1* nicht nur im transkribierten Bereich, sondern sogar im codierenden Bereich des Gens liegt (Fantino *et al.*, 1992). Gegen eine solche Dom34-abhängige Regulation der *PMT1*-Transkription spricht jedoch die Tatsache, dass kein Einfluss einer *DOM34*-Überexpression auf den *PMT1*-Transkriptspiegel gefunden werden konnte, obwohl gleichzeitig mehr Pmt1-Protein nachgewiesen wurde. Ein weiteres wichtiges Argument für die postulierte Funktion von Dom34 als Translationsregulator des Pmt1-Proteins in *C. albicans* ist die Zugehörigkeit von *CaDom34* zu der hochkonservierten Dom34/Pelota-Proteinfamilie, die aufgrund der strukturellen Homologien zu den Terminationsfaktoren der Translation vom eRF1-Typ einer Subfamilie der eRF1-Proteinfamilie zugeordnet wird. Insbesondere unterstützt die vermutete Funktion von Dom34 bei der Regulation der Translation bestimmter mRNAs in Interaktion mit Hbs1 in *S. cerevisiae* die Hypothese einer ähnlichen Funktion in *C. albicans*. Für *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass die Defekte einer *dom34*-Mutante, insbesondere das reduzierte Auftreten von Polyribosomen und die Anhäufung von freien 40S und 60S Ribosomen-Untereinheiten, durch die Überexpression eines ribosomalen Proteins der 40S-Untereinheit komplementiert werden konnten, was einen deutlichen Hinweis auf eine

Funktion des Dom34-Proteins in der Translation darstellt (Davis und Engebrecht, 1998). Strukturanalysen des Pelota-Proteins aus *T. acidophilum* und Dom34 aus *S. cerevisiae* zeigten eine Homologie der Domänen 2 und 3 der Dom34/Pelota-Proteine zu den entsprechenden Domänen von eRF1 (Lee *et al.*, 2007; Graille *et al.*, 2008). Während die grundlegenden Strukturen in beiden Proteinfamilien identisch sind, sind die spezifisch für die Erkennung des Stopcodons und die Freisetzung der Polypeptidkette und der Dissoziation der Ribosomen-Untereinheiten durch eRF1 verantwortlichen Motive in Dom34/Pelota-Proteinen nicht zu finden. Domäne 1 der Dom34/Pelota-Proteine zeigt darüber hinaus eine von eRF1 abweichende Struktur, die Strukturmotiven der RNA-bindenden LSM-Proteine ähnelt. Diese strukturellen Daten lassen ebenfalls eindeutig eine Funktion der Dom34/Pelota-Proteine im Prozess der Translation vermuten, die aufgrund der spezifischen Unterschiede zu eRF1 vermutlich nicht die Termination betrifft.

Ein weiterer Hinweis auf die vermutete Funktion von Dom34 bei der Translation des Pmt1-Proteins in *C. albicans* könnte die beobachtete Erniedrigung des *DOM34*-Transkriptspiegels in der *pmt1*-Mutante sein (Abb. 3.12). Eine Erklärung für diese Beobachtung, die die Hypothese des Regulators der Pmt1-Translation unterstützt, wäre zum Beispiel eine mögliche negative Autoregulation des Dom34-Proteins. In einem solchen Modell würde Dom34 die Translation der *PMT1*-mRNA durch Bindung der regulatorischen Motive im 5'-UTR beeinflussen, wodurch ein gewisser Anteil des zellulären Dom34-Proteins gebunden und nicht frei in der Zelle vorliegen würde. In der *pmt1*-Mutante hingegen findet keine Bindung an die *PMT1*-mRNA statt, so dass der Spiegel des freien Dom34-Proteins in der Zelle ansteigt. Bei einer potentiellen negativen Autoregulation von Dom34 würde die große Menge des ungebundenen Dom34-Proteins möglicherweise die Expression des eigenen *DOM34*-Gens reprimieren, was den im Vergleich zum Wildtyp reduzierten *DOM34*-Transkriptspiegel der *pmt1*-Mutante erklären würde. Eine potentielle negative Autoregulation von *DOM34* könnte durch Reporter-gen-Fusionen des *DOM34*-Promotors weiter aufgeklärt werden.

4.5 Das regulatorische Motiv der Sequenz CAACCA des *PMT1*-Transkripts ist auch im *PMT5*-Transkript vorhanden

Von großer Bedeutung für die Interpretation der beobachteten Rolle von Pmt5 beziehungsweise Pmt6 bei der Suppression des *pmt1*-Phänotyps durch eine *DOM34*-Überexpression (vgl. 4.2) könnte das Vorkommen des gleichen regulatorischen Motivs der Sequenz CAACCA im 5'-UTR des *PMT5*-Transkripts sein, das im *PMT1*-5'-UTR für die Dom34-abhängige Regulation verantwortlich ist (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung). Es kann vermutet werden, dass auch die Translation des Pmt5-Proteins durch Dom34 reguliert wird. Eine solche Regulation der Pmt5-Translation würde den beobachteten Einfluss von Dom34 auf den *pmt1*-Phänotyp erklären. Wie bereits diskutiert wurde, kompensieren bei einem Verlust der Pmt1-Glykosylierungsaktivität in der *pmt1*-Mutante unter Umständen andere Pmt-Isoformen, wie Pmt5 und Pmt6, einen Teil der O-Glykosylierungsdefekte einzelner Zielproteine von Pmt1. Im Falle eines positiven Einflusses von Dom34 auf die Translation des Pmt5-Proteins käme es wie beobachtet in einer *dom34 pmt1*-Doppeldeletionsmutante durch den Verlust der aktivierenden Wirkung von Dom34 zu einem synthetischen Phänotyp, da zusätzlich zur Deletion von *PMT1* ein Teil der

kompensatorischen Wirkung des Pmt5-Proteins wegfiel. Wird *DOM34* jedoch im *pmt1*-Deletionsstamm überexprimiert, könnte die gesteigerte Biosynthese des Pmt5-Proteins zu einer verstärkten Glykosylierung von Pmt1-Zielproteinen durch Pmt5 und somit einer Suppression des *pmt1*-Phänotyps führen. Allerdings konnte das regulatorische Motiv des *PMT1*- und *PMT5*-Transkripts nicht im 5'-UTR von *PMT6* gefunden werden (Dominguez-Cantero, persönliche Mitteilung), obwohl auch *PMT6* für die Suppression des *pmt1*-Phänotyps benötigt wurde. Möglicherweise findet in diesem Fall eine Dom34-abhängige Regulation über andere, dem CAACCA-Motiv ähnliche Elemente des *PMT6*-Transkripts statt. Solche potentiellen regulatorischen Elemente der Pmt6-Translation durch Dom34 müssten in zukünftigen Analysen des *PMT6*-5'-UTR identifiziert werden. Denkbar wäre sogar eine Dom34-abhängige Translations-Regulation aller Pmt-Proteine, was durch eine Suche nach ähnlichen Sequenzmotiven innerhalb der *PMT*-Transkripte näher untersucht werden könnte. Im Fall einer vermuteten stimulierenden Wirkung von Dom34 auf die Translation des Pmt5-Proteins würde man in entsprechenden Messungen eine gesteigerte Gesamt-Mannosylierungsaktivität bei einer *DOM34*-Überexpression in der *pmt1*-Mutante in Folge des Anstiegs der Glykosylierungsrate durch Pmt5 erwarten. Obwohl im Rahmen des Pmt1 *in vitro* Enzymtests ein solcher Effekt der *DOM34*-Überexpression nicht nachgewiesen werden konnte, stellt dies wie bereits erwähnt aufgrund des verwendeten Pmt1-spezifischen Akzeptorpeptids keinen Widerspruch zu einer dennoch vorhandenen gesteigerten Pmt5-Mannosylierungsaktivität dar, da vermutlich nur bestimmte Zielsequenzen einzelner Pmt1-Zielproteine alternativ durch Pmt5 glykosyliert werden können und dieses Spektrum nicht die spezifische Sequenz des Akzeptorpeptids umfasst.

