

Funktionen des Sec20-Proteins im Sekretionsweg des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Betreuer: Prof. J.F. Ernst
Korreferat: Prof. Freudl
Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2001

vorgelegt von
Yvonne Weber
aus Solingen

Düsseldorf
2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	<u>GRUNDPRINZIPIEN DES VESIKULÄREN PROTEINTRANSPORTS</u>	2
1.2	<u>PROTEIN TRANSPORT ZWISCHEN ER UND GOLGI</u>	7
1.3	<u>TRANSPORT DURCH DEN GOLGI</u>	8
1.4	<u>SEC20P UND SEINE ROLLE IN DER SEKRETION BEI HEFE <i>S. CEREVISIAE</i></u>	8
1.5	<u>DER HUMANPATHOGENE PILZ <i>CANDIDA ALBICANS</i></u>	11
1.6	<u>VIRULENZFAKTOREN VON <i>C. ALBICANS</i></u>	14
1.6.1	<u>Dimorphismus</u>	14
1.6.2	<u>Adhäsion an Wirtszellen</u>	15
1.6.3	<u>Sekretion als Virulenzeigenschaft</u>	16
1.6.4	<u>Andere Virulenzfaktoren</u>	17
1.6.5	<u>Sekretionsweg in <i>Candida albicans</i></u>	18
1.7	<u>ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT</u>	18
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	20
2.1	<u>CHEMIKALIEN UND ENZYME</u>	20
2.2	<u>STÄMME UND MEDIEN</u>	20
2.2.1	<u>Bakterienstämme</u>	20
2.2.2	<u>Medien und Anzucht von <i>E. coli</i></u>	20
2.2.3	<u>Hefestämme</u>	20
2.2.4	<u>Medien und Anzucht von Hefe</u>	21
2.2.5	<u>Hypheninduktion bei <i>C. albicans</i> in flüssigem Medium</u>	22
2.2.6	<u>Hypheninduktion in <i>C. albicans</i> auf festem Medium</u>	22
2.2.7	<u>Medien mit Antimykotika</u>	22
2.3	<u>PLASMIDE UND PRIMER</u>	22
2.3.1	<u>Basisplasmide</u>	22
2.3.2	<u><i>S. cerevisiae</i> Plasmide mit <i>CaSEC20</i></u>	23
2.3.3	<u><i>C. albicans</i> Plasmide mit <i>CaSEC20</i></u>	24
2.3.4	<u>Synthetische Oligonukleotide</u>	25
2.4	<u>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</u>	27
2.4.1	<u>Restriktionsendonukleolyse</u>	27
2.4.2	<u>Präparation von RNase (DNase-frei)</u>	27
2.4.3	<u>Auffüllen von 5'-überhängenden Enden</u>	27
2.4.4	<u>Entfernen von 3'-überhängenden Enden</u>	28
2.4.5	<u>Phosphatasereaktion</u>	28
2.4.6	<u>Ligation</u>	28
2.4.7	<u>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</u>	28

<u>2.5</u>	<u>PCR (POLYMERASE-KETTENREAKTION)</u>	28
<u>2.5.1</u>	<u>Kolonie-PCR</u>	28
<u>2.5.2</u>	<u>Mutagenese-PCR</u>	28
<u>2.5.3</u>	<u>Konstruktion eines c-myc Epitop markierten Sec20-Proteins</u>	29
<u>2.5.4</u>	<u>RT-PCR</u>	29
<u>2.6</u>	<u>TRANSFORMATION</u>	29
<u>2.6.1</u>	<u>Transformation von <i>E. coli</i></u>	29
<u>2.6.2</u>	<u>Transformation von <i>S. cerevisiae</i></u>	30
<u>2.6.3</u>	<u>Herstellung von <i>S. cerevisiae</i>-Deletionsstämmen</u>	30
<u>2.6.4</u>	<u>Transformation von <i>C. albicans</i></u>	30
<u>2.7</u>	<u>HERSTELLUNG DIPLOIDER <i>S. CEREVISIAE</i>-STÄMME</u>	30
<u>2.7.1</u>	<u>Induzierter Paarungstyp-Wechsel bei <i>S. cerevisiae</i></u>	30
<u>2.7.2</u>	<u>Sporulation und Tetradenpräparation</u>	31
<u>2.8</u>	<u>ANALYSE VON PROTEINEN</u>	31
<u>2.8.1</u>	<u>Antikörper</u>	31
<u>2.8.2</u>	<u>Herstellung von Hefe-Rohextrakten</u>	31
<u>2.8.3</u>	<u>Herstellung von Membranextrakten</u>	32
<u>2.8.4</u>	<u>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</u>	32
<u>2.8.5</u>	<u>Two-Hybrid-Analyse</u>	32
<u>2.8.6</u>	<u>Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten</u>	32
<u>2.8.6.1</u>	<u>Qualitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität („Overlay-Assay“)</u>	32
<u>2.8.6.2</u>	<u>Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität</u>	33
<u>2.8.7</u>	<u>Messung der Chitinase-Aktivität</u>	33
<u>2.8.8</u>	<u>BSA Metabolisierung und <i>SAP</i> Sekretion</u>	33
<u>2.8.9</u>	<u>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</u>	34
<u>2.8.10</u>	<u>Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western Blot-Analyse</u> ...	34
<u>2.9</u>	<u>NACHWEIS VON PROTEINMODIFIKATIONEN</u>	34
<u>2.9.1.1</u>	<u>Glykosylierung</u>	34
<u>2.9.1.2</u>	<u>N-Glykosylierung</u>	36
<u>2.10</u>	<u>ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN</u>	36
<u>2.11</u>	<u>PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN</u>	36
<u>2.11.1</u>	<u>Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i></u>	36
<u>2.11.2</u>	<u>Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe</u>	36
<u>2.12</u>	<u>BLOTTING-METHODEN</u>	36
<u>2.12.1</u>	<u>Southern Blot</u>	36
<u>2.13</u>	<u>IMMUNOCHEMISCHE DETEKTION SPEZIFISCHER PROTEINE</u>	37
<u>2.14</u>	<u>PULSE-CHASE-EXPERIMENTE</u>	37
<u>2.15</u>	<u>IMMUNOPRÄZIPITATION</u>	37

2.15.1	<u> Koimmunopräzipitation (adaptiert nach Shulewitz <i>et al.</i>, 1999)</u>	38
2.16	<u> MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</u>	38
2.16.1	<u> Immunfluoreszenz</u>	38
2.17	<u> ELEKTRONENMIKROSKOPIE</u>	39
2.17.1	<u> Zellfixierung durch Glutaraldehyd</u>	39
2.17.2	<u> Zellfixierung durch Kaliumpermanganat</u>	39
3	<u> Ergebnisse</u>	40
3.1	<u> ISOLIERUNG UND SEQUENZIERUNG VON <i>CASEC20</i></u>	40
3.1.1	<u> Screening der Fosmide</u>	40
3.1.2	<u> Subklonierung von <i>CaSEC20</i> und Sequenzierung</u>	42
3.2	<u> VERGLEICH VON <i>CASEC20P</i> MIT <i>ScSEC20P</i></u>	44
3.3	<u> DISRUPTION VON <i>CASEC20</i></u>	46
3.3.1	<u> Erzeugung einer konditionalen <i>SEC20</i>-Mutante mit dem <i>PCK1</i>-Promotor</u>	48
3.3.2	<u> Erzeugung einer konditionalen <i>SEC20</i>-Mutante mit dem <i>MET3</i>-Promotor</u>	50
3.4	<u> ANALYSE DER KONDITIONALEN <i>SEC20</i>-MUTANTEN</u>	50
3.4.1	<u> Wachstumsanalyse der konditionalen <i>PCK1p-SEC20</i> Mutante</u>	50
3.4.2	<u> Detektion der <i>SEC20</i> mRNA unter <i>PCK1p</i>-reprimierenden Bedingungen</u>	51
3.4.3	<u> Wachstumsanalyse der konditionalen <i>MET3p-SEC20</i> Mutante</u>	52
3.5	<u> EXPRESSION VON <i>CASEC20</i> IN <i>S. CEREVISIAE</i></u>	54
3.5.1	<u> Komplementation einer <i>S. cerevisiae sec20</i>-Mutante durch <i>CaSEC20</i></u>	54
3.5.2	<u> Disruption des <i>ScSec20p</i> N-Terminus</u>	55
3.6	<u> ANTIMYKOTIKA-SENSITIVITÄT IN KONDITIONALEN <i>SEC20</i>-MUTANTEN</u>	57
3.6.1	<u> Sensitivität von <i>SEC20</i>-Mutanten gegen Antimykotika</u>	57
3.6.2	<u> Sensitivität von <i>sec20</i>-Mutanten gegenüber verschiedenen Substanzen</u>	58
3.7	<u> EINFLUß DER <i>SEC20</i>-EXPRESSION AUF DIE ULTRASTRUKTURELLE ZELLMORPHOLOGIE</u>	60
3.8	<u> EINFLUß DER <i>SEC20</i> EXPRESSION AUF DIE HYPHENINDUKTION</u>	62
3.9	<u> ANALYSE DER <i>SEC20P</i>-FUNKTION IN DER SEKRETION</u>	63
3.9.1	<u> Untersuchungen zur <i>Sap2</i>-Sekretion</u>	63
3.9.2	<u> Untersuchungen zur Chitinase-Sekretion</u>	65
3.10	<u> NACHWEIS VON <i>SEC20P</i> IM IMMUNOBLOT</u>	66
3.11	<u> UNTERSUCHUNG VON <i>SEC20P</i> AUF POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN</u>	67
3.11.1	<u> Nachweis der Glykosylierung von <i>Sec20p</i></u>	67
3.11.2	<u> Untersuchung von <i>Sec20p</i> auf potentielle <i>N</i>-Glykosylierung</u>	69
3.11.3	<u> Das <i>Sec20p</i> in <i>Δpmt</i>-Mutanten</u>	69
3.11.4	<u> Stabilität von <i>Sec20p</i></u>	71
3.11.4.1	<u> Pulse-Chase-Experimente mit <i>Sec20p</i></u>	71
3.11.4.2	<u> Stabilität von <i>Sec20p</i> in Glykosylierungsmutanten</u>	72
3.11.5	<u> Mutationen in potentiellen Glykosylierungsstellen von <i>Sec20p</i></u>	73
3.12	<u> LOKALISATION VON <i>SEC20P</i></u>	75

<u>3.13</u>	<u>ANALYSE DER LÖSLICHKEIT VON SEC20P</u>	76
<u>3.14</u>	<u>INTERAKTIONSPARTNER VON SEC20P</u>	77
<u>3.14.1</u>	<u>Isolierung und Klonierung von UFE1</u>	78
<u>3.14.2</u>	<u>Analyse der funktionellen Homologie</u>	79
<u>3.14.3</u>	<u>Isolierung und Klonierung von TIP20</u>	79
<u>3.14.4</u>	<u>Funktionsanalyse von CaTip20p</u>	80
<u>3.14.5</u>	<u>Interaktionsanalyse von CaSec20p und CaTip20p</u>	80
<u>3.14.6</u>	<u>Homodimerbildung von CaTip20p</u>	83
<u>3.14.7</u>	<u>Analyse der Tip20p/Sec20p Interaktion in <i>C. albicans</i></u>	85
<u>3.14.7.1</u>	<u>Interaktion <i>in vitro</i></u>	85
<u>3.14.7.2</u>	<u>Interaktion <i>in vivo</i></u>	87
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	88
<u>4.1</u>	<u>CASEC20P IST GEGENÜBER SCSEC20P N-TERMINAL VERKÜRZT</u>	89
<u>4.2</u>	<u>CASEC20P IST EIN INTEGRALES MEMBRANPROTEIN DES ERS</u>	90
<u>4.3</u>	<u>CASEC20 IST ESSENTIELL FÜR DAS WACHSTUM</u>	91
<u>4.4</u>	<u>EINE VERRINGERTE EXPRESSION VON SEC20 FÜHRT ZUR SUPERSENSITIVITÄT GEGEN</u> <u>VERSCHIEDENE SUBSTANZEN</u>	92
<u>4.5</u>	<u>CASEC20 HAT EINFLUß AUF DIE ULTRASTRUKTURELLE ZELLMORPHOLOGIE</u>	94
<u>4.6</u>	<u>EINFLUß VON CASEC20P AUF SEKRETIERTE „INDIKATOR-PROTEINE“</u>	95
<u>4.7</u>	<u>DAS CASEC20-PROTEIN WIRD O-GLYKOSyliERT</u>	96
<u>4.8</u>	<u>SEC20P WIRD DURCH O-GLYKOSYLIERUNG STABILISIERT</u>	98
<u>4.9</u>	<u>INTERAKTIONSPARTNER VON CASEC20P</u>	99
<u>4.9.1</u>	<u>CaUfe1p</u>	99
<u>4.9.2</u>	<u>CaTip20p</u>	101
<u>4.10</u>	<u>MODELL ZUM RETROGRADEN PROTEINTRANSPORT IN <i>C. ALBICANS</i></u>	103
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	105
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	106

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	MCS	multiple cloning site
μ	mikro	min	Minuten
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
Ac	Acetat	mM	Millimolar
Amp	Ampicillin	MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
AP	Alkalische Phosphatase	mRNA	messenger RNA
APS	Ammoniumpersulfat	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
ARS	Autonom replizierende Sequenz	nm	Nanometer
AS	Aminosäure	NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
b (bp)	Basen (Basenpaare)	ONPG	o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranosid
bidest.	bidestilliert	ORF	offener Leserahmen
BSA	Rinderserumalbumin	PAA	Polyacrylamid
bzw.	beziehungsweise	PBS	Phosphate buffered saline
Ca	<i>Candida albicans</i>	<i>PCK1p</i>	<i>PCK1</i> -Promotor
CASA	Casaminosäuren	PCR	'polymerase chain reaction'
cDNA	komplementäre DNA	PEG	Polyethylenglycol
<i>CEN</i>	Centromer	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	PMSF	Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	POD	Peroxidase
DIG	Digoxigenin	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
DMF	Dimethylformamid	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Demethylsulfoxid	RNase	Ribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rRNA	ribosomale RNA
dNTP	Desoxinukleotid	RT	Raumtemperatur
DTT	1,4-Dithiothreitol	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	S	<i>Svedberg</i> -Einheiten
Fa.	Firma	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FOA	Fluoruracil	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	SNAP	soluble NSF attachment Protein
Gal	Galaktose	SNARE	SNAP receptor
ggf.	gegebenenfalls	ss	Einzelstrang
h	Stunde	SSC	standard saline citrate
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	β -Gal	β -Galaktosidase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid	SSPE	saline sodiumphosphat-EDTA
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton
kb	Kilobasenpaare	Tab.	Tabelle
kDa	Kilodalton	TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>LAC4</i>	β -Galaktosidase-Gen aus <i>K. lactis</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>LacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>	TCA	Trichloressigsäure
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani	TE	Tris-EDTA
log	logarithmisch	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
M	Molar		
mA	Milliampere		