Es stellt sich allerdings die Frage, weshalb trotz deutlicher Hinweise auf eine Regulation der Translation des Pmt1-Proteins durch Dom34 eine *dom34*-Deletionsmutante keinen Glykosylierungsphänotyp oder andere Defekte aufweist, obwohl ein Verlust des Pmt1-Proteins in der *pmt1*-Mutante schwere Schäden zur Folge hat. Dieser scheinbare Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass gerade vor dem Hintergrund der großen Relevanz des Pmt1-Proteins für die Zelle die Regulation dieser Proteinmannosyltransferase einer Vielzahl verschiedener Mechanismen unterliegt. Möglicherweise wird daher auch die Translation der *PMT1*-mRNA durch mehr als einen Faktor reguliert. Auf der Basis der Untersuchungen in *S. cerevisiae* wurde vermutet, dass Dom34 zusammen mit Hbs1 an der spezifischen Regulation der Translation nur bestimmter mRNAs, oder aber der Translation unter speziellen Bedingungen, wie einer limitierten Translations-Initiation beteiligt ist (Carr-Schmid *et al.*, 2002). Da von Davis und Engebrecht (1998) gezeigt wurde, dass der Phänotyp der *S. cerevisiae* *dom34*-Mutante durch *Pelota* aus *Drosophila* komplementiert werden konnte, und aufgrund der großen Sequenzhomologie der Dom34/*Pelota*-Proteine, kann vermutlich von einer konservierten Funktion der Dom34/*Pelota*-Proteine in den unterschiedlichen Organismen ausgegangen werden. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass Dom34 in *C. albicans* ebenfalls nicht einen allgemeinen Faktor der Translation darstellt, sondern vielmehr eine spezifische Funktion bei der Translation bestimmter Proteine oder unter bestimmten Bedingungen erfüllt. Da insbesondere Pmt5, aber auch Pmt6 im Gegensatz zu den übrigen Proteinmannosyltransferase eine spezifische Funktion bei der Glykosylierung weniger spezieller Zielproteine zugeschrieben wird, ist gerade für Pmt5 eine Regulation der Translation durch einen solchen spezifischen Translationsfaktor wie Dom34 denkbar. An der

Translation von Pmt1 dagegen, das für die *O*-Glykosylierung eines großen Teils der modifizierten Proteine verantwortlich ist, sind neben Dom34 vermutlich noch weitere, allgemeinere Faktoren der Translationsregulation beteiligt. Eine Hypothese wäre eine alternative Translations-Initiation der *PMT1*-mRNA unter verschiedenen Bedingungen. Ein Mechanismus einer alternativen Translationsinitiation ist die Erkennung sogenannter „Internal Ribosomal Entry Sites“ (IRES) durch spezifische Proteine (Hellen und Sarnow, 2001). Während die Translations-Initiation für den Großteil der mRNAs über einen Prozess verläuft, der die Bindung allgemeiner Initiationsfaktoren der Translation (eIFs) an die Cap-Struktur der mRNA für den Eintritt der kleinen Ribosomen-Untereinheit voraussetzt, werden einige wenige mRNAs Cap-unabhängig translatiert. Diese mRNAs tragen im 5'-UTR-Bereich IRES-Elemente, die eine Initiation der Translation durch Bindung bestimmter Proteine an diese Sequenzen und anschließende Rekrutierung der kleinen Ribosomen-Untereinheit unabhängig von den allgemeinen eIFs ermöglichen. Dieser Mechanismus ermöglicht der Zelle, bestimmte mRNAs gezielt auch unter Bedingungen zu translatieren, unter denen die allgemeine Translations-Initiation reduziert ist, wie beispielsweise dem Eintritt in die Mitose. So wird das Gen des Tumorsuppressors Cdk11, der für die korrekte Cytokinese während der Mitose benötigt wird, durch eine Cap-unabhängige Translations-Initiation über ein IRES-Element translatiert, während die allgemeine Protein-Biosynthese durch eine Inhibition der eIF/Cap-abhängigen Translation stark limitiert ist (Pyronnet und Sonenberg, 2001). Bei *C. albicans* könnten solche Mechanismen für die Translation von spezifischen Proteinen eingesetzt werden, die in bestimmten Stadien einer Infektion benötigt werden. Da der einzige für eine *pmt5*-Mutante beschriebene Phänotyp die Pathogenität des Pilzes zu betreffen scheint (Prill *et al.*, 2005), wäre es möglich, dass die Regulation der Translation des Pmt5-Proteins, und unter bestimmten Bedingungen auch des Pmt1-Proteins, durch Dom34 über einen vergleichbaren Mechanismus erfolgt.

4.6 Das Dom34-Protein zeigt eine Verteilung im Cytosol und kann in der ER-Fraktion nachgewiesen werden

Auch die Ergebnisse der Lokalisation des Dom34-Proteins in der Zelle korrelieren mit den vermuteten Funktionen von Dom34. In dieser Arbeit konnte das Dom34-Protein sowohl durch eine fraktionierte Zentrifugation in allen Fraktionen der verschiedenen Zellkompartimenten, wie dem Kern, ER und Golgi sowie dem Cytosol, als auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie im gesamten Zelllumen verteilt, sowie vermutlich ER-assoziiert nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.26 und 3.27). Diese Verteilung des Dom34-Proteins konnte auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie in *S. cerevisiae* bestätigt werden (vgl. Abb. 3.28). In einer früheren Arbeit wurde das Dom34-Protein in *S. cerevisiae* dagegen gehäuft in der ER- und Golgi-Fraktion gefunden (Wickert, 1998), während in den Untersuchungen von Davis und Engebrecht (1998) das Dom34-Protein ebenfalls in der Kern-Fraktion einer Dichtegradienten-Zentrifugation von *S. cerevisiae*-Zellextrakten nachgewiesen wurde. Die Autoren erklärten den Aufenthalt des Dom34-Proteins im Kern durch die Bindung und möglicherweise Unterstützung der Assemblierung der ribosomalen Komponenten bereits am Ort ihrer Biosynthese und spätere Rekrutierung zum Ort der Translation im Cytoplasma, was aufgrund der vermuteten Funktion des Dom34-Proteins als Translationsregulator, die wahrscheinlich eine direkte Interaktion mit den ribosomalen Untereinheiten einschließt, denkbar wäre. Eine

zudem in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Lokalisation des Dom34-Proteins im Cytosol sowie der ER-Fraktion in *C. albicans* lässt sich ebenfalls entsprechend der postulierten regulatorischen Funktion von Dom34 bei der Translation erklären. Während einer Beteiligung an der Translations-Regulation cytosolischer Proteine, die an den freien Ribosomen des Cytoplasma synthetisiert werden, würde man Dom34 hauptsächlich im Cytosol nachweisen. Eine in dieser Arbeit im Rahmen der Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtete gleichmäßige Verteilung des Dom34-Proteins im Cytosol, sowohl in *C. albicans* als auch *S. cerevisiae*, wurde zudem auch von Passos *et al.* (2009) beschrieben. Bei der Translation sekretierter Proteine, die an ER-gebundenen Ribosomen synthetisiert werden, liegt Dom34 dagegen vermutlich über den Translokationskomplex aus Ribosom und den Proteinen der Sekretionspore an die ER-Membran gebunden vor, so dass Dom34 auch in der ER-Fraktion detektiert werden kann.