TMD	Transmembrandomäne	w/v	Gewicht/Volumen
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- 1,3-propandiol	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid
tRNA	transfer RNA	YNB	Yeast nitrogen base
u	units	YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
u.a.	unter anderem	WT	Wildtyp
Upm	Umdrehungen pro Minute	z. A.	zur Analyse
v/v	Volumen/Volumen	z. B.	zum Beispiel
vgl.	vergleiche		
Vol.	Volumenanteil(e)		

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ade	Adenin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Die Sekretion von Proteinen ist sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten ein essentieller Prozess für die Interaktion des Organismus mit seiner Umwelt. Der Sekretionsweg beginnt am Ort der Proteinsynthese und endet an der Zelloberfläche (Abb. 1). In Eukaryoten ist der Zellinnenraum in eine Anzahl membranumgebener Kompartimente unterteilt, die zu ihrer Funktion eine bestimmte Zusammensetzung von Proteinen benötigen. Diese Reaktionsräume ermöglichen der Zelle, unabhängige, spezialisierte physiologische Reaktionen durchzuführen. Während sie durch ihre spezifische Proteinzusammensetzung determiniert werden, besteht doch ein ständiger, dynamischer Austausch zwischen den Organellen. Der selektive Transport von Proteinen zwischen den Organellen wird durch Transportvesikel vermittelt, die mit „Protein-Coats“ ummantelt sind. Dieser Vorgang ist der zentrale Prozess in der Organisation der Organellen sowie der Sekretion von Proteinen (Palade, 1975; Mellmann und Warren, 2000). Um die spezifische Lokalisation der Proteine sicherzustellen, besitzen viele Proteine spezifische Sortierungssignale, die sie für den Transport in die entsprechenden Organellen ausweisen. Einige dieser Sortierungssignale sind inzwischen identifiziert, so ist z. B. ein Signal für den Transport in den Zellkern (Dingwall und Laskey, 1991), in die Mitochondrien (Roise und Schatz, 1988; Bedwell *et al.*, 1989; Glick *et al.*, 1992), in die Chloroplasten (Knight *et al.*, 1993) und in die Peroxisomen (Subramani, 1992; Gould *et al.* 1989) bekannt.

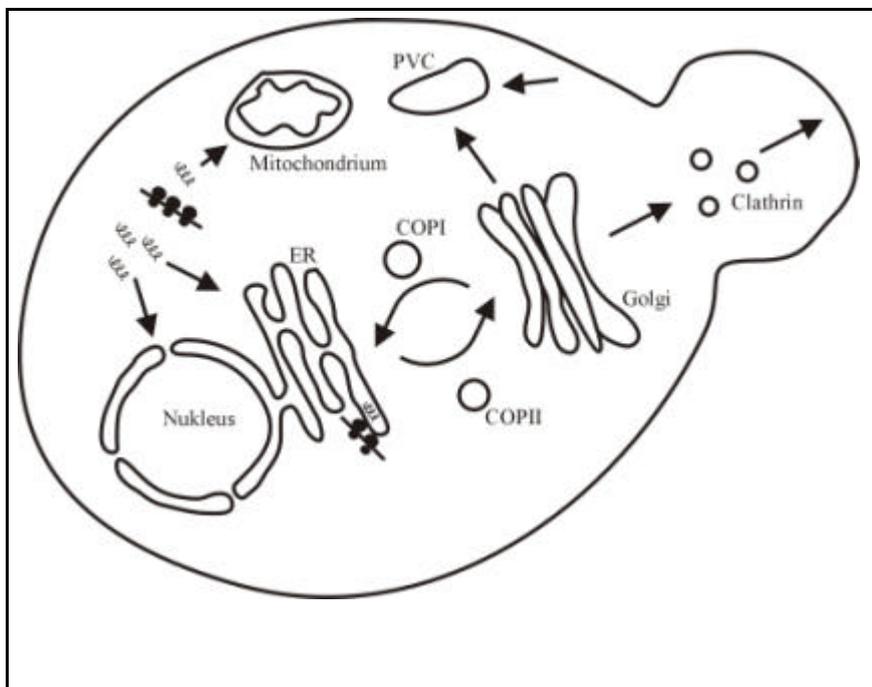


Abb. 1: Übersicht des Proteintransports in der Hefezelle. Proteine werden an freien oder membrangebundenen Ribosomen hergestellt. Ins Zytosol abgegebene Proteine können Signale enthalten, die ihren Transport z. B. in den Nukleus oder die Mitochondrien auslösen. Ins ER transportierte Proteine können in den Golgi über COPI Vesikel gelangen und von dort entweder zurück ins ER mit COPII Vesikeln oder weiter transportiert werden. Vom Golgi kommen Clathrin-Vesikeln zur Plasmamembran oder zum prävacuolären Kompartiment (PVC).

Neben dem gezielten (unidirektionalen) Transport von Proteinen in bestimmte Kompartimente ist die Zelle auch in der Lage, den Verbleib der Proteine an ihrem Bestimmungsort zu sichern und sogar weitergeleitete Proteine zurückzutransportieren. Dies macht das Beispiel der Retention im endoplasmatischen Retikulum (ER) deutlich. Spezifische Signale bedingen den Transport ins ER (von Heijne, 1985), den Verbleib im ER und den Rücktransport von Proteinen ins ER, die zur Modifikation in den Golgi transportiert wurden (Abb. 1; Pelham, 1990; Gaynor *et al.*, 1994). Neben den spezifischen Aminosäuresequenzen innerhalb eines Proteins als Lokalisationssignal sind auch andere Faktoren, z. B. bei Transmembranproteinen die Länge ihrer Transmembrandomäne (TMD), bekannt, die den Bestimmungsort der Proteine festlegen (Chapman und Munro, 1994; Schwientek *et al.*, 1995).

1.1 Grundprinzipien des vesikulären Proteintransports

Beim vesikulären Transport gelangen Proteine mit Hilfe von Transportvesikeln von einem Kompartiment der Zelle zum anderen. Nach der Synthese und dem Import der Proteine ins ER erfolgt eine Abspaltung von Vesikeln mit ihrer Molekülfracht vom ER. Sie werden für den Transport mit einer Hülle umgeben. Nach dieser Vesikelbildung muß die Identifizierung der Zielmembran folgen. Es kommt zu einer Entladung der Fracht durch die Verschmelzung mit dem Kompartiment, wodurch die Weitergabe der Proteine erfolgt. Diese in ihrer Gesamtheit den vesikulären Proteintransport darstellenden Schritte sollen im folgenden näher betrachtet werden.

ER-Import

Die Voraussetzung für die Sekretion von Proteinen ist die Translokation neusynthetisierter Proteine durch die ER-Membran in das Endoplasmatische Retikulum. Man unterscheidet dabei den cotranslationalen und posttranslationalen ER-Import (Abb. 1). Beim cotranslationalen Import in das ER bindet das „**signal recognition particle**“ (SRP), ein Ribonukleoproteinkomplex, an die N-terminale Signalsequenz des synthetisierten Proteins und verursacht einen Translationsarrest (Walter und Johnson, 1994; Lutcke, 1995; Ogg und Walter, 1995). Diese Signalsequenz ist keine definierte Aminosäuresequenz, sondern ein aus 7-20 hydrophoben Aminosäuren bestehender Bereich (Schatz und Dobberstein, 1996; Ng *et al.*, 1996). Der SRP-Ribosom-Komplex diffundiert zur ER-Membran, wo er an die GTP-gebundene Form des „**SRP Rezeptors**“ (SR) bindet und der Precursor auf den Porenkomplex (Translokon) übertragen wird. Durch Hydrolyse des GTP wird die SRP-SR Bindung aufgehoben, und der freigesetzte SRP gelangt wieder ins Zytoplasma (Connolly und Gilmore, 1993; Miller *et al.*, 1993). Bei dem posttranslationalen ER-Import wird kein SRP benötigt (Perara *et al.*, 1986; Schlenstedt *et al.*, 1990). Chaperone der HSP70-Klasse (**heat shock protein**), in der Hefe die Proteine Ssa1-4p und Ydj2, binden das vollständig synthetisierte Protein im Zytoplasma und halten es bis zur Translokation im entfalteten Zustand (Cyr *et al.*, 1994).

Für den eigentlichen Durchtritt von Proteinen ins ER ist eine Translokationspore notwendig. Das bekannteste Protein, das an der Bildung einer Translokationspore beteiligt ist, ist Sec61p (Stirling *et al.*, 1992; Hanein *et al.*, 1996). Diese Untereinheit der Translokationspore ist je nach Importmodus mit verschiedenen anderen Proteinen assoziiert. So wird der Ssh1-Komplex für den cotranslationalen Import in Hefe aus dem Sec61p, Sbh1p und dem Ssh1p gebildet (Finke *et al.*, 1996). Der Sec62p-Sec63p-Komplex hingegen wird für den posttranslationalen Import benötigt und besteht aus den Proteinen Sec61p, Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p in der Hefe (Panzner *et al.*, 1995).

Hüllproteine

Nach der Translokation ins ER werden Proteine weiter durch den Golgi-Apparat bis hin zur Zytoplasmamembran transportiert. Der Transport zwischen ER und Golgi, genauso wie der Transport zwischen Golgi und Plasmamembran, wird durch ummantelte Vesikel vermittelt. Es werden drei Klassen von Hüllproteinen unterschieden (Kirchhausen, 2000), die an die zytoplasmatische Seite der Spendermembran binden und dort eine Vesikelabschnürung auslösen. Die an den frühen Transportschritten des Sekretionsweges beteiligten Mantelproteine, d. h. bei den Transportschritten zwischen ER und Golgi bzw. Golgi und ER werden als „coating proteins II“ (COPII) bzw. COPI bezeichnet (Orci *et al.*, 1986; Cosson und Letourneur, 1997; Malhotra *et al.*, 1989; Barlowe *et al.*, 1994; Barlowe, 2000). Die dritte Klasse von Hüllproteinen, die Clathrine, werden beim Transportschritt vom Golgi zur Plasmamembran und von der Plasmamembran zum prävakulären Kompartiment/Endosom verwendet (Abb. 1) (Pearse und Robinson, 1990; Pishvae und Payne, 1998; Schmid, 1997; Baggett und Wendland, 2001).

Vesikelbildung

Durch den ersten genetischen Screen nach Sekretionsmutanten (*sec*-Mutanten) konnte eine Reihe von Mutanten isoliert werden, die anhand ihres Phänotypes in unterschiedliche Klassen unterteilt wurden, z. B. Mutanten mit Defekten im ER-Golgi-Transport oder Golgi-Plasmamembran-Transport (Novick *et al.*, 1980). Die Klasse der ER-Golgi Transport-Mutanten wurde wiederum in zwei Klassen unterteilt: zum einen Proteine, die an der Vesikelbildung beteiligt sind und zum anderen Proteine, die an der Vesikelverschmelzung beteiligt sind (Kaiser und Schekman, 1990). Der Vesikeltransport kann daher in zwei Schritte unterteilt werden. Die Vesikel-Abschnürung von der Spendermembran (Abb. 2) und die Vesikel-Verschmelzung mit der Zielmembran. Die Vesikelformation beginnt, wenn eine inaktive, lösliche „Guanosin Triphosphatase“ (GTPase) aktiviert wird. Der „ADP-ribosylation factor“ (ARF) wird für die Bildung von COPI Vesikeln und das „secretion-associated Ras-related-protein“ (SAR) wird für die Formation von COPII Vesikeln aktiviert (Serafini *et al.*, 1991; Barlowe *et al.*, 1994). Die Aktivierung wird vom „GDP/GTP exchange factor“ (GEF) oder vom „guanine-nucleotide-releasing protein“ (GNRP), welche in der Spendermembran lokalisiert sind, katalysiert (Barlowe und Schekman, 1993).

GEF verursacht den Austausch von GDP gegen GTP, so daß die aktivierte GTPase eine Konformationsänderung durchläuft und dadurch an die Spendermembran gebunden wird. Die gebundene GTPase vermittelt die Bindung von Hüllproteinen, bzw. Untereinheiten der Hüllproteine (Salama und Schekman, 1995; Waters *et al.*, 1991). Nach abgeschlossener Rekrutierung wird ein umhülltes Vesikel abgespalten (Abb. 2).

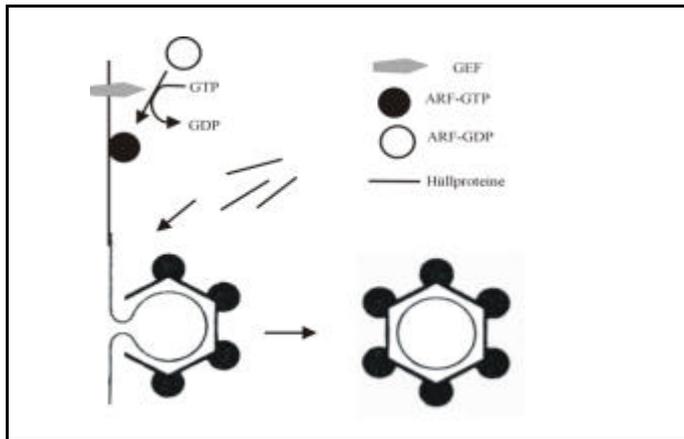


Abb. 2: Vesikelbildung. Durch den von GEF ausgelösten Austausch von GDP zu GTP wird das ARF Protein an die Membran gebunden. Es kommt zur Rekrutierung von Hüllprotein-Untereinheiten, die sich an die Membran anlagern und die Abschnürung eines Vesikels auslösen. GEF: GDP/GTP exchange factor; ARF: ADP-ribosylation factor

Identifizierung der Zielmembran

Den nächsten Schritt im Vesikeltransport stellt die Identifizierung des Zielkompartiments dar. Es ist bekannt, daß sowohl Vesikel als auch Zielmembran spezielle Membranproteine exponieren, von denen ein Teil ins Zytosol ragt. Diese Proteine werden als SNARE's (SNAP receptor; SNAP: soluble NSF attachment Protein; NSF: N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) bezeichnet. v-SNARE's sind auf den Vesikeln und t-SNARE's auf der Zielmembran lokalisiert (Söllner *et al.*, 1993). Diese zwei Proteinkomplexe sind in der Lage, mit ihren zytoplasmatischen Anteilen, die meist eine 50-60 Aminosäuren umfassende „coiled coil“-Region enthalten, zu interagieren (Chapman und Munro, 1994; Rothman, 1994; Sogaard *et al.*, 1994). Die Meinungen über die Aufgabe dieser Interaktion gehen allerdings auseinander. Es wird von einigen Autoren angenommen, daß durch die SNARE -Proteine eine spezifische Identifikation des Vesikels und der Zielmembran möglich ist (Abb. 3A) (Rothman, 1994; McNew *et al.*, 2000).

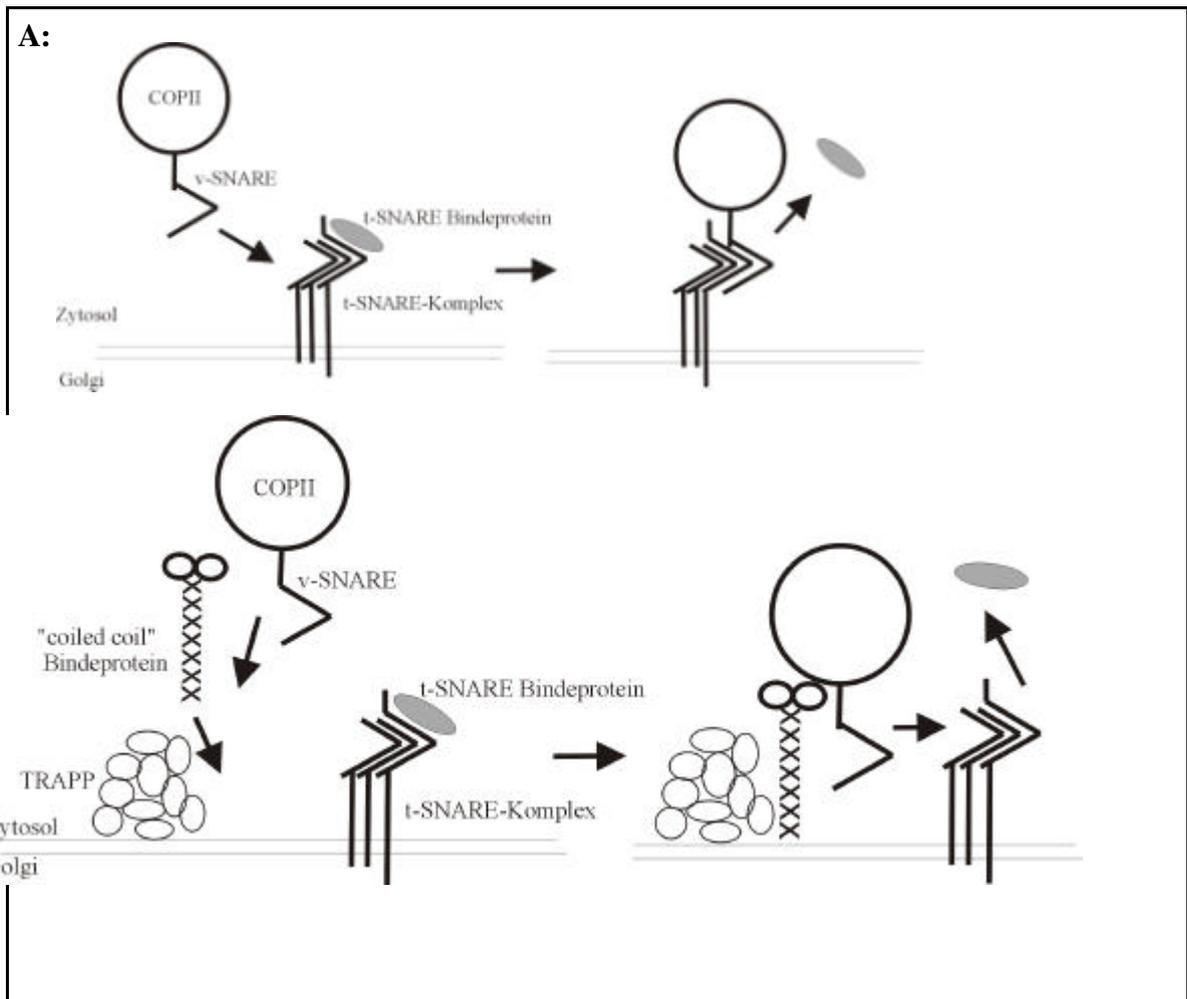


Abb. 3: Identifizierung der Zielmembran durch Vesikel

A: Schematische Darstellung der „SNARE-Hypothese“. Die Formation des SNARE-Komplexes ist durch ein t-SNARE Bindeprotein geregelt, welches an freie t-SNAREs gebunden ist. Der t-SNARE-Komplex des Golgi besteht aus drei in der Membran verankerten Proteinen, die eine „coiled coil“-Region im Zytosol haben. Nach Ablösung des t-SNARE bindenden Proteins kommt es zu einer t/v-SNARE Komplexbildung aus vier „coiled coil“-Regionen.

B: Schematische Darstellung der „TRAPP-Hypothese“. Die spezifische Interaktion wird durch den an der Golgi-Membran gebundenen TRAPP-Komplex bedingt. Ein „coiled coil“ Bindeprotein wird an die Zielmembran rekrutiert und dadurch eine Verbindung zwischen Zielmembran und Vesikel hergestellt. Dies löst dann die Dissoziation des t-SNARE Bindeproteins aus, was erst dann eine Paarung der SNARE Proteine ermöglicht. COP: Coatamer-coated vesicle; SNARE: SNAP receptor (SNAP: soluble NSF attachment Protein; NSF: N-ethylmaleimide sensitive fusion protein); TRAPP: transport protein particle

Von anderen wird aber angenommen, daß „transport protein particle“ (TRAPPs) noch vor der SNARE-Paarung interagieren (Cao *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Lowe, 2000; Sacher *et al.*, 2000) und die spezifische Interaktion und Identifizierung von Vesikel und Zielmembran vermitteln (Abb. 3B; Pfeffer, 1999; Yang, *et al.*, 1999). Bei den TRAPP's des ER-Golgi-Transports handelt es sich um einen Komplex aus zehn Untereinheiten (u. a. Bet3p und Bet5p), die essentiell für die Bindung der Vesikel an den Golgi sind. (Barrowman *et al.*, 2000).

Außerdem ist noch das zytoplasmatische Protein Uso1p beteiligt, das an die Golgi-Membran durch Rab-GTP (siehe unten) rekrutiert wird (Cao *et al.*, 1998).

Die Rolle der oben beschriebenen SNARE-Proteine und deren Komplexbildung in den frühen Schritten der Sekretion wird seit langem untersucht. Ihre Unterteilung in t- und v-SNAREs ist umstritten (Nichols und Pelham, 1998; Pelham, 1999; Pelham, 2001). In Hefe sind sieben Mitglieder der Syntaxin-ähnlichen Familie, der t-SNAREs, bekannt (Vam3p, Sed5p, Ufe1p, Pep12p, Tlg2p/Tlg1p, Sso1p/2p; <http://itsa.ucsf.edu/~mostov/supplementary>). Sed5p als t-SNARE des Golgi interagiert mit den Proteinen Bet1p (blocked early in transport), Bos1p (**bet one suppressor**) und Sec22p (Lian und Ferro-Novick, 1993; Sacher *et al.*, 1997). Diese Proteine galten lange Zeit als v-SNAREs, wohingegen ihnen heute, zumindest Sec22p eine Funktion in verschiedenen SNARE-Komplexen zugeschrieben wird (Lewis *et al.*, 1997; Parlati *et al.*, 2000; Tsui *et al.*, 2001). Man geht heute davon aus, daß immer vier Helices an der Bildung eines v-/t-SNARE Komplexes beteiligt sind, allerdings gebildet aus einem v-SNARE und drei charakteristischen t-SNAREs. Im Fall des frühen Golgi übt Bet1p als v-SNARE seine Funktion in den COPII Vesikeln aus, wohingegen Bos1p und Sec22p mit Sed5p die charakteristische Struktur der intrazellulären t-SNAREs ausbilden. Diese setzen sich aus zwei leichten Ketten und einer schweren Kette, dem Syntaxin (Sed5p), zusammen (Fukuda *et al.*, 2000). Diese topologische Zusammensetzung ist sehr stringent und läßt sich ohne Aufhebung der Funktion nicht ändern (Parlati *et al.*, 2000). Eine ähnliche topologische Zusammensetzung ist auch bei den SNARE-Proteinen an der Plasmamembran zu finden. Allerdings werden die vier Helices aus einem v-SNARE und einem Syntaxin in Verbindung mit einem Membranprotein mit zwei Helices auf zytosolischer Seite gebildet.

Sowohl die „SNARE-Hypothese“ als auch die „TRAPP-Hypothese“ postulieren eine, auf dem Vesikel lokalisierte, zur Ras-Großfamilie gehörende GTPase (Rab/Ypt) (Lupashin und Waters, 1997). Dies ist z. B. das hefespezifische Ypt1p für den ER-Golgi-Transport oder das Sec4p für sekretorische Vesikel. Eine weitere Gemeinsamkeit der Maschinerien der Identifizierung ist, daß sie zwischen den Spezies konserviert sind. So kann z. B. auch aus Säugern ein stabiler Komplex aus dem synaptischen v-SNARE, Synaptobrevin (auch VAMP, **vesicle associated membrane protein**, genannt), und dem t-SNARE, Syntaxin, mit einem dritten membranassoziierten Protein SNAP25 isoliert werden (Söllner *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1994). Wenn Syntaxin nicht mit einem anderen SNARE assoziiert vorliegt, ist der lösliche Faktor, nSec1p, gebunden. Auch hierzu gibt es homologe Proteine in Hefe, sowohl Sec1p als Bindungspartner vom t-SNARE Sso1p an der Plasmamembran als auch Sly1p als Bindungspartner des t-SNAREs Sed5p am cis-Golgi sind aus der Hefe bekannt (Pevsner *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1998).

Vesikelverschmelzung

Wie die Fusion von Vesikel mit der Zielmembran erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, daß die löslichen Faktoren NSF (Sec18p) und SNAP (Sec17p) für die entgeltliche Fusion notwendig sind (Clary *et al.*, 1990; Block, 1988). Sie binden an die SNARE-Proteine, wobei NSF als ATPase die Hydrolyse von ATP bedingt. Die freiwerdende Energie wird zur Trennung des v-SNARE/t-SNARE Komplexes benötigt (Nichols *et al.*, 1997;

Ungerman *et al.*, 1998). Die Membranfusion beginnt vor dieser Reaktion und zwar mit der Bildung des SNARE-Komplexes (Weber *et al.*, 1998; Weber, 2000). NSF und SNAP sind für die Kontinuität von Vesikelformation und Vesikelfusion notwendig, allerdings nicht direkt an der Membranverschmelzung beteiligt (Mayer *et al.*, 1994; Bock und Scheller, 1999).

1.2 Protein Transport zwischen ER und Golgi

Es soll nun auf den anterograden sowie den retrograden Transport zwischen ER und Golgi eingegangen werden. Lange Zeit wurde angenommen, daß Proteine, die in das ER gelangt sind, weiter über den sogenannten „Bulk flow“ Mechanismus in den Golgi-Apparat transportiert werden. Als „Bulk flow“ bezeichnet man einen unspezifischen Vorwärtstransport ohne Rücksicht auf den eigentlichen Bestimmungsort der Proteine (Rothman, 1987; Wieland *et al.*, 1987). Neuerdings ist bekannt, daß zumindest ein Teil des Vorwärtstransports gerichtet abläuft und sekretorische Proteine in den vom ER abspaltenden Vesikeln angereichert werden (Bednarek *et al.*, 1995). Für lösliche, sekretierte Proteine wurde ein Sequenzmotiv identifiziert, welches von integralen Membranproteinen im Golgi erkannt wird und so in die COPII ummantelten Vesikel eingebaut wird (Campbell und Schekman, 1997; Nishimura und Balch, 1997). Aber auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem Einbau in COPII-Vesikel, ohne integrale Membranproteine und löslichen ER Proteinen wurde hergestellt (Kuehn *et al.*, 1998).