4.7 Glu₂₁ ist essentiell für die Suppression des *pmt1*-Phänotyps durch Dom34 in *C. albicans*

Weiterhin unklar bleibt die Rolle von Dom34 im no-go decay, dem Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle, für den ebenfalls eine Beteiligung von Dom34 und Hbs1 in *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte (Doma und Parker, 2006; vgl. Abb. 1.4). Insbesondere konnte die Beziehung der beiden Prozesse der Qualitätskontrolle mit anschließendem nukleolytischen Abbau der mRNA und einer positiven Translationsregulation bei der Funktion von *DOM34* bisher nicht aufgeklärt werden. Von Lee *et al.* (2007) wurde postuliert, dass Dom34 die verantwortliche Riboendonuklease des no-go decay darstellt, da sie eine *in vitro* Endonuklease-Aktivität gegenüber unspezifischen RNA-Substraten sowie synthetischen RNA-Molekülen mit einem stem-loop für das Pelota-Protein aus *T. acidophilum* und Dom34 aus *S. cerevisiae* zeigen konnten. Ein *in vitro* Ribonuklease-Test mit *C. albicans* Gesamt-RNA als Substrat zeigte jedoch keine eindeutige Ribonuklease-Aktivität von Dom34 aus *C. albicans* (vgl. Abschnitt 3.12). Ebenso konnte auch die von Lee *et al.* (2007) für das Dom34-Protein aus *S. cerevisiae* nachgewiesene *in vitro* Endonuklease-Aktivität in einer neueren Arbeit von Graille *et al.* (2008) nicht bestätigt werden. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass von Passos *et al.* (2009) beschrieben wurde, dass die von Lee *et al.* (2007) als Endonuklease-aktive Domäne identifizierte Domäne 1 der Dom34/Pelota-Proteine *in vivo* nicht für die Funktion von Dom34 im no-go decay in *S. cerevisiae* benötigt wird. Diese Ergebnisse deuten stark daraufhin, dass Dom34 zwar im Zusammenspiel mit Hbs1 eine Rolle in der Erkennung des während der Translations-Elongation auf der mRNA blockierten Ribosoms und möglicherweise der Einleitung des darauf folgenden Abbauprozesses spielt, jedoch selbst keine Funktion bei der endonukleolytischen Spaltung der betroffenen mRNA vermittelt. In *C. albicans* ist die Existenz eines vergleichbaren Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle wie dem no-go decay in *S. cerevisiae*, sowie eine potentielle Beteiligung von Dom34 an einem solchen Prozess bisher nicht untersucht worden. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Austausch der konservierten Glutaminsäure 21 des Dom34 in *C. albicans* zu einem Verlust der Suppression des *pmt1*-Phänotyp bei einer Überexpression dieses mutierten Dom34_{Glu21-Ala} führt (vgl. Abb. 3.22). Diese Glutaminsäure sowie zwei weitere konservierte Asparaginsäurereste wurden von Lee *et al.* (2007) als essentiell für die Endonuklease-Aktivität des *TaPelota*-Proteins identifiziert. Da

diese drei Aminosäuren, Glu 18, Asp 21 und Asp 22 in *TaPelota*, innerhalb der Dom34/Pelota-Proteine strikt konserviert sind, könnten sie in einem Zusammenhang mit einer in den verschiedenen Organismen konservierten Funktion der Dom34/Pelota-Proteine stehen. Eine solche Funktion muss nicht notwendigerweise speziell eine Endonuklease-Aktivität umfassen, wie sie für *TaPelota* gezeigt wurde, sondern kann eine im Grundprinzip konservierte Aufgabe im Prozess der Translation als regulatorisches Protein oder Faktor der Qualitätskontrolle darstellen. So könnte der konservierte Glutaminsäurerest für eine Rolle der Dom34/Pelota Proteine als positive Regulatoren der Translation bestimmter mRNAs von Bedeutung sein, wie sie für *S. cerevisiae* und *C. albicans* anzunehmen ist. Eine solche Hypothese würde den Funktionsverlust von Dom34^{Glu21-Ala} bezüglich der Suppression des *pmt1*-Phänotyps durch die vermutete Regulation der Translation des Pmt5-Proteins und anderer Pmt-Proteine in *C. albicans* erklären. Der Funktionsverlust des Dom34^{Glu21-Ala} könnte jedoch darüber hinaus auch auf eine Rolle von Dom34 in einem dem no-go decay ähnlichen Prozess in *C. albicans* hindeuten, da die betroffene konservierte Glutaminsäure mit einer Funktion im no-go decay in Verbindung gebracht wurde (Lee et al., 2007). Zudem konnte von Passos *et al.* (2008) ein dem no-go decay entsprechender Prozess auch in *Drosophila* nachgewiesen werden, was die Existenz des no-go decay als konserviertem, allgemeinem Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle in Eukaryonten als sehr wahrscheinlich erscheinen lässt. Da für die Dom34/Pelota-Proteine aus *S. cerevisiae* und *Drosophila* eine Beteiligung am no-go decay gezeigt werden konnte, und die Dom34/Pelota-Proteine wiederum selbst eine stark konservierte Proteinfamilie darstellen, kann vermutet werden, dass zumindest ein Aspekt der konservierten Funktion der Dom34/Pelota-Proteine eine Beteiligung an no-go decay-ähnlichen Mechanismen einschließt. In *C. albicans* könnte demzufolge eine weitere Facette der Funktion von Dom34 eine Beteiligung an einem Mechanismus der mRNA-Qualitätskontrolle vom Typ des no-go decay sein, der mit dem Prozess der O-Glykosylierung in Verbindung stehen könnte.

4.8 Dom34 könnte als spezifischer Faktor die Translation der Pmt-Isoformen unter speziellen Stressbedingungen regulieren

Der auf Basis der Untersuchungen an *S. cerevisiae* postulierte Mechanismus des no-go decay umfasst die Erkennung einer durch äußere Umstände hervorgerufenen Blockade der Translations-Elongations des Ribosoms unter Beteiligung von Dom34 und Hbs1, sowie eine anschließende endonukleolytische Spaltung der mRNA unter Freisetzung des Ribosoms (Doma und Parker, 2006). Es wäre denkbar, dass ein ähnliches Prinzip in abgewandelter Form für die Überwachung der kotranslationalen Glykosylierung naszierender Polypeptidketten noch während der Translokation durch die ER-Membran genutzt wird. Eine solche Qualitätskontrolle sekretierter Proteine im ER könnte möglicherweise unbesetzte Glykosylierungsstellen des Proteins erkennen und in der Folge einen Stopp der Translations-Elongation des wachsenden Proteins am Ribosom auslösen, bis die entsprechende Mannosylierung der betroffenen Glykosylierungsstelle erfolgt ist. Die Erkennung unvollständig glykosylierter Proteine könnte dabei direkt durch einen hypothetischen Glykosylierungs-Kontrollpunkt des ER erfolgen, oder auch indirekt, beispielsweise anhand einer behinderten Faltung der unterglykosylierten Proteine. Eine derartige Kontrolle der Glykosylierung erscheint insbesondere unter Berücksichtigung anderer Kontrollmechanismen

glykosylierter Proteine des ER, wie dem Calnexin-Zyklus denkbar, der das Glykosylierungsmuster sekretierter Proteine zur Kontrolle der erfolgten korrekten Proteinfaltung nutzt (Helenius und Aebi, 2001). Zudem besteht eine direkte räumliche Nähe des Ribosoms an der Sec61-Sekretionspore der ER-Membran als Ort der Translation, zum Ort der Glykosylierung der wachsenden Polypeptidkette auf der Lumenseite der ER-Membran, was eine direkte Interaktion zwischen den beiden Prozessen ermöglichen würde. Parallel zur Funktionsweise im no-go decay, in dem eine Erkennung des angehaltenen, blockierten Ribosoms als Folge einer sterischen Hinderung auf der mRNA erfolgt, könnte Dom34 ebenfalls an einer Erkennung von Elongations-Stopps beteiligt sein, deren Ursache eine noch nicht erfolgte Glykosylierung der Polypeptidkette ist. Während beim no-go decay eine Erkennung des blockierten Ribosoms durch Dom34 zur Einleitung des Abbaus der beschädigten mRNA und Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten als Problemlösung führt, könnte die Aufgabe von Dom34 bei glykosylierungsbedingten Blockaden des Ribosoms die Vermittlung einer spezifischen Reaktion der Zelle auf das Auftreten unterglykosylierter Proteine im ER sein. Entsprechend der vermuteten Funktion von Dom34 als spezifischer Regulationsfaktor der Translation unter speziellen Bedingungen könnte diese Reaktion eine gesteigerte Protein-Biosynthese der Protein-*O*-Mannosyltransferasen durch Dom34 umfassen. Möglicherweise geht die Erkennung des blockierten Ribosoms auch mit einer Aktivierung des Dom34-Proteins durch eine Phosphorylierung einher, was in zukünftigen Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus von Dom34 näher untersucht werden könnte.