Allerdings ist trotz der beschriebenen Erkenntnisse über den selektiven anterograden Transport nicht die Bedeutung des retrograden Proteintransports vom Golgi zum ER geschmälert worden. Nicht nur für Proteine, die dem ER „entkommen“ sind, sondern auch für ER-Proteine, die einer golgispezifischen Proteinmodifikation (z. B. Glykosylierung) unterzogen werden, sowie für das Recycling der anterograden „Proteinmaschinerie“ ist ein retrograder Transport von essentieller Bedeutung (Pelham, 1995; Pelham, 1996; Teasdale und Jackson, 1996). Es sind unterschiedliche Proteintypen bekannt, die mit Hilfe von COPI-Vesikeln vom Golgi zurück ins ER transportiert werden. TypI-Membranproteine (in Säugern und Hefe) können ein Dilysinmotiv an ihrem zyttoplasmatischen C-Terminus enthalten und Untereinheiten der COPI-Vesikel direkt binden (Townsend und Pelham, 1994; Cosson und Letourneur, 1994; Letourneur *et al.*, 2001). In löslichen ER-Proteinen fungiert ein HDEL-Motiv an ihrem C-Terminus als Rücktransportsignal, in sehr seltenen Fällen wird dieses Motiv auch in den Membranproteinen (Sec20p und Sed4p: suppressor of the *erd2* deletion) gefunden (Pelham, 1996; Sweet und Pelham, 1992; Hardwick, 1992). Der Erd2p-Rezeptor (ER retention defect) im Golgi bindet Proteine mit diesem Signal und vermittelt über eine Oligomerisierung des Rezeptors den Rücktransport des Komplexes mit Hilfe von COPI Vesikeln ins ER (Abb. 4). Die pH-Differenz zwischen Golgi- und ER-Lumen ist essentiell für die Freisetzung des Proteins vom Erd2p-Rezeptor (Majoul *et al.*, 2001). Vor allem aus Säugern ist bekannt, daß zum einen die Dicke der unterschiedlichen Membranen und ihre Cholesterol- und Sphingomyelin-Konzentration (Orci *et al.*, 1981; Bretscher und Munro, 1993; Munro, 1995), zum anderen die Formation von Komplexen mit Lipiden oder Proteinen in den einzelnen Kompartimenten (Nilsson *et al.*, 1993; Weisz *et al.*, 1993) die Lokalisation von

Transmembranproteinen bedingen. Ein Beispiel aus Hefe für diese Arte der Lokalisation ist die ER-Lokalisation des Membranproteins Ufe1p (**u**nknown **f**unction-**e**ssential). Seine TMD ist ausreichend, um eine ER-Lokalisation auch von Golgi-Proteinen, auszulösen. Bei einer Fehllokalisierung des Proteins ist die Länge der TMD entscheidend für den weiteren Transport von Ufe1p. Eine längere TMD bewirkt eine Lokalisation an der Plasmamembran, wohingegen eine kürzere TMD den Transport zur Vakuole auslöst (Rayner und Pelham, 1997; Sato *et al.*, 2001). Ähnliches ist auch für den Rücktransport des TypII ER-Membranproteins Sec12p bekannt. Hier ist die TMD des Proteins für seinen Rücktransport verantwortlich, und zwar durch eine Interaktion mit dem Golgi-Membranportein Rer1p (retention in the ER), welches seinerseits wiederum in COPI Vesikel gepackt wird (Abb. 4) (Boehm *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2001). Es läßt sich also sagen, daß COPI Vesikel auf jeden Fall an dem retrograden Transport von Proteinen vom Golgi zum ER beteiligt sind.

1.3 Transport durch den Golgi

Der Golgi-Apparat spielt eine fundamentale Rolle in der posttranslationalen Modifikation (z. B. Glykosylierung) von Proteinen sowie für den Transport und die Sortierung neu synthetisierter Proteine. Die distinkten Subkompartimente, die in cis- und trans-Golgi (bei Hefe früher- und später-Golgi) unterteilt werden, enthalten eine Reihe spezifischer Proteine. Der fundamentale Mechanismus des Proteintransports durch den Golgi hat in den letzten Jahren eine erhebliche Kontroverse ausgelöst. Zwei unterschiedliche Modelle stehen zur Diskussion (Glick, 2000). Das „Modell der stabilen Kompartimente“ geht davon aus, daß sich die unterschiedlichen Proteine in den einzelnen Kompartimenten anreichern und der Transport durch den Golgi mit Hilfe von anterograden Transportvesikeln stattfindet (Rothman und Wieland, 1996). Im „Modell der cisternalen Reifung“ hingegen wird davon ausgegangen, daß sich das cis-Golgi Kompartiment durch die Fusion von Transportvesikeln des ER immer neu formt. Das Subkompartiment wandert weiter, und die Reifung kommt durch den ständigen Rücktransport von Golgi-Proteinen mittels retrograder Vesikel zustande (Bannykh *et al.*, 1998; Glick und Malhortra, 1998). Bei diesem Model ist der Rücktransport von wesentlicher Bedeutung. Ihm wird die eigentliche Aufgabe der Proteinsortierung zugeschrieben.

1.4 Sec20p und seine Rolle in der Sekretion bei Hefe *S. cerevisiae*

Wie oben erwähnt, können Sekretionsmutanten in zwei Gruppen unterteilt werden. Sie betreffen zum einen Proteine, die für die Formation von Transportvesikel verantwortlich sind (Sec12p, 13p, 16p, 21p und 23p) und zum anderen Proteine, die für die Fusion der Vesikel mit dem cis-Golgi benötigt werden (Sec17p, 18p, 22p und Bos1p) (Novick *et al.*, 1980; Kaiser und Schekman, 1990; Shim *et al.*, 1991). Schon morphologisch lassen sich diese beiden Gruppen unterscheiden. Bei einem gestörten Fusionsmechanismus kommt es zur Anreicherung von Vesikeln. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer ER-Anreicherung in Mutanten, deren

Vesikelformation gestört ist. Es war allerdings nicht möglich, alle gefundenen Mutanten der einen oder anderen Gruppe zuzuordnen. Ein Beispiel stellt die temperatursensitive *sec20-1* Mutante dar. Bei reduzierter *SEC20*-Expression kommt es zur Membrananreicherung und zur Anreicherung von 50 nm Vesikeln. Es werden aber weniger Vesikel beobachtet als bei Vesikelfusionsmutanten (z. B. *sec18*) (Kaiser und Schekman, 1990). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß Sec20p ein essentielles TypII integrales Membranprotein des ER ist, das seinen C-Terminus im ER-Lumen und seinen N-Terminus im Zytosol hat (Sweet und Pelham, 1992). An seinem C-Terminus befindet sich ein HDEL-Motiv, welches von der Rücktransportmaschinerie erkannt wird (Abb. 4). Obwohl dieses Signal nicht essentiell für die Funktion von Sec20p ist, wurde doch gezeigt, daß Sec20p vom Golgi zum ER mit Hilfe des HDEL-Signals transportiert wird (Sweet und Pelham, 1992). Die Überexpression des zytosolischen Teils von Sec20p ist toxisch, wobei dieser Effekt durch eine gleichzeitige Überexpression von dem zytosolischen Protein Tip20p (Sec twenty interaction protein) aufgehoben werden kann (Sweet und Pelham, 1993). Durch Koimmunpräzipitation konnte eine direkte Interaktion von Sec20p und Tip20p nachgewiesen werden, welche eine Lokalisationsverschiebung von Tip20p vom Zytosol zur ER-Membran zur Folge hat (Abb. 4) (Sweet und Pelham, 1993). Auch Tip20p ist essentiell und Deletionsmutanten zeigten wie bei Sec20p eine Membrananreicherung. Im Gegensatz zu Sec1p und Sly1p, die zu einer Proteingruppe gehören, die mit freien Syntaxinen interagiert und bei spezifischer Interaktion der SNAREs abdiffundiert, ist Tip20p auch in dem unten beschriebenen Komplex von Sec20p, Ufe1p und Sec22 assoziiert (Pevsner *et al.*, 1994, Lewis *et al.*, 1997). Tip20p ist nicht der einzige Interaktionspartner von Sec20p. Auch Ufe1p, ein in der ER-Membran lokalisiertes Protein, interagiert mit Sec20p in *S. cerevisiae*. Ufe1p ist mit der Syntaxin Familie der t-SNAREs verwandt, vor allem mit dem im cis-Golgi lokalisierten t-SNARE Sed5p (Lewis und Pelham, 1996). Da es weder für die Vesikelformation vom ER noch für die Vesikelfusion mit dem Golgi notwendig ist, geht man auch hier, wie bei Sec20p und Tip20p davon aus, daß es für den retrograden Transport benötigt wird. In dem essentiellen Ufe1p ist eine geladene Aminosäure direkt hinter der TMD auf Seiten des ER-Lumens für die Interaktion mit Sec20p verantwortlich. Auch bei Sec20p befindet sich an dieser Stelle (direkt hinter der TMD, auf Seiten des ER-Lumens) eine entgegengesetzt geladene Aminosäure, deren Austausch eine Interaktion mit Ufe1p verhindert (Kapitel 3.14.1, Abb. 33) (Downing und Storms, 1996; Lewis *et al.*, 1997). Ufe1p ist neben seiner wahrscheinlichen Funktion als t-SNARE im retrograden Transport auch für die homotypische ER-Membran-Fusion notwendig. Hierbei werden im Gegensatz zur Vesikelverschmelzung Sec18p und Sec17p nicht benötigt, allerdings ist die peripher am ER lokalisierte NSF-verwandte ATPase Cdc48p an dieser Fusion beteiligt (Latterich *et al.*, 1995; Latterich und Schekman, 1994; Patel *et al.*, 1998).

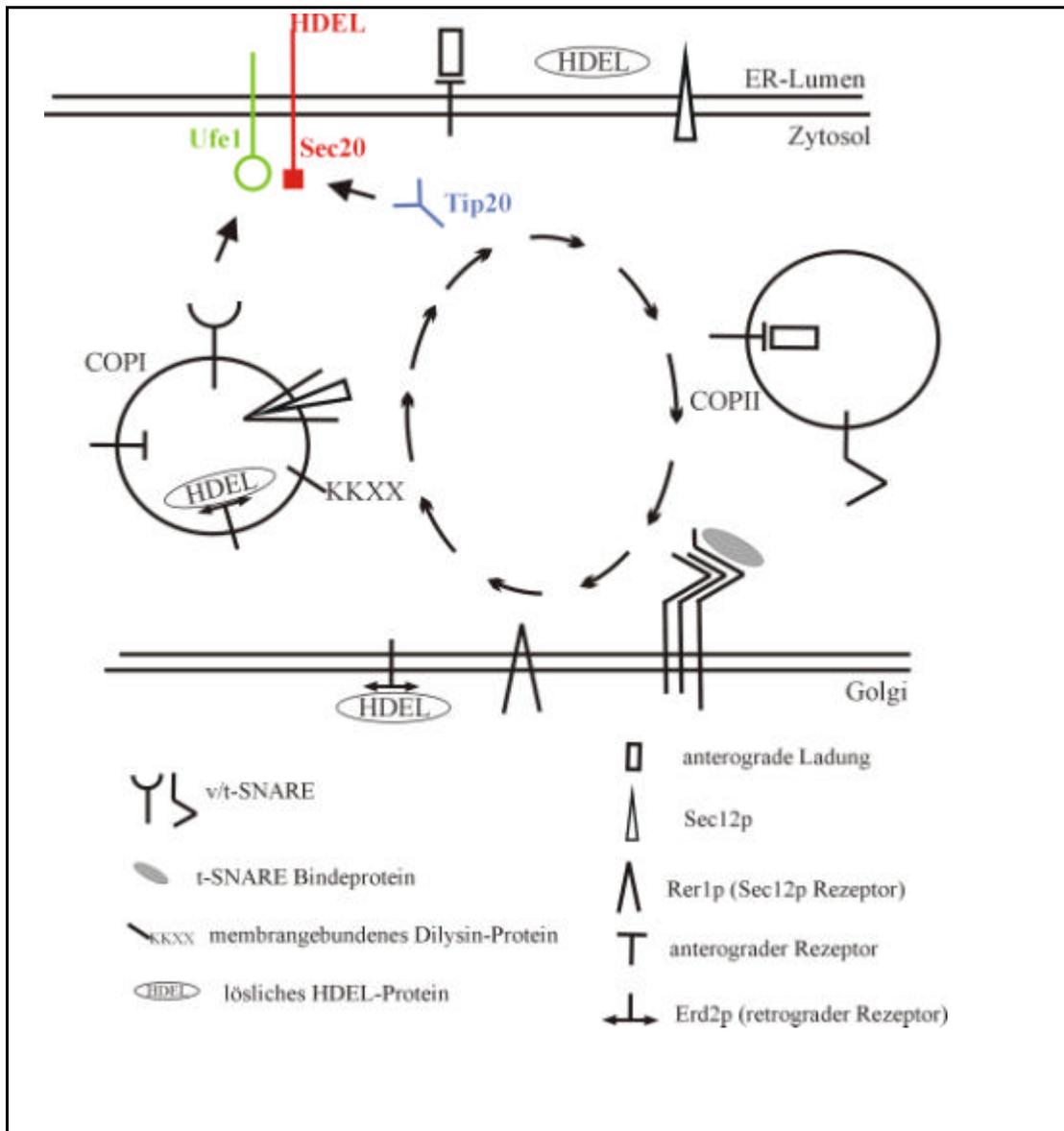


Abb. 4: Vesikel-Modell des anterograden und retrograden Proteintransports zwischen ER und Golgi in Hefe. COPII Vesikel transportieren Proteine vom ER zum Golgi, und COPI Vesikel transportieren retrograde Proteine vom Golgi zum ER. Jeder Vesikel enthält ein für die Vesikel-Fusion notwendiges v-SNARE Protein und in den Zielmembranen sind die entsprechenden t-SNARE Proteine verankert. Lösliche ER-Proteine, die ein HDEL Motiv enthalten, werden vom Erd2p Rezeptor im Golgi gebunden und wieder zurück ins ER transportiert. Membrangebundene ER-Proteine mit einem KKXX Motiv werden in COPI Vesikel verpackt und ins ER zurückgebracht. Membrangebundene ER-Proteine wie z. B. Sec12p werden durch Bindung an Rer1p im Golgi zurück ins ER transportiert. Anterograd zu transportierende Proteine werden mit Hilfe des anterograden Rezeptors in den Golgi transportiert. Ein ständiges Recycling von Proteinen mit Hilfe der COPI Vesikel findet statt. Dabei werden SNAREs und z. B. anterograde Rezeptoren für erneute Transportrunden zurück ins ER transportiert.

Durch Koimmunoprecipitationen konnte weiterhin eine Interaktion von Ufe1p aber auch von Sec20p, mit Sec22p festgestellt werden (Lewis *et al.*, 1997). Man hat spekuliert, daß Sec22p als v-SNARE auf COPI Vesikeln eine Rolle spielt. Heute muß man hingegen von einer dualen Funktion von Sec22p ausgehen. Man weiß heute, daß Sec22p auch als t-SNARE im Komplex mit Sed5p und Bos1p im Golgi lokalisiert ist (Parlati *et al.*, 2000).

1.5 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Eine kleine Gruppe der bis heute beschriebenen 200.000 Pilzarten hat sich als Parasit auf Warmblüter spezialisiert. Diese Pilze verursachen bei Mensch und Tier Krankheiten aller Schweregrade, die als Mykosen bezeichnet werden. Die durch Pilzinfektionen verursachten Krankheiten, werden beim Menschen durch weniger als 300 Arten ausgelöst (Perfect, 1996). Unter diesen pathogenen Arten verursachen weniger als ein Dutzend weit über 90 % aller Infektionen (Edmond *et al.*, 1999).

Candida albicans ist der bedeutendste Erreger humaner Mykosen. Mindestens 80 % aller humanen Mykosen in Deutschland werden durch *Candida*-Arten hervorgerufen, wobei *C. albicans* in 50 bis 70 % der Fälle als Haupterreger systemischer Infektionen isoliert wird (Pfaller, 1996). *C. albicans* besiedelt im gesunden Menschen als Kommensale verschiedene Körperregionen. Er wird bei ca. 30 bis 40 % aller Menschen im Darm und bei über 50 % auf den Mundschleimhäuten gefunden (McCulloch *et al.*, 1996). Eine Kolonisation ist nicht mit einer Infektion gleichzusetzen. Vielmehr sind *Candida*-Infektionen meist als endogen und nur selten als von außen hervorgerufen zu betrachten. Durch die weite Verbreitung im Körper sind auch Infektionen weiter verbreitet als bei anderen Kommensalen, wie z. B. bei *Escherichia coli*, das hauptsächlich im Darm zu finden ist, wenn es eine Infektion auslöst. Nur *Pseudomonas aeruginosa* kann in Bezug auf die weite Verbreitung im Körper mit *C. albicans* konkurrieren. Initiiert durch eine gestörte Immunabwehr, z. B. bei Krankheit oder immunsupprimierender Therapie, kommt es zu lokalen Infektionen oder auch zu systemischen Infektionen, bis hin zur Sepsis. Bei über 90 % aller HIV-Infizierten findet man orale und im Laufe der Erkrankung auch lebensbedrohliche, systemische Candidosen (Greenspan, 1994). In Deutschland gibt es jährlich ca. 8000 bis 10000 Todesfälle, die auf *Candida*-Infektionen zurückgeführt werden (Morschhäuser *et al.*, 1997). Die erhöhte Zahl von Mykosen in den letzten Jahren kommt auf Grund der immer häufigeren Anwendung von Antibiotika und Immunsuppressiva oder auch auf Grund von Immunschwächen, wie z. B. AIDS oder Leukämie (Bodey, 1993) zustande. Im Zeitraum zwischen 1976 bis 1990 hat sich die Zahl der systemischen Mykosen mehr als verdoppelt (Pfaller, 1994). Milde Befallsformen wie Oberflächeninfektionen, z. B. auf Schleimhäuten und im Intestinaltrakt sowie als Windeldermatitis und als Vulvovaginitis können jahrelang andauern und weitgehend symptomlos bleiben. Die vielfache und breite Anwendung von Antimykotika hat zum vermehrten Auftreten von Resistenzen der pathogenen Hefe gegenüber den wenigen zur Verfügung stehenden, Antimykotika geführt (White *et al.*, 1998), was befürchten läßt, daß die

klinische Relevanz von *C. albicans* in den kommenden Jahren weiter steigen wird. Diese Tatsachen machen *C. albicans* zum Objekt intensiver Forschung und stellen vor allem die Identifizierung neuer Angriffspunkte für Antimykotika in den Vordergrund.

C. albicans zeigt in vielen Merkmalen eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Ascomyceten, besonders zu der Gattung *Saccharomyces* (Peterson, 2000). Diese macht sich auf der Ebene der Nukleotidsequenzen, z. B. der 5S-rRNA (Chen *et al.*, 1984), des GC-Gehalts des Genoms und der geringen Divergenz zwischen Proteinen bemerkbar (Odds, 1988; Hendriks *et al.*, 1991). Es ist daher möglich, *C. albicans*-Gene mit Hilfe einer Komplementation von auxotrophen *S. cerevisiae*-Stämmen oder durch ein Screening von Genbank-Bibliotheken unter Berücksichtigung der Homologie zu den offenen Leserahmen (ORFs) von *S. cerevisiae* zu identifizieren und zu isolieren (Scherer und Magee, 1990). Allerdings ist davon auszugehen, daß gerade die Unterschiede zwischen *Candida*-Spezies und *S. cerevisiae* für die Pathogenität von *C. albicans* wichtig sind (Gow, 1997). Das haploide Genom von *C. albicans* ist 15,5 MBp groß und auf acht Chromosomen verteilt (Doi *et al.*, 1992), die nach ihrer Größe bezeichnet wurden. Das größte Chromosomenpaar enthält die rRNA Gene und es wurde mit R bezeichnet, die übrigen Chromosomenpaare wurden mit den Ziffern 1-7 durchnummeriert. *C. albicans* besitzt ein diploides Genom und es konnte noch kein sexueller Vermehrungszyklus nachgewiesen werden (Odds, 1988). Es gibt allerdings auch haploide *Candida*-Arten wie *C. guilliermondii* und *C. glabrata*, weshalb über einen kryptischen Vermehrungszyklus spekuliert wird (Suzuki *et al.*, 1986). Es wurden die Gene, deren Homologe in *S. cerevisiae* für die sexuelle Paarung verantwortlich sind, auch in *C. albicans* gefunden (Hull und Johnson, 1999; Tzung *et al.*, 2001), allerdings konnte lediglich unter experimentellen Bedingungen eine tatsächliche Rolle dieser Gene bei Paarungsvorgängen gezeigt werden (Hull *et al.*, 2000; Magee und Magee, 2000). Daher wird *C. albicans* taxonomisch den Deuteromyceten zugeordnet, der Gruppe der imperfekten Pilze.

Durch die auffallende Zunahme der *Candida*-Infektionen in den letzten Jahren hat der Bedarf an Antimykotika stark zugenommen. Da *C. albicans* als Eukaryot eine große Ähnlichkeit in seinen zellulären Mechanismen zum Patienten aufweist, bereitet es Schwierigkeiten, wirkungsvolle Medikamente zu finden, die nicht gleichzeitig den Patienten schädigen. Heute stehen wenige Antimykotika zur Therapie zur Verfügung. Das bei systemischen Infektionen häufig eingesetzte Amphotericin B ist mit starken Nebenwirkungen verbunden. Amphotericin B gehört wie Nystatin zu der Gruppe der Polyene. Polyene interagieren mit der pilzspezifischen Membrankomponente Ergosterol. Die Integration der Oligomere in die Zellmembran führt zu einer Permeabilisierung und über den Verlust von Ionen zum Zelltod (Groll *et al.*, 1998). Neuerdings wird die Darreichungsform der Wirkstoffe verändert, z. B. durch die Verabreichung von Amphotericin B in Liposomen (Bennett, 1996). Das Nukleosidanalogon 5'-Fluorocytosin, ein weiterer fungizider Wirkstoff, wird von Pilzen zu 5'-Fluoruracil metabolisiert, welches die RNA-Synthese inhibiert (Hoppe-Tichy, 1997). Die vorwiegend fungistatisch wirkenden Azole wie Ketoconazol, Itraconazol oder Clotrimazol, interagieren mit Cytochrom P-450 und hemmen die Demethylierung von Lanosterol, was zu einer Anhäufung toxischer Sterole in der Zellmembran führt (Tuite, 1992). Allerdings haben sie meist auch einen negativen Einfluß auf

die gastrointestinalen und hepatischen Funktionen der Patienten. In den letzten zehn Jahren treten Resistenzen gegenüber den Azolen vermehrt auf (White *et al.*, 1998, van den Bossche *et al.*, 1998). Als Beispiel hierfür ist Fluconazol-Resistenz zu nennen. Die Resistenz gegen Azole entsteht hauptsächlich durch Änderungen in der Membranstruktur sowie durch einen aktiven Ausschleusungsmechanismus, an dem sogenannte „Multi Drug Transporter“ (MDR) beteiligt sind (van den Bossche *et al.*, 1994; Sanglard *et al.*, 1997; StGeorgiev, 2000). Die Resistenz gegenüber Antimykotika wird teilweise durch die hohe Variabilität des Genoms von *C. albicans* erklärt. Die Selektion von resistenten Mutanten auf Medien, die Fluconazol enthalten, führt z. B. zu einer veränderten Chromosomenzahl (Janbon *et al.*, 1998). Bei einem Isolat der nahe verwandten, pathogenen Spezies *C. glabrata* basiert die Fluconazolresistenz auf der Amplifikation des Chromosoms, welches das Resistenz-vermittelnde Gen trägt (Marichal *et al.*, 1997). Für viele Loci existiert nicht nur eine natürliche Heterozygotie (Whelan und Magee, 1981; Whelan und Soll, 1982), sondern es kommt auch zu einer relativ häufigen Umordnung des Genoms (Rutschenko-Bulgac *et al.*, 1994; Janbon *et al.*, 1998). Diese verstärkte Variabilität des Genoms könnte die fehlenden sexuellen Rekombinationsvorgänge von *C. albicans* kompensieren.

Das diploide *C. albicans*-Genom erschwert die genetische Analyse. Die klassischen Methoden der Rückkreuzung und der Sporenanalyse sind ebenso wenig möglich wie einfache Mutationsanalysen. Erst die Deletion beider Allele erlaubt meist eine Aussage über die Funktion des Gens, da die Deletion eines Allels häufig in einer rezessiven Mutation resultiert, so daß kein Phänotyp ausgeprägt wird. Die Erzeugung von auxotrophen Stämmen als Grundlage für genetische Untersuchungen stellt also schon ein Problem dar. Auch die Expression heterologer Gene, z. B. Reportergene anderer Organismen, ist in *C. albicans* durch den ungewöhnlichen Kodongebrauch erschwert, da das bei den meisten Organismen für Leucin kodierende CUG-Kodon bei *C. albicans* die Information für die Aminosäure, Serin enthält (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995, White *et al.*, 1995). Heute stellen allerdings schon kodonoptimierte Varianten, z. B. von GFP, einen wichtigen Beitrag zur *in vivo* Lokalisationsanalyse von Proteinen in *C. albicans* dar (Cormack *et al.*, 1997). Das β -Galaktosidase kodierende Gen *LAC4* aus *Kluyveromyces lactis* besitzt kein CUG-Kodon (Leuker *et al.*, 1992) und es ist daher als Reporter geeignet. Kürzlich wurde über den Einsatz des *lacZ*-Gens aus *Streptococcus thermophilus* als Reporterprotein berichtet (Uhl und Johnson, 2001). Inzwischen sind trotz der gerade beschriebenen Problematik vielfältige molekulargenetische Werkzeuge für die Arbeit mit *C. albicans* verfügbar (Pla *et al.*, 1996). Als wichtige Hilfsmittel für die Arbeit mit *C. albicans* sind die abgeschlossene Sequenzierung des Genoms und der freie Zugriff auf die Sequenzdaten zu nennen (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>). Die gebräuchlichste Methode zur Gendisruption wurde 1993 von Fonzi und Irwin entwickelt. Die Transformation erfolgt mit Hilfe einer Kassetten, die ein durch den Auxotrophie-Marker *URA3* (kodiert für Orotidin-5'-Monophosphat Decarboxylase) disruptiertes Wildtyp-Gen enthält. Der Marker wird durch identische Bereiche heterologer DNA (*hisG*) flankiert, die durch intrachromosomale Rekombination die Deletion des Markergens bewirken. Diese Rekombination findet auf festem Medium mit Fluoruracil (FOA)

statt, auf denen Uridinauxotrophie selektioniert wird (Fonzi und Irwin, 1993). Diese grundlegende Methode ist in den letzten Jahren immer weiter verbessert worden. Eine Verkleinerung sowohl der homologen Bereiche des Zielgenes (Wilson, *et al.*, 1999), als auch eine Verkleinerung der homologen Bereiche für die intrachromosomale Rekombination waren möglich (Morschhäuser *et al.*, 1999). Die konditionale Expression der Flp-Rekombinase ermöglicht die gezielte Rekombination der Zielsequenzen dieses Proteins. Für die Transformation von *C. albicans* stehen die rezessiven Marker, *URA3* (Kelly *et al.*, 1987), *ADE2* (Kurtz *et al.*, 1987) und *LEU2* (Kelly *et al.*, 1988), zur Verfügung. Darüber hinaus ermöglicht der dominante Marker *IMH3* die Transformation von prototrophen Stämmen und verleiht diesen eine Resistenz gegenüber Mycophenolsäure (Beckerman *et al.*, 2001). Neben der Disruption ist auch der Einsatz von regulierbaren Promotoren für genetische Untersuchungen von Bedeutung. Diese vermitteln eine unterschiedlich starke Genexpression. Beispiele für derartige Promotoren sind der *PCK1*-Promotor, der eine starke Genexpression in nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen oder Casaminosäuren induziert (Leuker *et al.*, 1997). Auch der *MAL2*-Promotor wird durch die vorhandene Kohlenstoffquelle reguliert (Backen *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1996). Als ein relativ stark reprimierbarer Promotor wurde der *MET3*-Promotor von Care *et al.* (1999) beschrieben. Dieser ist in Anwesenheit von Methionin und Cystein reprimiert. Vor kurzem wurde ein Tetracyclin-regulierter Promoter beschrieben (Nakayama *et al.*, 2000), der in Anwesenheit von Doxycyclin inhibiert ist. Er ist sowohl für *in vitro*- als auch *in vivo*-Situationen geeignet, da gezeigt werden konnte, daß auch im Mausmodell eine Inhibierung des Promotors möglich ist.