In einem hypothetischen Modell würde zunächst die Erkennung Translationsblockierter, ER-gebundener Ribosomen als Konsequenz einer Anhäufung unvollständig glykosylierter Proteine im ER erfolgen, in deren Folge dann das aktivierte Dom34-Protein im Rahmen einer spezifischen Stressantwort der Zelle die Translation verschiedener Pmt-Isoformen als Kompensationsmechanismus der reduzierten Protein-Glykosylierung stimulieren würde (vgl. Abb. 4.1). Eine solche Akkumulation von hypoglykosylierten Proteinen im ER kann bei einer erhöhten Anforderung an die Glykosylierungsmaschinerie durch eine erhöhte Syntheserate sekretierter, glykosylierter Proteine in Stresssituationen entstehen, wie sie bei Schädigungen der Zellwand beobachtet werden kann. Dementsprechend könnte für Dom34 postuliert werden, dass die Rolle des Proteins größtenteils auf eine Funktion in der spezifischen Antwort der Zelle auf Stressbedingungen beschränkt ist, welche die Glykosylierung betreffen.

Ein solches Modell der Funktion von Dom34 stellt zudem eine weitere mögliche Erklärung des beobachteten Einflusses von *DOM34* auf die *pmt1*-Mutante dar. Bei einer Deletion von *PMT1* treten vermehrt unbesetzte Pmt1-Glykosylierungsstellen der entsprechenden Zielproteine auf, deren Erkennung zu einer Arretierung des Translationsapparats führen würde. In Folge dessen käme es zu einer Dom34-vermittelten Steigerung der Pmt-Translation, die zu einer alternativen Glykosylierung einiger Pmt1-Glykosylierungsstellen durch andere Pmt-Isoformen führen könnte. Bei einem zusätzlichen Funktionsverlust von *DOM34* in der *dom34 pmt1*-Doppelmutante fällt dieser Kompensationsmechanismus der Glykosylierung durch andere Pmt-Isoformen aus, was eine Verstärkung des *pmt1*-Phänotyps zur Folge hätte. Im Falle der Überexpression von *DOM34* kommt es dagegen zu einer Überproduktion von Pmt-Proteinen, was zu einer verstärkten Glykosylierung der betroffenen Pmt1-Zielsequenzen durch andere Pmt-Isoformen führt, bei

denen es sich entsprechend den Ergebnisse der Überexpressionsversuche vermutlich insbesondere um Pmt5 und Pmt6 handelt. Da jedoch auch ein Einfluss von Dom34 auf die Translation von Pmt1 festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass im Rahmen einer Stressantwort auf unterglykosylierte Proteine des ER auch Pmt1 neben Pmt5 und Pmt6, oder möglicherweise sogar alle Pmt-Isoformen einer verstärkten Dom34-vermittelten Translation unterliegen.

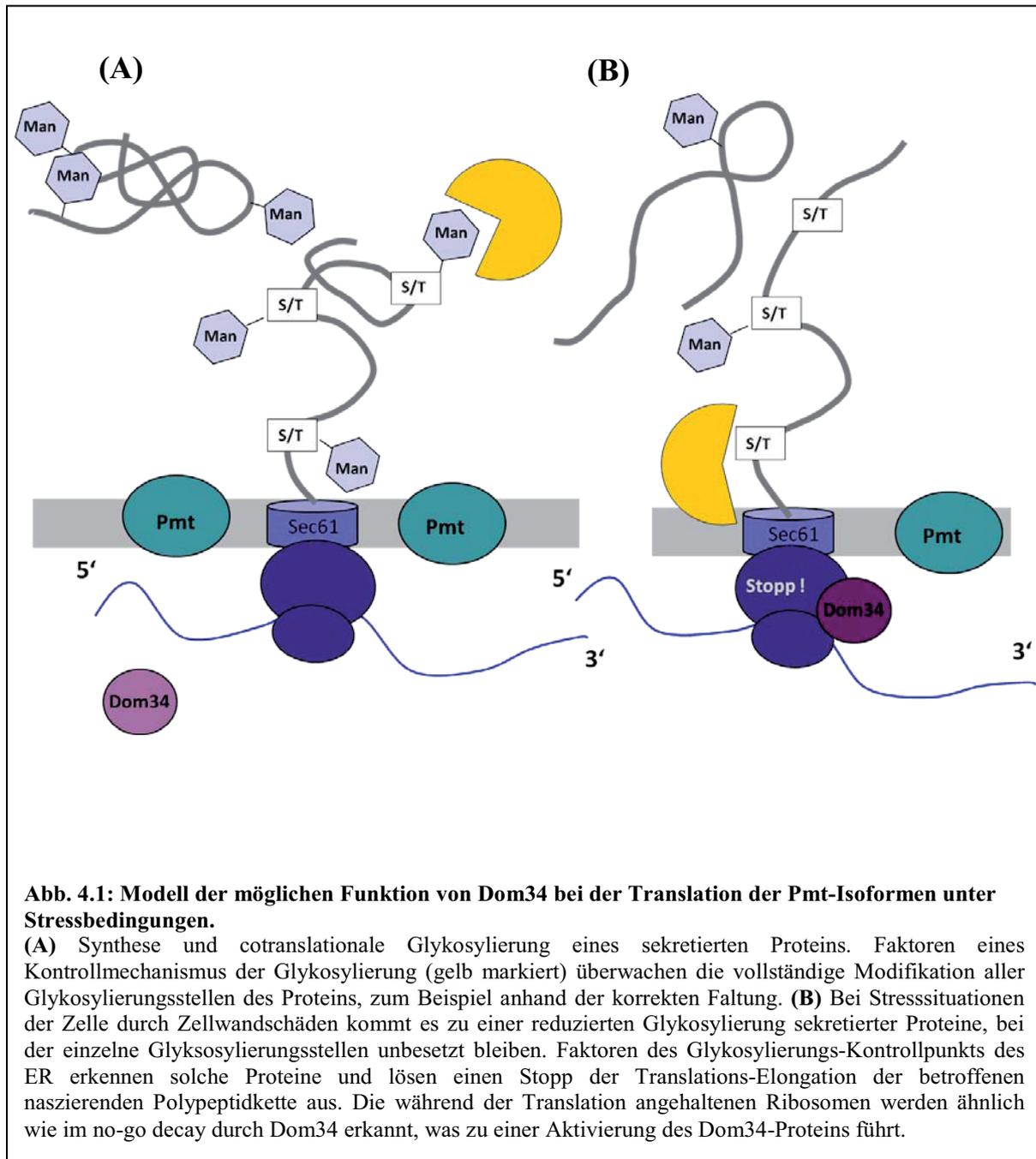
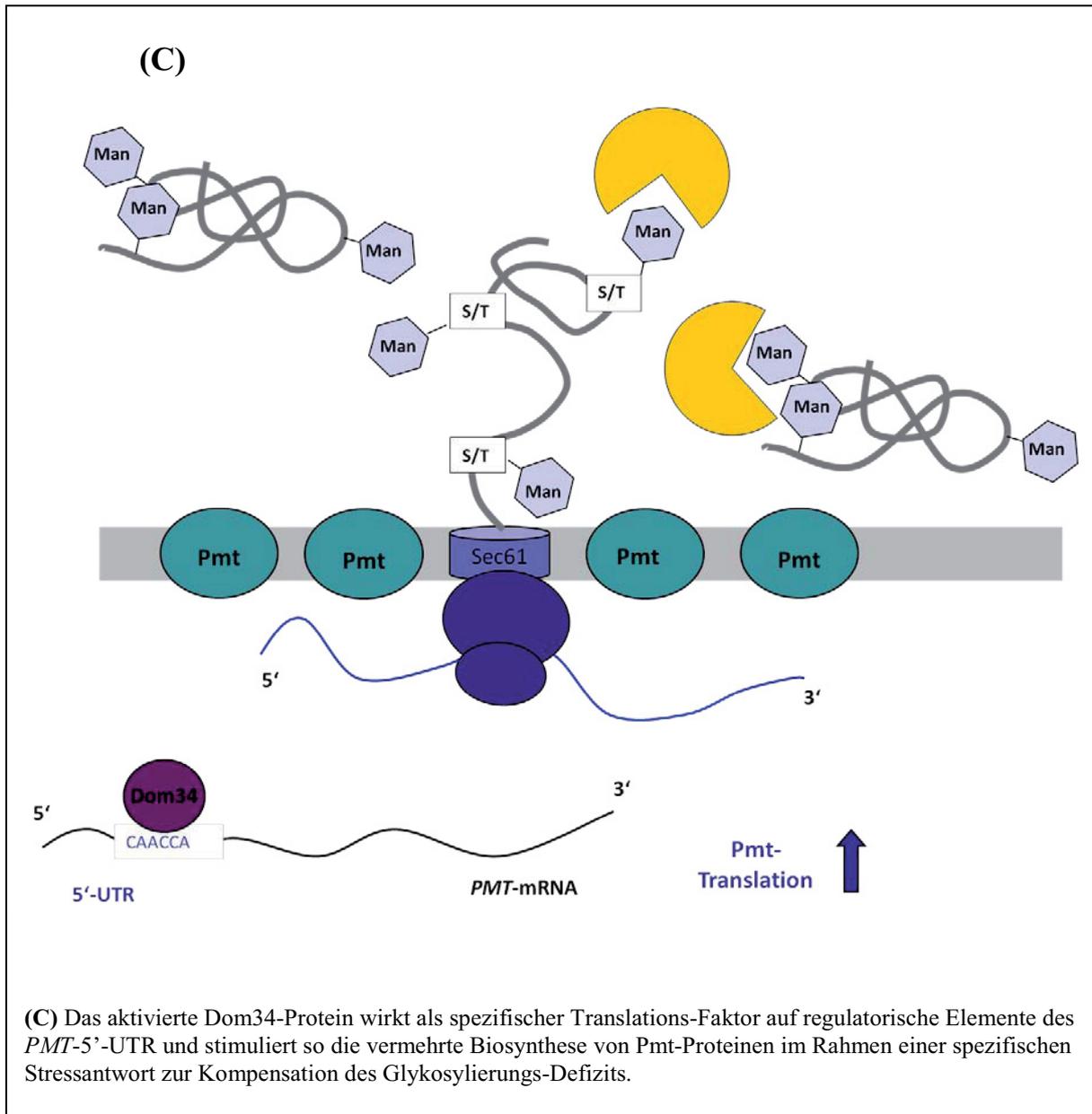