1.6 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

Eine Candidose ist durch eine dynamische Interaktion zwischen der Wirtsabwehr und *Candida*-Virulenzfaktoren charakterisiert. Es ist wahrscheinlich, daß *C. albicans* keinen einzelnen dominanten Virulenzfaktor hat, sondern daß mehrere miteinander wechselwirkende Faktoren für die Auslösung einer Infektion von Bedeutung sind (Pla *et al.*, 2001). Folgende Virulenzfaktoren werden diskutiert:

1.6.1 Dimorphismus

Als dimorpher Pilz ist *C. albicans* in der Lage, vegetativ in einer Hefe-Form oder in einer filamentösen Form zu wachsen (Odds, 1988). Die kugeligen Hefezellen, auch Blastosporen genannt, vermehren sich durch Knospung. Unter bestimmten Bedingungen kann diese Form entweder zum filamentösen Wachstum übergehen oder Chlamydosporen bilden. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* bildet *C. albicans* zwei unterschiedliche filamentöse Formen aus und wächst sowohl als Pseudohyphale als auch als echte Hyphale. Bei pseudohyphalem Wachstum kommt es nicht zu einer Trennung der Mutter- und Tochterzelle nach der Teilung, so daß sich Zellketten bilden und die einzelnen Zellen sind elongiert. Im Gegensatz dazu entsteht eine echte Hyphale

durch kontinuierliches apikales Wachstum eines Keimschlauches, in den Septen eingezogen werden. Die einzelnen Hyphenabschnitte sind durch Poren in den Septen verbunden, in deren Nähe neue Hefen abknospen können (Odds, 1988; Ernst, 2000). Das filamentöse Wachstum kann durch verschiedene Bedingungen, wie durch Serum, N-Acetylglukosamin oder Prolin (Gopal *et al.*, 1982; Cassone *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1975) bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung auf 37°C vorgerufen werden. Durch diese positiven Stimuli lassen sich demgegenüber bei *S. cerevisiae* keine Pseudohyphenbildungen auslösen (Kobayashi und Cutler, 1998). Wie bei *S. cerevisiae* (Gimeno *et al.*, 1992) führen allerdings auch Hungerbedingungen auf festen Medien zu filamentösem Wachstum. Hierbei wird z. B. Stickstoffmangelmedium (SLADH-Medium) oder ein Medium mit komplexer Stickstoffquelle und Mannitol als C-Quelle (Spider-Medium) zur Induktion der Hyphenbildung eingesetzt (Csank *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1994). Auch Sauerstofflimitierung (Riggle *et al.*, 1999) und ein neutraler pH-Wert (Buffo *et al.*, 1984) induzieren filamentöses Wachstum.

Trotz vieler Untersuchungen zum Dimorphismus konnte seine exakte Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans* noch nicht geklärt werden. Die oben genannten Induktionsbedingungen legen einen Zusammenhang zwischen Wirtsbefall und filamentösem Wachstum nahe. Der Dimorphismus ist allerdings keine zwingende Voraussetzung für die Pathogenität von Pilzen im allgemeinen. Es sind sowohl eine Reihe von dimorphen apathogenen Pilzen bekannt (z. B. *S. cerevisiae*), als auch eine Reihe von filamentösen Spezies der Gattung *Aspergillus* mit apathogenen und pathogenen Arten. *C. glabrata* und *Cryptococcus neoformans* galten lange Zeit als afilementöse pathogene Pilze. Es konnten allerdings inzwischen auch filamentöse Formen nachgewiesen werden (Csank und Haynes, 2000; Wickes *et al.*, 1996).

Für *C. albicans* wird angenommen, daß die Myzelform die invasive und parasitäre Form darstellt, während die Hefeform vor allem für die Besiedlung und Verbreitung im Wirt benötigt wird (Odds, 1988). Bei fast allen Infektionsarten wurden beide morphologischen Formen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß Hyphen und Pseudohyphen besser an Endo- und Epithelien adhäreren als Hefen (Cutler, 1991; Hostetter, 1994), während Hefen der schnellen Vermehrung und Verbreitung im Blutstrom dienen. Die filamentöse Form von *C. albicans* weist mehr hydrophobe Zellwandbestandteile auf, die die Adhäsion begünstigen und die Penetration in tieferliegende Zellschichten ermöglichen (Odds, 1994). Außerdem kann *C. albicans* nach der Phagozytose aus den Makrophagen in Form von Hyphen herauswachsen (Vazquez-Torres und Balisch, 1997).

1.6.2 Adhäsion an Wirtszellen

Die Adhäsion an Wirtszellen ist als weiterer Virulenzfaktor von *C. albicans* für eine erfolgreiche Kolonisation und Infektion des Wirtsgewebes von Bedeutung (Odds, 1994; Pendrak und Klotz, 1995). Die Bedeutung der Adhäsion und der damit verbundenen Oberflächenhydrophobizität wird dadurch unterstrichen, daß bei den pathogenen Hefen *C. albicans* und *C. tropicalis* eine erhöhte Oberflächenhydrophobizität und dadurch wesentlich bessere Adhärenz an epitheliale

Wirtszellen, im Vergleich zu den harmlosen Arten *C. krusei* und *C. guilliermondii*, festgestellt wurde (McCulloch *et al.*, 1996). *C. albicans* ist in der Lage, an Endothelzellen, Blutplättchen, Bakterien und sogar Kunststoffoberflächen zu adhären (Douglas, 1995). Die Adhäsion stellt die Voraussetzung für die transepitheliale Migration von *C. albicans* dar (Weide und Ernst, 1999).

Man unterscheidet unspezifische und spezifische Adhäsion. Die unspezifische Adhäsion wird durch hydrophobe Zelloberflächen und die spezifische Adhäsion durch spezielle Rezeptoren (Adhäsine) vermittelt. Die letztere wird in drei Kategorien unterteilt, wobei Adhäsine den Kontakt zwischen *C. albicans* und dem Wirt vermitteln (Calderone und Braun, 1991). Die erste Kategorie umfaßt Moleküle, die an der Interaktion zwischen einem mannosylierten Protein von *C. albicans* und dem Proteinanteil eines Glykoproteins der Wirtszelle beteiligt sind. Dazu gehören Integrin-ähnliche Moleküle (Calderone und Braun, 1991), mit deren Hilfe der Pilz auch an Fibrinogen- (Casanova *et al.*, 1992), Fibronectin- (Skerl *et al.*, 1984; Klotz, 1990; Klotz und Smith, 1991; Negre *et al.*, 1994) sowie Laminin- Bestandteile (Bouchara *et al.*, 1990; Lopez-Ribot *et al.*, 1996) der Wirtszelloberflächen binden kann. Die zweite Kategorie ermöglicht eine Bindung an die Zuckerreste von Glykoproteinen auf der Oberfläche der Wirtszelle. Hierbei bindet der Proteinanteil der Glykoproteine an der Zelloberfläche von *C. albicans* Lektin-ähnlich an die Zuckerreste von Glykoproteinen auf der Wirtszelle. Hierbei werden Zuckerstrukturen, wie z. B. Fukose und N-Acetylglukosamin erkannt (Brassart *et al.*, 1991; Douglas *et al.*, 1995; Cameron und Douglas, 1996). Die dritte Kategorie von Adhäsinen wird aus solchen Mannoproteinen von *C. albicans* zusammengesetzt, die Zielrezeptoren in der Wirtszelle binden, die noch nicht näher charakterisiert sind (Calderone und Braun, 1991; Odds, 1994). Das einheitliche Prinzip aller drei Kategorien beruht auf einer Interaktion von glykosylierten *C. albicans*-Proteinen mit der Wirtszelloberfläche. Diese Tatsache verdeutlicht die Bedeutung der Glykosylierung für die Virulenz. Es konnte am Beispiel der Mannosyltransferasen Pmt1p und Mnt1p gezeigt werden, daß Stämme mit *O*-Glykosylierungsdefekten eine eingeschränkte Adhäsion an humane Darmepithelzellen haben und im Mausmodell weniger virulent sind (Timpel *et al.*, 1998; 2000; Buurman *et al.*, 1998).

1.6.3 Sekretion als Virulenzeigenschaft

Neben den oben erwähnten Virulenzfaktoren wird auch die Sekretion einer Reihe von Enzymen in *C. albicans* für Pathogenität und Virulenz verantwortlich gemacht. Dazu gehören Phospholipasen (Ibrahim *et al.*, 1995; Leidich *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 2000), N-Acetylglucosaminidasen (Molloy *et al.*, 1994), Phosphatasen (Csank *et al.*, 1997), Siderophore (Sweet und Douglas, 1991) und die gut untersuchte Genfamilie der sauren Aspartatproteasen (Magee *et al.*, 1993; Hube *et al.*, 1994; Hube, 1997). Den hydrolytischen Enzymen wird eine Funktion bei Ernährung des Pilzes innerhalb des Wirts zugesprochen. Durch sie besteht die Möglichkeit, neben Glukose auch andere C-Quellen nutzbar zu machen. Außerdem wird ihnen eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung von Zellwandproteinen, bei

der Adhäsion an Epithelzellen und der Invasion des Wirts zugeschrieben. So konnte z. B. gezeigt werden, daß die Sekretion von N-Acetylglucosaminidasen und sauren Aspartatproteasen dem Pilz einen verbesserten Zugang zur Wirtsoberfläche verschafft, um ein schnelles Eindringen der Hyphen in die tiefer gelegenen Gewebeschichten zu ermöglichen (Matthew, 1994). Bisher wurden in *C. albicans* zehn Gene für Aspartatproteasen (*SAP*) isoliert (Hube, pers. Mitteilung), die teilweise im dimorphen Wachstum differentiell exprimiert werden. Die Transkripte von *SAP4-6* konnten lediglich während der Hyphenbildung und *SAP2* konnte nur in der Hefeform von *C. albicans* nachgewiesen werden (Hube *et al.*, 1994). Eine weitere Zelltyp-spezifische Transkription findet in „opaque“-Zellen des Stammes WO-1 statt (siehe 1.6.4). Es wurde gezeigt, daß *SAP1*, *SAP3* und *SAP8* spezifisch in diesen Zellen exprimiert werden (Hube *et al.*, 1994). Diese komplizierte differentielle Expression der *SAP*-Gene wird in Anpassung an die verschiedenen Habitate von *C. albicans* durch den pH-Wert reguliert. Darüber hinaus werden im zeitlichen Verlauf der Gewebeinvasion unterschiedliche *SAP*-Gene exprimiert (Schaller *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2001). Nach der frühen Phase der Invasion mit der Expression von *SAP1* und *SAP2* folgt die Expression von *SAP8*, die wiederum von der *SAP6* Expression in der Phase der intensiven Hyphenbildung abgelöst wird. *SAP*-Mutanten zeigen eine veränderte Adhäsion an humane epitheliale Mundschleimhautzellen (Watts *et al.*, 1998). Eine verminderte Adhäsion konnte in *sap1*-, *sap2*- oder *sap3*-Deletionsstämmen gezeigt werden. Diese zeigen ebenso wie eine *sap4-6* Tripelmutante eine verminderte Virulenz (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997). Allerdings wurde bei der *sap4-6* Tripelmutante eine verstärkte Adhäsion festgestellt, trotz ihrer verminderten Virulenz (Watts *et al.*, 1998).

C. albicans verfügt extrazellulär neben den Aspartatproteasen auch über lipolytische Enzyme, wie die Phospholipasen (Fu *et al.*, 1997). Diese Genfamilie stellt einen weiteren potentiellen Virulenzfaktor dar. Allerdings konnte bisher nur für *C. albicans*-Stämme mit einer *plb1*-Deletion eine verminderte Virulenz bei unveränderter Adhäsion gezeigt werden (Leidich *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 2000). Daher geht man auch hier wie bei den *SAP*'s davon aus, daß das sekretierte Enzym zur Schädigung der Wirtszellmembran dient und dadurch die Penetration ermöglicht (Fu *et al.*, 1997). Zusätzlich könnten diese Abbauprodukte der Wirtszellmembran auch als Kohlenstoffquellen von *C. albicans* genutzt werden. Die große Zahl der sezernierten Proteine und insbesondere ihre differentielle Expression verleiht *C. albicans* eine hohe metabolische Flexibilität, welche durch den reversiblen Wechsel zwischen Blastosporen und Filamenten noch verstärkt wird.

1.6.4 Andere Virulenzfaktoren

Unter dem Begriff „Phenotypic-Switching“ versteht man einen spontan auftretenden Wechsel des Phänotyps, der sich durch die Änderung der Zellmorphologie und die Änderung physiologischer Eigenschaften äußert. Der *C. albicans* Stamm WO-1 ist z. B. in der Lage, in zwei unterschiedlichen Koloniephänotypen aufzutreten (Slutsky *et al.*, 1987). Während die Zellen des „white“-Phänotyps in der Hefeform vorliegen und auf festen Nährböden weiße

Kolonien formen, bilden die stäbchenförmigen Zellen des „opaque“-Phänotyps dunkle Kolonien. Dieser Phänotypwechsel wird durch die differentielle Expression phasenspezifischer Gene begleitet, die neben der Zellmorphologie auch die Zellphysiologie determinieren. Dieses hat auch Auswirkungen auf physiologischer Ebene, z. B. veränderte Antigene des Pilzes, die seine Adhäsion an Wirtszelloberflächen erhöhen (Soll *et al.*, 1993). Auch die Sensitivität gegenüber Antimykotika (Soll *et al.*, 1993) oder die Sekretion von sauren Aspartatproteasen ist phasenspezifisch verändert (Morrow *et al.*, 1992).

Der Thigmotropismus ist eine weitere mögliche Virulenzeigenschaft (Sherwood *et al.*, 1992). Hiermit wird das Wachstum eines Organismus als Antwort auf mechanische Reize oder direkte Berührung mit festen Körpern entlang einer Oberfläche bezeichnet (Nultsch, 1991). Diese Eigenschaft wurde auch bei *C. albicans* beobachtet und mit der Virulenz in Zusammenhang gebracht (Sherwood *et al.*, 1992). Auch molekulare Mimikry, d. h. die Tarnung des Pilzes durch die Umhüllung seiner Zellen mit Bestandteilen des Wirtes oder die Expression wirtsähnlicher Oberflächenproteine, wird diskutiert. Diese Strategie ermöglicht es *C. albicans*, sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunabwehr des Wirtes besser zu entkommen und damit seine Invasion und Verbreitung im Körper fortzusetzen (Sherwood *et al.*, 1992).

1.6.5 Sekretionsweg in *Candida albicans*

Dem Sekretionsweg bei *C. albicans* ist bisher kaum Beachtung geschenkt worden, obwohl die Bedeutung von Ausschleusungsprozessen für extrazelluläre Hydrolasen und andere Proteine und somit für die Virulenz von *C. albicans* außer Zweifel steht (siehe oben). Von allen bisher bekannten Proteinen des Sekretionsweges von *C. albicans* konnte gezeigt werden, daß sie in *S. cerevisiae* Defekte in homologen Proteinen komplementieren können. Dieses gilt für die Genprodukte der essentiellen *C. albicans*-Gene *SEC18*, *SEC14*, *SEC4* und *YPT1* (Nieto *et al.*, 1993; Mao *et al.*, 1999; Monteoliva *et al.*, 1996; Riggle *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001). Bisher ist allerdings wenig über die Funktion von Sec18p und Sec14p in *C. albicans* bekannt. Von Sec4p und Ypt1p wurde gezeigt, daß dominant-negative Mutanten dieser Ras-ähnlichen GTPasen in *C. albicans*, ähnlich wie bei den homologen Proteinen von *S. cerevisiae*, sekretorische Vesikel in der Zelle anreichern und daß die Sekretion von Sap-Proteinen beeinträchtigt ist (Mao *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die nahe genetische Verwandtschaft zwischen Säugerzellen und Pilzen erschwert die Entwicklung neuer Antimykotika. Daher stellt die Identifikation pilzspezifischer Proteine und Proteinreaktionen einen sinnvollen Ansatz zur Identifikation potentieller antimykotischer „targets“ dar. Dies gilt besonderes, wenn die betreffenden Proteine an Virulenzeigenschaften von *C. albicans* beteiligt sind. Während die meisten Proteine des Sekretionsweges in allen Eukaryoten vertreten sind, stellt Sec20p eine Ausnahme dar. Zu Sec20p aus *S. cerevisiae* konnte

in Säugern bisher kein homologes Protein gefunden werden (Sweet und Pelham, 1992). Daraus ergab sich die Frage, ob Sec20p ein spezifisches Protein für *S. cerevisiae* darstellt oder ob es auch in anderen Hefen existiert.

Für diese Arbeit stand ein cDNA Fragment von *C. albicans SEC20* zur Verfügung, mit dessen Hilfe *SEC20* von *C. albicans* aus einer genomischen Genbank isoliert werden sollte (Swoboda *et al.*, 1993). Nach Disruption von *SEC20* sollten die erhaltenen Mutanten-Stämme eingehend analysiert werden. Im Verlauf der Arbeit war ein Phänotypisierung der Mutanten angestrebt. Zu den zu untersuchenden Phänotypen gehörten Wachstum, Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antimykotika und anderen Substanzen, sowie morphologische Veränderungen. Weiterhin sollte Sec20p auf posttranslationale Modifikation und deren Einfluß untersucht werden. Anhand von Computeranalyse sollten Interaktionspartner von Sec20p identifiziert und anschließend im „Two-Hybrid-System“ analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Laborchemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Acros (Gelnhausen), Amersham (Braunschweig), Biorad (München), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Calbiochem (Bad Soden), Dianova (Hamburg), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Kodak (New Haven), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Oxoid (Wesel), Pharmacia (Freiburg), Pierce (Rockford), Promega (Madison), Qiagen (Hilden), Riedel-De Haen (Hannover), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Whatman (Maidstone, GB). Soweit nicht anders vermerkt wurden Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet. Radioisotope wurden von Amersham (Braunschweig) und ICN (Köln) erworben.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*) sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 α F'	F' [Φ 80 (Δ lacZ) M15] Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 r _k ⁻ m _k ⁺ supE44 thi-1 gyrA relA	Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA (Woodcock <i>et al.</i> , 1987)
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 lac[F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10(Tet ^r)]	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)

2.2.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

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

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurden dem Nährmedium nach dem Autoklavieren Antibiotika zugesetzt. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 μ g/ml, Kanamycin in einer Konzentration von 50 μ g/ml zugegeben. Feste Nährmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Die Anzucht erfolgte bei 37°C.

2.2.3 Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2 (*S. cerevisiae*) bzw. Tabelle 3 (*C. albicans*) dargestellt.

Tabelle 2: *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
PJ69-4A	<i>MATa</i> trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	(James <i>et al.</i> , 1996)
RSY275	<i>MATa</i> sec20-1 ura3-52 his4-619	(Kaiser und Schekman, 1990)
SEY6210	<i>MATa</i> leu2,3-112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1- Δ 901 lys2-801 suc2- Δ 9 GAL+	(Robinson <i>et al.</i> , 1988)
MLY101	<i>MATa</i> ura3-52 trp1-1 Δ ufe1::TRP1 mit pUT1 (CEN6, LEU2, ufe1-1)	(Lewis und Pelham, 1996)
11	<i>MATa/a</i> wie SEY6210	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
31	<i>MATa/a</i> wie 11	diese Arbeit
11T12	<i>MATa/a</i> wie 11, aber <i>SEC20/SEC20::TRP1-GAL1p-ΔN-SEC20</i>	diese Arbeit
11K5	<i>MATa/a</i> wie 11, <i>SEC20/SEC20::KANMX6-GAL1p-ΔN-SEC20</i>	diese Arbeit
31T2	<i>MATa/a</i> wie 11T12	diese Arbeit
31K7	<i>MATa/a</i> wie 11K5	diese Arbeit

Tabelle 3: *Candida albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
SC5314	Prototroph	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAI4	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	(Fonzi und Irwin, 1993)
CAP1-3121	wie CAI4, aber <i>pmt1/pmt1</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)
CAP4-2164	wie CAI4, aber <i>pmt4/pmt4</i>	von S. Prill
CAP2-1341	wie CAI4, aber <i>pmt6/pmt6</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)
PP46-4286	wie CAI4, aber <i>pmt4/pmt4</i> und <i>pmt6/pmt6</i>	von S. Prill
CPP112	wie CAI4, aber <i>pmt1/pmt1</i> und <i>pmt6/pmt6</i>	(Timpel <i>et al.</i> , 1998)
CA2	wie CAI4, aber <i>SEC20/sec20Δ::hisG-URA3-hisG</i>	diese Arbeit
CA10	wie CA2	diese Arbeit
CA2d	wie CAI4, aber <i>SEC20/sec20Δ::hisG</i>	diese Arbeit
CA10a	wie CA2d	diese Arbeit
CAr2d110	wie CAI4, aber <i>sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20</i>	diese Arbeit
CAr10a3	wie CAr2d110	diese Arbeit
CA2d1m	wie CAI4, aber <i>sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20</i>	diese Arbeit
CA2d2m	wie CA2d1m	diese Arbeit
CA2d6m	wie CA2d1m	diese Arbeit

2.2.4 Medien und Anzucht von Hefe

Vollmedium (YPD)	:1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
YPGal	:1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 0,2 % Glukose, 2 % Galaktose
YP4D	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 4 % Glukose
YPCAA	: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Casaminosäuren
Minimalmedium (SD):	0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose; pH 6,9 mit NaOH eingestellt
SCAA	:0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Casaminosäuren; pH 6,9 mit NaOH eingestellt
SDMC	:0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, 2,5 mM Methionin, 2,5 mM Cystein; pH 6,9 mit NaOH eingestellt
Na-Laktat-Medium	:0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base, ohne Aminosäuren aber mit Ammoniumsulfat), 0,04 % Arginin, 0,08 % Asparaginsäure, 0,26 % Glutaminsäure, 0,02 % Glycin, 0,03 % Histidin, 0,06 % Isoleucin, 0,08 % Leucin, 0,09 % Lysin, 0,04 % Phenylalanin, 0,05 % Threonin, 0,01 % Tyrosin, 0,08 % Valin, 2 % Na-Laktat
Aminosäuren wurden	wie bei Zimmermann (1975) beschrieben zugegeben.
FOA-Medium	:0,02 % FOA, 0,001 % Uridin, 2 % Glukose, 0,17 % YNB, 0,1 % Prolin (McCusker und Davis, 1991)

Das FOA-Medium dient zur Selektion von *C. albicans* Stämmen, die das *URA3*-Gen durch Rekombination verloren haben.

Die Platten wurden mit 1,5 % Agar hergestellt. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30°C.

2.2.5 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigem Medium

Für die Hypheninduktion in Flüssigmedien wurden über Nacht bis zu einer $OD_{600}=1$ angezogene Zellen nach Waschen in 2 %iger Glukose auf eine $OD_{600}=0,1$ überführt. Nach Zugabe von 5 % Serum wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und Hyphen in 20 minütigen Abständen unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.6 Hypheninduktion in *C. albicans* auf festem Medium

Zur Hypheninduktion auf festen Medien wurden Serumplatten angefertigt. Diese enthielten 1,35 % Agar, 0,5 % Ammoniumsulfat und 5,10 oder 20 % Pferdeserum. Die Hypheninduktion konnte auch in Anwesenheit von Glukose stattfinden. Dann enthielten die Serumplatten zusätzlich 2 % Glukose. Die Hyphenbildung wurde bei 37°C induziert und wurde über mehrere Stunden beobachtet.

Die Hypheninduktion konnte auch auf „Mangelmedium“ erfolgen. Hierzu wurden „Spider-Platten“ hergestellt (Liu *et al.*, 1994). Sie bestanden aus 1 % Nutrient Broth, 1 % Mannitol, 0,2 % K_2HPO_4 und 1,35 % Agar. Die Inkubation der Stämme erfolgte für 2-5 Tage bei 30°C oder 37°C.

2.2.7 Medien mit Antimykotika

Zur Phänotypisierung der *C. albicans* Stämme wurde deren Sensitivität gegen unterschiedliche Substanzen getestet. Es wurden Vollmedium-Platten mit 4 % Glukose oder mit 2 % Casaminosäuren angefertigt, denen nach dem Autoklavieren die entsprechende Chemikalie (Tabelle 4) zusetzt wurde. Vor der Zugabe der zu testenden Substanz wurde der Agar auf mindestens 50°C abgekühlt.

Tabelle 4: Verwendete Testsubstanzen mit ihren jeweilig eingesetzten Konzentrationen.

Testsubstanz	Firma	Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration im Agar
Calcofluor	Sigma	25 mg/ml	dH ₂ O	10-100 µg/ml
Clotrimazol	Sigma	5 mg/ml	DMF	0,5-2 µg/ml
G418	Calbiochem	50 mg/ml	dH ₂ O	600-1200 µg/ml
Hygromycin B	Calbiochem	385 mg/ml	dH ₂ O	100-400 µg/ml
Koffein	Sigma	100 mM	dH ₂ O	5-20 mM
SDS	Serva	10 %	dH ₂ O	0,03-0,06 %
Vanadat	Aldrich	500 mM	dH ₂ O	2,0 – 5,0 mM
Nystatin	Serva	10 mg/ml	PBS	1,5 – 3 µg/ml
Neomycin	Sigma	500 mM	dH ₂ O	10-100 mM
Congo Red	Sigma	20 mg/ml	dH ₂ O	200-1000 µg/ml

2.3 Plasmide und Primer

2.3.1 Basisplasmide

Zur Klonierung wurden sowohl reine *E. coli* – Plasmide (Tabelle 5), als auch *S. cerevisiae* – (Tabelle 6) bzw. *C. albicans* – Vektoren (Tabelle 7) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Bakterienplasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
p5921	pUC18 mit <i>hisG-URA3-hisG</i> -Kassette	(Gow <i>et al.</i> , 1994)
pUC18	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUC19	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
Klone1-8-1	cDNA Klone aus <i>C. albicans</i> Stamm 3153 in pUC18	(Swoboda <i>et al.</i> , 1993)
p1367/1	pUC18 mit <i>CaURA3</i> Gen	(Losberger und Ernst, 1989)

Tabelle 6: Verwendete *S. cerevisiae* Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pJJH461r	<i>ScURA3</i> markierter 2 μ /ARS-Vektor mit <i>PFK2</i> Promotor	(Raben <i>et al.</i> , 1995)
pJJH70	<i>ScURA3</i> markierter CEN/ARS-Vektor mit <i>PFK2</i> Promotor	(Raben <i>et al.</i> , 1995)
YCplac33	<i>ScURA3</i> markierter CEN-Vektor	(Gietz und Sugino, 1988)
YCpHO	YCp50-Derivat, das für die HO-Endonuklease kodiert	(Russell <i>et al.</i> , 1986)
STM20	<i>ScURA3</i> markierter 2 μ Vektor mit <i>TPH1-ScSEC20</i>	(Sweet und Pelham, 1992)
pGBD-C(x)	Two-Hybrid-Vektor mit <i>GAL4</i> -Bindedomäne	(James <i>et al.</i> , 1996)
pGAD-C(x)	Two-Hybrid-Vektor mit <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne	(James <i>et al.</i> , 1996)
pFA6a-TRP1-PGAL1	Plasmid, das ein Modul enthält zur Platzierung eines Gens unter die Kontrolle des <i>GAL1</i> - Promotors. Als selektiver Marker ist das <i>S. cerevisiae</i> <i>TRP1</i> -Gen enthalten.	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pFA6a-kanMX6-PAGL1	Plasmid, das ein Modul enthält zur Platzierung eines Gens unter die Kontrolle des <i>GAL1</i> - Promotors. Als selektiver Marker ist das <i>kanMX6</i> -Modul enthalten.	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)

Tabelle 7: Verwendete *C. albicans* Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pRC2312	<i>CaURA3</i> markierter <i>CaARS</i> -Vektor	(Cannon <i>et al.</i> , 1992)
pRC18	wie pRC2312, aber mit dem Polylinker aus pUC18	(Stoldt <i>et al.</i> , 1997)
pBI-1	<i>PCK1</i> Promotor in pRC2312	(Stoldt <i>et al.</i> , 1997)
pCaDis	<i>CaURA3</i> markierter Vektor mit <i>MET3</i> Promotor	(Care <i>et al.</i> , 1999)
pBT 44	wie pBI-1, nur mit <i>CaADE</i> markiert und nicht <i>CaURA3</i>	(Tebarth, 2001)

2.3.2 *S. cerevisiae* Plasmide mit *CaSEC20*

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide zur genetischen Manipulation von *S. cerevisiae* bzw. *C. albicans* sind in Tabelle 8 bzw. Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae* Plasmide und deren „Vorläufer“ (vergleiche hierfür auch Tabelle 9)

Name	Vektor	Insert
pYW 9	pJJH70 (<i>Bam</i> HI)	1,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment (mit <i>CaSEC20</i>) aus pYW1
pYW 10	pJJH461r (<i>Bam</i> HI)	1,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment (mit <i>CaSEC20</i>) aus pYW1
pYW 11	YCplac33 (<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pYW2
pYW 19	pGBD-C3 (<i>Bam</i> HI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW80