Abb. 4.1: Modell der möglichen Funktion von Dom34 bei der Translation der Pmt-Isoformen unter Stressbedingungen.

(A) Synthese und cotranslationale Glykosylierung eines sekretierten Proteins. Faktoren eines Kontrollmechanismus der Glykosylierung (gelb markiert) überwachen die vollständige Modifikation aller Glykosylierungsstellen des Proteins, zum Beispiel anhand der korrekten Faltung. (B) Bei Stresssituationen der Zelle durch Zellwandschäden kommt es zu einer reduzierten Glykosylierung sekretierter Proteine, bei der einzelne Glykosylierungsstellen unbesetzt bleiben. Faktoren des Glykosylierungs-Kontrollpunkts des ER erkennen solche Proteine und lösen einen Stopp der Translations-Elongation der betroffenen naszierenden Polypeptidkette aus. Die während der Translation angehaltenen Ribosomen werden ähnlich wie im no-go decay durch Dom34 erkannt, was zu einer Aktivierung des Dom34-Proteins führt.



6. Zusammenfassung

Die Protein-*O*-Mannosylierung des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* ist für sein Wachstum, sowie für seine Zellmorphologie und Pathogenität essentiell. Das Dom34-Protein ist Mitglied der in Archaea und Eukaryonten hoch konservierten Dom34/Pelota-Proteinfamilie, das für die Translation, den „no go“-RNA-Abbau und möglicherweise auch für die *O*-Glykosylierung von Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurde die potentielle Funktion des Dom34-Proteins für die *O*-Mannosylierung von *C. albicans*, die durch 5 Isoformen von Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) eingeleitet wird, untersucht.

Während homozygote *dom34*-Mutanten von *C. albicans* keinerlei Defektphänotypen zeigten, wurde mit *dom34 pmt1*-Doppelmutanten, denen die Pmt-Isoform 1 und das Dom34-Protein fehlt, eine genetische Interaktion der *DOM34*- und *PMT1*-Gene nachgewiesen. Doppelmutanten zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hygromycin B und gegenüber Wachstum bei erhöhten Temperaturen. Darüber hinaus wurde durch *DOM34*-Überexpression die Hygromycin B- und Temperatursensitivität einer *pmt1*-Mutante supprimiert. *DOM34*-Überexpression supprimierte ebenfalls die defekte Hyphenbildung und die verringerte *O*-Glykosylierung des Pmt1-Zielproteins Kre9. Die Suppression der *pmt1*-Phänotypen benötigt offenbar die Aktivität der Pmt-Isoformen 5 und 6, da in *pmt1 pmt5*- und *pmt1 pmt6*-Doppelmutanten keine Suppression zu beobachten war.

Dom34/Pelota-Proteine zeigen Homologie zu Translations-Faktoren der eRF1-Familie. *DOM34*-Überexpression führte in einem Wildtypstamm mit Epitop-markiertem Pmt1-Protein zu einer deutlichen Erhöhung der Pmt1-Produktion, obwohl durch qRT-PCR keine Steigerung des *PMT1*-Transkriptspiegels und der übrigen *PMT*-Transkripte gezeigt werden konnte. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Dom34 auf die Translation des Pmt1-Proteins wurde überprüft, ob eine Fusion des *PMT1*-Promotors mit dem Reporter gen *RLUC* durch *DOM34*-Überexpression reguliert wird. Hierbei wurde eine Stimulierung der *RLUC*-Expression durch Dom34 nachgewiesen, die von Sequenzen innerhalb des 5'-untranslatierten Bereiches des *PMT1*-Transkripts abhängig ist. Ähnliche Sequenzen sind auch in der 5'-UTR des *PMT5*-Transkripts vorhanden, so dass eine regulatorische Funktion von Dom34 bei der Translation der Pmt1- und Pmt5-Proteine wahrscheinlich ist.

Ein konservierter Glutaminsäurerest innerhalb der Dom34/Pelota-Proteine ist für eine *in vitro*-RNase-Funktion des Pelota-Proteins aus *Thermoplasma acidophilum* essentiell. Eine RNase-Aktivität des *C. albicans* Dom34-Proteins, das in *Escherichia coli* synthetisiert wurde, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Andererseits führte eine E21A-Mutation zu einem Verlust der Dom34-Fähigkeit, die Phänotypen einer *pmt1*-Mutante zu supprimieren. Es kann somit angenommen werden, dass E21 des Dom34-Proteins im Zusammenhang mit einer spezifischen Funktion, z. B. der RNA-Bindung, bei der Translation der Pmt-Proteine steht.

6. Summary

Protein-*O*-Mannosylation is essential for growth, morphology and virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. Dom34 is a member of the highly conserved Dom34/Pelota protein-family in archaea and in eukaryotes and is involved in translation, “no go”-RNA-degradation and possibly *O*-glycosylation. In this thesis the possible function of Dom34 in *O*-mannosylation, which is initiated by 5 isoforms of protein-*O*-mannosyltransferases (Pmt), was investigated.

While no defective phenotype of a homozygous *dom34*-mutant was observed in *C. albicans*, a genetic interaction of *DOM34* and *PMT1* was detected by analysis of a *dom34 pmt1* double mutant strain lacking the Pmt1 isoform and the Dom34 protein. Double mutants showed an increased sensitivity against hygromycin B and growth at higher temperatures. Furthermore, hygromycin B- and temperature-sensitivity of the *pmt1*-mutant was suppressed by *DOM34*-overexpression. Also, *DOM34*-overexpression suppressed defective hypha-formation and reduced *O*-glycosylation of the Pmt1-target protein Kre9. It appears that activity of Pmt isoforms 5 and 6 are needed for suppression of the *pmt1* phenotype, since suppression did not occur in *pmt1 pmt5*- and *pmt1 pmt6*-double mutant strains.

Dom34/Pelota-proteins share homology to translation factors of the eRF1-family. In a wild-type strain with epitope-labeled Pmt1-protein *DOM34* overexpression lead to a significant increase of Pmt1-production, although no increase of the transcript levels for *PMT1* and the other *PMT* genes could be observed by qRT-PCR analyses. To further explore the influence of Dom34 on Pmt1-protein translation we tested if a *PMT1*-promotor fusion to the reporter gene *RLUC* is regulated by *DOM34* overexpression. In these experiments a stimulation of *RLUC*-expression by Dom34 was discovered, which depended on sequences within the 5'-untranslated region of the *PMT1*-transcript. Similar sequences were also found in the 5'-UTR of the *PMT5*-transcript, which suggests a regulatory function of Dom34 in translation of the Pmt1- and Pmt5-proteins.

A conserved glutamic acid residue within the Dom34/Pelota-protein is essential for the *in vitro*-RNase function of Pelota in *Thermoplasma acidophilum*. However, RNase-activity of *C. albicans* Dom34 synthesized in *Escherichia coli* could not be confirmed. On the other hand, a E21A mutation lead to the loss of Dom34 ability to suppress the *pmt1* mutant phenotypes. Therefore, it can be assumed that E21 of the Dom34 protein is required for a specific function of Dom34, e. g. RNA-binding, during translation of Pmt-proteins.

7. Literaturverzeichnis

Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Häusler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. und Robbins, P.W. (1993). Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*.

J. Cell Biol. **122**: 307-323

Adham, I.M., Sallam, M.A., Steding, G., Korabiowska, M., Brinck, U., Hoyer-Fender, S., Oh, C., und Engel, W. (2003). Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression.

Mol. Cell. Biol. **23**, 1470–1476.

Akasaka-Manya, K., Manya, H., Nakajima, A., Kawakita, M. und Endo, T. (2006). Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2.

J. Biol. Chem. **281**, 19339-19345

Apweiler, R., Hermjakob, H. und Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.

Biochim. Biophys. Acta **1473**, 4-8

Bause, E. und Lehle, L. (1979). Enzymatic N-glycosylation and O-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast.

Eur. J. Biochem. **101**: 185-190

Beltran-Valero de Barnabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekom, E., Van der Zwaag, B., Kayserilli, H., Merlini, L., Chitayat, D. und Dobyns, W.B. (2002). Mutations in the O-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to severe neuronal migration disorder walker-warburg syndrome.

Am. J. Hum. Genet. **71**: 1033-1043

Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit.

Cell **22**: 1143-1154

Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J.P., Odds, F.C. und Gow, N.A.R. (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 7670-7675

Calderone, R.A. und Braun, P.C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*.

Microbiol. Rev. **55**: 1-20

Cantero, P.D., Lengsfeld, C., Prill, S.K., Subanović, M., Román, E., Pla, J., Ernst, J.F. (2007). Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*.

Mol Microbiol. **64**:1115-28

Capellaro, C., Mrsa, V. und Tanner, W. (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating.

J. Bacteriol. **180**: 4081-4088

Carr-Schmid, A., Pfund, C., Craig, E.A., und Kinzy, T.G. (2002). Novel G-protein complex whose requirement is linked to the translational status of the cell.

Mol. Cell. Biol. **22**, 2564–2574.

Castrillon, D.H., Gonczy, P., Alexander, S., Rawson, R., Eberhart, C.G., Viswanathan, S., DiNardo, S. und Wasserman, S.A. (1993). Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis.

Genetics **135**: 489-505

- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. und Martinez, J.P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**: 130-180
- Cheng, S., Nguyen, M.H., Zhang, Z., Jia, H., Handfield, M. und Clancy, C.J. (2003).** Evaluation of the role of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express *URA3* from the native locus. *Infect. Immun.* **71**: 6101-6103
- Crump, J.A. und Collignon, P.J. (2000).** Intravascular catheter-associated infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **19**: 1-8
- Cutler, J. E. (1991).** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 187-218
- Davis, L. und Engebrecht, J. (1998).** Yeast *dom34* mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics* **149**: 45-56
- Dean, N. (1995).** Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1287-1291
- Doma, M.K., und Parker, R. (2006).** Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**:561–564.
- Eberhart, C.G., und Wasserman, S.A. (1995).** The pelota locus encodes a protein required for meiotic cell division: an analysis of G2/M arrest in *Drosophila* spermatogenesis. *Development* **121**: 3477–3486.
- Ecker, M., Hagen, I., Sestak, S., Strahl, S., Deutzmann, R., Mrsa, V. und Tanner, W. (2003a).** News from the covalently linked cell wall proteins Ccw5p/ Pir4p. II International conference on molecular mechanisms of fungal cell wall biogenesis. Salamanca (Spanien) Aug. 27- Sep. 01. 2003
- Ecker, M., Mrsa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. und Tanner, W. (2003b).** *O*-Mannosylation precedes and potentially controls the *N*-glycosylation of a yeast cell wall protein. *EMBO Rep.* **6**: 628-632
- Endo, T. (1999).** *O*-Mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**: 273-246
- Ernst, J.F. (2000).** Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1763-1774
- Ernst, J.F. und Prill, S.K.-H. (2001).** *O*-Glycosylation. *Med. Mycol.* **39**: 67-74
- Fantino E, Marguet D, Lauquin GJ. (1992).** Downstream activating sequence within the coding region of a yeast gene: specific binding in vitro of RAP1 protein. *Mol Gen Genet.* **236**: 65-75
- Finck M., Bergmann N., Jansson B. und Ernst J.F. (1996).** Defective threonine-linked glycosylation of human insulin-like growth factor in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**: 313-320
- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., et al. (2006).** Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* **34**: D247–D251

7. Literaturverzeichnis

- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A.L., Parker, R., und Dietz, H.C. (2002).** An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons.
Science **295**, 2258–2261
- Frolova, L. Goff, X.L., Rasmussen, H.H., Cheperegin, S. und Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., Philippe, M., et al. (1994).** A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factors.
Nature **372**: 701-703
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonzi, W., Ramos, C.F. und Ghannoum, M.A. (1998).** Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells.
Infect. Immun. **66**: 1783-1786
- Gentzsch, M., Immervoll, T. und Tanner, W. (1995).** Protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein *O*-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer.
FEBS Lett. **377**, 128-130
- Gentzsch, M. und Tanner, W. (1997).** Protein-*O*-Glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases.
Glycobiology **7**: 481-486
- Ghannoum, M.A., Jurevic, R.J., Mukherjee, P.K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Gillevet, P.M. (2010).** Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals.
PLoS Pathog. **6**: e1000713
- Girrbach, V. und Strahl, S. (2003).** Members of the evolutionary conserved *PMT* family of protein *O*-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves.
J. Biol. Chem. **276**: 12554-12562
- Glee, P.M., Sundstrom, P. und Hazen, K.C. (1995).** Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo.
Infect. Immun. **63**: 1373-1379
- Goins, T. L. und Cutler, J. E. (2000).** Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis.
J. Clin. Microbiol. **38**: 2862-2869
- Gonzalez, C.I., Bhattacharya, A., Wang, W., und Peltz, S.W. (2001).** Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*.
Gene **274**: 15–25
- Goto, M. (2007).** Protein *O*-Glycosylation in Fungi: Diverse Structures and Multiple Functions.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **71**: 1415-1
- Graille, M., Chaillet, M., van Tilbeurgh, H. (2008).** Structure of yeast Dom34: a protein related to translation termination factor Erf1 and involved in No-Go decay.
J Biol Chem. **283**: 7145-54
- Hazen, K.C., Wu, J.G. und Masuoka, J. (2001).** Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
Infect. Immun. **69**: 779-786
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001).** Intracellular functions of *N*-linked glycans.
Science **291**: 2364-2369

7. Literaturverzeichnis

- Hellen, C. U. und Sarnow, P. (2001).** Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* **15**: 1593–1612
- Herscovics, A. und Orlean, P. (1993).** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**: 540-550
- Hostetter, M.K. (1994).** Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 29-42
- Hoyer, L.L. (2001).** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**: 176-180
- Jurado, L. A., Coloma, A. und Cruces, J. (1999).** Identification of a human homolog of the *Drosophila rotated* abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein *O*-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* **58**: 171-180
- Kandasamy, R., Vedyappan, G. und Chaffin, W.L. (2000).** Evidence for the presence of Pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**: 239-243
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoi, H., Lipke, P.N. und Klis, F.M. (1996).** Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiol.* **6**: 337-345
- Kinoshita, T., Ohishi, K., Takeda, J. (1997).** GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *Rev. J Biochem.* **122**: 251-7
- Klinkert, B. (2002).** Charakterisierung der Pmt5p Proteinmannosyltransferase-Isoform des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
- Klis, F.M., De Groot, P., und Hellingwerf, K. (2001).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**: 1-8
- Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K. und Brul, S. (2002).** Dynamics of cell wall structure *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 239-256
- Kluge, S. (2006).** Dom34p als Regulator der Protein-*O*-Mannosylierung bei *Candida albicans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Lagow, E., DeSouza, M. M. und Carson, D. D. (1999).** Mammalian reproductive tract mucins. *Hum. Reprod. Update* **5**: 280–292
- Lay, J., Henry, L.K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C.E. und Becker, J.M. (1998).** Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect. Imm.* **66**: 5301-5306
- Lee, H. H., Kim, Y. S., Kim, K.H., Heo, I., Kim, S.K., Kim, O., Kim, H.K., Yoon, J.Y., Kim, H.S., Kim do, J., Lee, S.J., Yoon, H.J. et al. (2007).** Structural and functional insights into Dom34, a key component of no-go mRNA decay. *Mol. Cell* **27**: 938-50

7. Literaturverzeichnis

- Lengeler, K. B., Tielker, D. und Ernst, J. F. (2008).** Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development.
Cell. Mol. Life Sci. **65**:528-44
- Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1994).** Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (antiKodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG Kodons.
Mol. Gen. Genet. **245**: 212-217
- Lipke, P.N. und Ovalle, R. (1998).** Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges.
J. Bacteriol. **180**: 3735-40
- Lo, H.-S., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und Fink, G.R. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent.
Cell **90**: 939-949
- Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Sepulveda, P., Casanova, M., Martinz, J.P. und Chaffin, W.L. (1996).** Expression of the fibrinogen binding mannoprotein and the laminin receptor of *Candida albicans* *in vitro* and in infected tissues.
FEMS Microbiol. Lett. **142**:117-22
- Losberger, C. und Ernst, J.F. (1989).** Sequence and transcript analysis of the *C. albicans* *URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase.
Curr. Genet. **16**:153-158
- Lussier, M., Sdicu, A.-M. und Bussey, H. (1999).** The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*
Biochem.Biophys.Acta **1426**:323-334
- Lyalin, D., Koles, K., Roosendaal, S. D., Repnikova, E., Van Wechel, L. und Panin, V. M. (2006).** The twisted gene encodes *Drosophila* protein *O*-mannosyltransferase 2 and genetically interacts with the rotated abdomen gene encoding *Drosophila* protein *O*- mannosyltransferase 1.
Genetics **172**: 343-353
- Mahne, M., Tauch, A., Puhler, A. und Kalinowski, J. (2006).** The *Corynebacterium glutamicum* gene *pmt* encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-*O*-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins.
FEMS Microbiol. Lett. **259**: 226-233
- Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis R.U. und Endo, T. (2004).** Demonstration of mammalian protein *O*-mannosyltransferase activity: coexpression of *POMT1* and *POMT2* required for enzyme activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 500-505
- Martin-Blanco, E. und Bellido-García, A. (1996).** Mutations in the *rotated abdomen* locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymetry in *Drosophila*.
P. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 6048-6052
- Masuoka J., und Hazen K.C. (1999).** Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells.
Glycobiology **9**: 1281-1286
- Munro, C.A. und Gow, N.A.R. (2001).** Chitin synthesis in human pathogenic fungi.
Med. Mycol. **39**: 41-53
- Negre, E., Vogel, T., Levanon, A., Guy, R., Walsch, T.J. und Roberts, D.D. (1994).** The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*.
J. Cell Biol. **269**: 22039-45

7. Literaturverzeichnis

Odds, F.C. (1988). *Candida* and candidosis.
2nd ed., London: Bailliere Tindall

Odds, F.C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections.
J. Am. Acad. Dermatol. **31**: 2-5

Oka, T., Hamaguchi, T., Sameshima, Y., Goto, M. und Furukawa, K. (2004). Molecular characterization of protein *O*-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*.
Microbiology **150**: 1973–1982

Orlean, P. (1990). Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, *O*-mannosylation, and *N*-Glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **10**: 5796-5805

Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components.
In: Pringle, J.R., Broach, J.R. und Jones, E.W., (Eds.). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Vol. 3: Cell cycle and cell biology.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; S. 229-362

Passos, D.O., Doma, M.K., Shoemaker, C.J., Muhrad, D., Green, R., Weissman, J., Hollien, J., Parker, R. (2009). Analysis of Dom34 and its function in no-go decay.
Mol Biol Cell. **20**:3025-32

Petrescu, A.J., Milac, A.L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A. und Wormald, M.R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of *N*-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding
Glycobiology **14**: 103-114

Pfaller, M.A. (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission.
Clin. Infect. Dis. **22**: S89-94

Prill, S.K.-H. (2000). Bedeutung des Pmt4-Proteins für die Proteinglykosylierung des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*.
Diplomarbeit, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Prill, S. K.-H., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C. A., Schroppel, K. und Ernst, J. F. (2005). *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance.
Mol. Microbiol. **55**: 546-560

Pyronnet, S. & Sonenberg, N. (2001). Cell-cycle-dependent translational control.
Curr. Opin. Genet. Dev. **11**: 13–18.

Ragan, M.A., Logsdon, J.M.-Jr., Sensen, C.W., Charlebois, R.L. und Doolittle, W.F. (1996). An archaeobacterial homolog of pelota, a meiotic cell division protein in eukaryotes.
FEMS Microbiol Lett. **144**: 151-155

Rao, S.S. und Grollman, A.P. (1967). Cycloheximide resistance in yeast: a property of the 60S ribosomal subunit.
Biochim. Biophys. Res. Commun. **29**: 696-704

Richard, M., de Groot, P., Courtin, O., Poulain, D., Klis, F.M. und Gaillardin, C. (2002). *GP17* affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.
Microbiology **148**: 2125-2133

Russo, P., Kalkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. und Makarow, M. (1992). A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein.
Mol. Gen. Genet. **239**: 273-280

7. Literaturverzeichnis

- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. und Bille, J. (1997).** Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**: 405-416
- Santos, M.A.S. und Tuite, M.F. (1995).** The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucl. Acids Res.* **23**: 1481-1486
- Schmidt, I. (2007).** Interaktionen der Protein-*O*-Mannosyltransferasen aus *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Shamsadin, R., Adham, I.M., von Beust, G., und Engel, W. (2000).** Molecular cloning, expression and chromosome location of the human pelota gene PELO. *Cytogenet. Cell Genet.* **90**: 75-78.
- Shepherd, M.G. (1987).** Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**: 7-25
- 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. und Edwards, J.E. Jr. (2004).** Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol. Chem.* **279**: 30480-9
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. und Ernst, J.F. (1997).** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* **16**: 1982-1991
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. und Tanner, W. (1993).** *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8164-8168
- Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A. (1999).** Transmembrane topology of PMT1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein-*O*-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **274**: 9068-9075
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W. (1999).** Protein *O*-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 279-307
- Tanner, W. und Lehle, L. (1987).** Protein glycosylation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 81-99
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und Ernst, J. F. (1998).** Multiple functions of Pmt1p-mediated protein *O*-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 20837-20846
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger S., Schröppel, K. und Ernst, J. (2000).** Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**: 3063-3071
- Tollervey, D. (2006).** RNA lost in translation. *Nature* **440**: 425-426.
- Van der Ven, B. C., Harder, J. D., Crick, D. C. und Belisle, J. T. (2005).** Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* **309**: 941- 943.

7. Literaturverzeichnis

- Van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., und Parker, R. (2002).** Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon.
Science **295**: 2262–2264
- Van Reeuwijk, J., Janssen, M., van den Elzen, C., Beltran-Valero de Bernabe, D., Sabatelli, P., Merlini, L., Boon, M., Scheffer, H., Brockington, M., Muntoni, F., Huynen, M. A., Verrrips, A., Walsh, C. A., Barth, P. G., Brunner, H. G. und van Bokhoven, H. (2005).** POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome.
J. Med. Genet. **42**: 907-912
- Vazquez-Torres, A. und Balish, E. (1997).** Macrophages in resistance to candidiasis.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 170-192
- Wallrapp, C., Verrier, S.B., Zhouravleva, G., Philippe, H., Philippe, M., Gress, T.M. und Jean-Jean, O. (1998).** The product of the mammalian orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* *HBS1* gene is phylogenetically related to eukaryotic release factor 3 (eRF3) but does not carry eRF3-like activity.
FEBS Lett. **440**: 387-392
- Weber, Y., Prill, S. K.-H. und Ernst, J. F. (2004).** Pmt-mediated O-glycosylation stabilizes an essential element of the secretory apparatus (Sec20p) in *Candida albicans*.
Eukar. Cell **3**: 1164-1168
- Weerapana, E. und Imperiali, B. (2006).** Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems.
Glycobiology **16**: 91R-101R
- Weston, A., Nassau, P.M., Henly, C. und Marriot, M.S. (1993).** Protein O-mannosylation in *Candida albicans*. Determination of the amino acid sequences of peptide acceptors for protein O-mannosyltransferase.
Eur. J. Biochem. **215**: 845-849
- Wickert, S. (1998).** *DOM34*- und *AGS1*-Genprodukte als Komponenten der Proteinglykosylierung von *Saccharomyces cerevisiae*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Willger, S. (2007).** Die Bedeutung der Protein-O-Mannosyltransferasen für die Virulenz von *Cryptococcus neoformans*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S. (2002).** Characterization of POMT2, a novel member of the *PMT* protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids.
Glycobiology **11**: 771-783
- Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. und Strahl, S. (2005).** Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast.
Mol. Microbiol. **57**: 156-170
- Wilson, I.B.H., Gavel, Y. und Heijne, G. (1991).** Amino acid distribution around O-linked glycosylation sites.
Biochem. J. **275**: 529-534
- Wilson, R. B., Davis, D., Enloe, B. M. und Mitchell (2000).** A recyclable *Candida albicans* *URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions.
Yeast **16**: 65-70
- Wilusz, C.J., Wormington, M., und Peltz, S.W. (2001).** The cap-to-tail guide to mRNA turnover.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**: 237–246

8. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
ARS	autonomous replication site
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
<i>Ca</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute
CWP	cell wall proteins
Cys	Cystein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dol-P	Dolicholphosphat
Dol-P-Man	Dolicholphosphat-Mannose
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOA	5-Fluoro-Orotic Acid
g	Gramm
GalNac	N-Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker
GlcNac	N-Acetylglukosamin
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen

8. Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lura Bertami-Medium
M	Molar
Man	Mannose
MAP	mitogen activated protein
Met	Methionin
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	nano
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
OD _{600 nm}	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
Pir	proteins with internal repeats
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-PCR
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RTL	relativer Transkript Level
S	Svedberg
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
<i>Ta</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
<i>T. acidophilum</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
UV	ultraviolettes Licht
YNB	yeast nitrogen base

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Betreuung und die zahlreichen Anregungen und Ideen während meiner gesamten Doktorarbeit, sowie für den Einsatz und die Unterstützung, die mir eine sehr kurzfristige Prüfung ermöglicht haben, herzlich danken.

Besonders möchte ich auch Herrn Prof. Dr. R. Freudl für die ebenso kurzfristige Übernahme des Koreferats danken!

Danke an meine Labormädels (und -jungs) der AG Ernst, aber auch des gesamten Instituts für die nette und lustige Arbeitsatmosphäre während meiner gesamten Zeit im Labor, aber auch den Trost, die Unterstützung, die Ratschläge und die Motivation in schwierigen Phasen der Arbeit. Nicht zu vergessen natürlich Grillen, Altstadt, Kirmes, Weihnachtsmarkt und all die anderen schönen „Ablenkungen“!

Pilar, ich wünsche Dir, dass auch Du es bald wirklich geschafft hast und danke Dir dafür, dass du dich trotzdem mit mir freust! Danke für viele unvergessliche Altstadt-Abende!

Danke Theres, du bist und bleibst mein Sonnenschein! Mit Deinen Augen sieht die Welt einfach unbeschwerter aus.

Bei meiner Laborkollegin Dagmar bedanke ich mich für die Weihnachtsstimmung im Labor im Dezember (oder auch schon mal Anfang November...) und natürlich die restliche Zeit!

Unserer Anna möchte ich speziell nicht nur für ihre Arbeit im Institut, sondern auch die aufmunternden Worte danken, wenn es mal nicht so gut lief.

Einen lieben Dank an Jacek Orlowski für die Hilfe bei den *in vitro*-Synthesen und die netten Abende als Warschau-Stadtführer beim Cell wall-Meeting!

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich für die finanzielle und seelische Unterstützung während all der Jahre des Studiums und der Doktorarbeit bedanken, und für die Versorgung mit Mahlzeiten zu den unmöglichsten Uhrzeiten in der hektischen und anstrengenden Schlussphase meiner Arbeit.

Endlich muss ich an dieser Stelle auch einmal meinen Freunden Akram und Christian danken, denen ich so viel zu verdanken habe. Danke Jungs!

Danke meinen Freundinnen Catrin und Eva und all meinen anderen Lieben für die Hilfe bei diversen Problemen und das Ertragen meiner Macken... schön, dass es euch gibt!

Ganz besonders danke ich auch meinem Freund Jürgen, dass er immer für mich da ist, für die Benutzung seines Computers und die Begleitung durch die dunklen Institutsgänge bei letzten Arbeiten im Labor zu nächtlicher Stunde!

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 25.05.2010

(Jessica Hilbig)