Name	Vektor	Insert
pYW 19	pGBD-C(3) (<i>Bam</i> HI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW80
pYW 24	pGBD-C(3) (<i>Bam</i> HI)	0,6 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW66
pYW 25	pGAD-C(3) (<i>Bam</i> HI)	0,6 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW66
pYW 29	pGAD-C(3) (<i>Bam</i> HI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW80
pYW 66	pUC18 (<i>Sma</i> I)	0,6 kb PCR-Fragment, Primer #341+#344 auf pYW1
pYW 80	pUC18 (<i>Sma</i> I)	2,5 kb PCR-Fragment, Primer #421+#423 auf WT SC5314
pYW 30	pUC18 (<i>Sma</i> I)	1 kb PCR-Fragment, Primer #349+#350
pYW 33	pJH70 (<i>Bam</i> HI)	1 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus pYW30
pYW103	pJH461r (<i>Bam</i> HI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW80
pYW104	pJH70 (<i>Bam</i> HI)	2,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW80

2.3.3 *C. albicans* Plasmide mit *CaSEC20*

Tabelle 9: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *C. albicans* Plasmide und deren „Vorläufer“

Name	Vektor	Insert
pYW C3	pUC18 (<i>Xba</i> I)	4,3 kb <i>Xba</i> I-Fragment aus Fosmid 7B11
pYW S10	pUC18 (<i>Sph</i> I)	2,9 kb <i>Sph</i> I-Fragment aus pYW2/8
pYW 2/8	pRC18 (<i>Hind</i> III)	4,2 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus Fosmid 7B11
pYW 1	pUC18 (<i>Sma</i> I)	1,1 kb PCR-Fragment (mit <i>CaSEC20</i>), Primer #341+342 auf pYW2/8
pYW 1S	pUC19 (<i>Sal</i> I)	2,3 kb <i>Sal</i> I-Fragment aus pYW2/8 bzw. pYW1411
pYW 01	pYW2 (<i>Bgl</i> II)	4 kb <i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus p5921
pYW 2	pYW1S (<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I)	0,9 kb <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I-Fragment aus pYW2/8
pYW 02	pYW2 (<i>Hpa</i> I/ <i>Bgl</i> II)	4 kb <i>Sac</i> I (aufgefüllt)/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus p5921
pYW 3	p1367/1 (<i>Bam</i> HI)	1,8 kb <i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW2
pYW 4	pYW6 (<i>Hind</i> III aufgefüllt/ <i>Pst</i> I)	3,2 kb <i>Sma</i> I/ <i>Pst</i> I-Fragment aus pYW3
pYW 04	pUC18 (<i>Sac</i> I/ <i>Hinc</i> II)	3,4 kb <i>Hpa</i> I/ <i>Sac</i> I-Fragment aus pYW2/8
pYW 05	pUC18 (<i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III)	3,2 kb <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pYW2/8
pYW 6	pUC18 (<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)	2,6 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pYW7
pYW 06	pUC21 (<i>Bgl</i> II)	3,3 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus pYW2/8 bzw. pYW1411
pYW 7	pBI-1 (<i>Bgl</i> II)	1,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW1
pYW 07	pUC21 (<i>Bgl</i> II)	1,0 kb <i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW2
pYW 08	pUC19 (<i>Sal</i> I/ <i>Hind</i> III)	0,9 kb <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pYW2/8
pYW 09	pUC18 (<i>Hind</i> III)	4,0 kb <i>Hind</i> III-Fragment aus Fosmid 14H1
pYW 20	pCaDis (<i>Bam</i> HI)	0,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pYW21
pYW 21	pUC18 (<i>Sma</i> I)	0,5 kb PCR-Fragment, Primer #341+ #343 auf pYW1
pYW 69	pBI-1 (<i>Bgl</i> II)	1,1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment (<i>CaSEC20</i>) aus pYW61
pYW 61	Religation	PCR auf pYW1 mit Primer #357 + #346
pYW101	pBI-1 (<i>Bgl</i> II)	2,4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus pYW89 (<i>CaTIP20</i>)
pYW102	pBT 44 (<i>Bgl</i> II)	2,4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II-Fragment aus pYW89 (<i>CaTIP20</i>)
pYW 89	pUC18 (<i>Sma</i> I)	2,4 kb PCR-Fragment (<i>CaTIP20</i>), Primer #421 + #464
pYW 91	pYW 69 (197/1 N→A)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #424 + #425
pYW 92	pYW 69 (284/1 TT→AA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #426 + #427

Name	Vektor	Insert
pYW 93	pYW 69 (320/1 TTSS→AAAA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #428 + #429
pYW 94	pYW 69 (277/1 SS→AA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #430 + #431
pYW 95	pYW 69 (300/1 TxS→AxA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #432 + #433
pYW 96	pYW 69 (267/1 S→A)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #434 + #435
pYW 97	pYW 69 (294/1 TxT→AxA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #436 + #437
pYW 98	pYW 69 (270/2 SxS→AxA)	PCR auf pYW 69 (pBI- <i>SEC20</i>) mit Primer #438 + #439

2.3.4 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
M13 rev.	AACAGCTATGACCATG	"Downstream"-Primer zur Sequenzierung von Inserts in pUC-Vektoren
M13 U-40	GTAAAACGAGGCCAGT	"Upstream"-Primer zur Sequenzierung von Inserts in pUC-Vektoren
341	CAGCGGATCCAATGTCAACAG	"Upstream"-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>CaSEC20</i> mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
342	AACAACGGATCCAATGTCAAAG	"Downstream"-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>CaSEC20</i> mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
343	GTTGTCAGGATCCAATTCCTCTG C	"Downstream"-Primer zur PCR-Amplifikation, der ersten 530 bp von <i>CaSEC20</i> mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
344	AATGGATCCCTAACGTTGACGGTC	"Upstream"-Primer zur PCR-Amplifikation, der ersten 530 bp von <i>CaSEC20</i> mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
349	CTCACGGATCCAATGACCGACTTA ACACC	"Upstream"-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>CaUFE1</i> aus <i>C. albicans</i>
350	GACTTGAGATCTAAACCAGGGTCG CCAGTG	"Downstream"-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>CaUFE1</i> aus <i>C. albicans</i>
351	CGAAATCCAGTTCTTCGACC	"Downstream"-Primer (<i>ScSEC20</i> , +371 bp) zur PCR-Überprüfung der N-terminalen <i>ScSec20p</i> Deletion in <i>S. cerevisiae</i> .
352	GTAAGATCGGATCACGCTGC	"Upstream"-Primer (<i>ScSEC20</i> Promotor, -56 bp) zur PCR-Überprüfung der N-terminalen <i>ScSec20p</i> Deletion in <i>S. cerevisiae</i>
353	TCCTGAAACGCAGATGTGCC	"Upstream"-Primer (<i>GALI</i> -Promotor, -200 bp) zur PCR-Überprüfung der N-terminalen <i>ScSec20p</i> Deletion in <i>S. cerevisiae</i>
355	CAAGTATACGTAATCTCCCC	"Upstream"-Primer (<i>MET3</i> -Promotor, -116 bp) zur PCR-Überprüfung der richtigen Integration von <i>MET3p-CaSEC20</i>

Oligo	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
356	CCGTTTATACCATCCAAATC	"Downstream"-Primer (<i>CaSEC20</i> , +578 bp) zur PCR-Überprüfung der richtigen Integration von <i>MET3p-CaSEC20</i>
359	GTGACATTTTTGCAGGACCTGGAA GTTTTGCAAGATGCATTATTAAT AAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Oligonukleotid zur Herstellung einer Deletion der 95 N-terminalen Aminosäuren von ScSec20p in <i>S. cerevisiae</i>
360	AGCTTCACAATATGCAACTTATCG CATTGATCGTATCTAGGGCTTTTT CCATTTTGAGATCCGGGTTTT	Oligonukleotid zur Herstellung einer Deletion der 95 N-terminalen Aminosäuren von ScSEC20p in <i>S. cerevisiae</i> , mit Start-ATG
421	CAATAGGATCCTATTACAATGGAT GACAAC	"Upstream"-Primer zu PCR-Amplifikation(mit <i>CaSEC20</i>) von <i>CaTIP20</i> aus <i>C. albicans</i>
423	TTAAGGATCCTGCATGGTCTTGCA TGTG	"Downstream"-Primer zu PCR-Amplifikation von <i>CaTIP20</i> aus <i>C. albicans</i>
443	ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC	"Upstream"-Primer zum Nachweis von <i>CaEFB1</i> c-DNA durch RT-PCR
444	CATCTTCAACAGCAGCTTG	"Downstream"-Primer zum Nachweis von <i>CaEFB1</i> c-DNA durch RT-PCR
445	CTGTCTACAAGGCCAGCTTTG	"Upstream"-Primer zum Nachweis von <i>CaSEC20</i> c-DNA durch RT-PCR
446	CTGCAATATACCTGCTGATAAC	"Downstream"-Primer zum Nachweis von <i>CaSEC20</i> c-DNA durch RT-PCR
346	AGATAAGAATGCGGCCGC TTCCAT TGATGATGTCG	Primer mit <i>NotI</i> -Schnittstelle für die Integration des c-myc-Epitops in das <i>CaSEC20</i> -Gen
357	AGATAAGAATGCGGCCGC AATGG AACAGAAGTTGATTTCCGAAGAAG ACCTCCATATTGTAGATGAACTAT AGG	Primer mit c-myc-Tag und <i>NotI</i> -Schnittstelle für c-myc-Epitop Integration in das <i>CaSEC20</i> -Gen
424	CAACGATTTGTTAGCTAGATCTAA GAAAATTGTC	Mutagenese Primer 197/1 N→A
425	GACAATTTTCTTAGATCTAGCTAA CAAATCGTTG	Mutagenese Primer 197/2 N→A
426	CTGTGATTGCTGCTGCCGCGGAAA TCGTCTGACTATGAGGC	Mutagenese Primer 284/1 TT→AA
427	GCCTCATAGTCGACGATTTCCGCG GCAGCAGCAATCACAG	Mutagenese Primer 284/2 TT→AA
428	GGTAGTGGAATCTCTTGCGGCAGC AGCAATGGAAGCGGCCGC	Mutagenese Primer 321/1 TTSS→AAAA
429	GCGGCCGCTTCCATTGCTGCTGCC GCAAGAGATTCCACTACC	Mutagenese Primer 321/2 TTSS→AAAA
430	CTGCAAGTGATATGATAGTTGCAG CTGTGATTGCTGCTACCACGG	Mutagenese Primer 278/1 SS→AA
431	CCGTGGTAGCAGCAATCACAGCTG CAACTATCATATCACTTGCAAG	Mutagenese Primer 278/2 SS→AA

Oligo	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
432	CGAAACTTTGTTGGATGCCTTGG CCAACGCTGTGGACTC	Mutagenese Primer 299/1 TxS→AxA
433	GAGTCCACAGCGTTCGCCAAGGCA TCCAACAAAGTTTTTCG	Mutagenese Primer 299/2 TxS→AxA
434	GCTTGGAGGTGGTAGAGCTAAAG GGTTATCTGC	Mutagenese Primer 267/1 S→A
435	GCAGATAACCCTTTAGCTCTACCA CCTCCAAGC	Mutagenese Primer 267/2 S→A
436	CGTCGACTATGAGGCAGCGAAAA GCTTTGTTGGATACCTTGTCG	Mutagenese Primer 293/1 TxT→AxA
437	CGACAAGGTATCCAACAAAGCTTT CGCTGCCTCATAGTCGACG	Mutagenese Primer 293/2 TxT→AxA
438	GGTAGAAGTAAAGGGTTAGCTGC AGCTGATATGATAGTTTCATC	Mutagenese Primer 271/1 SxS→AxA
439	GATGAACTATCATATCAGCTGCA GCTAACCTTTACTTCTACC	Mutagenese Primer 271/2 SxS→AxA
464	AATAGATCTCACTTGTGCATCGTCA TCCTTGTAATCGATGTCATGATCTT TATAATCACCGTCATGGTCTTTGT AGTCCATATACATTACTCTACTTA ATAAATTCTG	Primer mit 3xflag-Tag und <i>Bgl</i> II-Schnittstelle für 3xflag-Epitop Erstellung am C-Terminus des <i>CaTIP20</i> -Gen

PCR-Produkte wurden über die *Sma*I-Schnittstelle in den Vektor pUC18 (Fa. Pharmacia, SureClone KitTM) kloniert. Dieser ein 2686 bp großer Vektor enthält ein Gen, das eine Ampicillinresistenz vermittelt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

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

2.4.1 Restriktionsendonukleolyse

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

2.4.2 Präparation von RNase (DNase-frei)

RNase A (Fa. Boehringer Mannheim) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und 30 min bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.4.3 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Um kohäsive geschnittene DNA-Enden nach einer Restriktionsendonukleolyse (0,5 µg DNA) 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.

2.4.4 Entfernen von 3'-überhängenden Enden

Die zu behandelnden Fragmente wurden mit 2,5 U T4-Polymerase (Boehringer), je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Anwesenheit des entsprechenden Puffers, 20 min bei 16°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 mM EDTA wurde eine Phenol-/Chloroformextraktion durchgeführt, die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer aufgenommen.

2.4.5 Phosphatasereaktion

Plasmid-DNA wurde für Klonierungszwecke am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung des Plasmides ohne inserierte Fremd-DNA zu verhindern. Dazu wurde nach der Restriktionsendonukleolyse ein Überschuß an alkalischer Phosphatase zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben über ein Agarosegel aufgereinigt.

2.4.6 Ligation

Ligationsreaktionen zur Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle (Insert + Vektor in äquimolaren Konzentrationen) wurden in einem möglichst kleinen Volumen (ca. 10 µl) mit Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP) und T4 DNA-Ligase (bei kohäsiven Enden 0,1 U oder bei stumpfen Enden 1 U) mind. 5 h bei 16°C inkubiert. Die Rezirkularisierung von Plasmiden erfolgte in einem Volumen von 30 µl für 2 h bei RT. Zur Kontrolle wurde immer eine Ligation ohne Insertzugabe angesetzt.

2.4.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA wurde für die Absorptionsmessung bei 260 nm in unvergälltem Ethanol gefällt, da Vergällungsmittel ebenso wie Phenol, RNA und Nukleotide bei 260 nm absorbieren. Nukleoproteine absorbieren bei 260 nm. Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA sowie 33 µg/ml ss DNA (Müller *et al.*, 1993)

2.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die zur Amplifizierung von DNA dienende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Mullis und Fallona (1987) wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Die Annealingtemperaturen, sowie die Elongationszeit wurde den eingesetzten Primern, bzw. dem erwarteten PCR-Fragment angepaßt. PCR-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

2.5.1 Kolonie-PCR

Zur Verifizierung von *S. cerevisiae* oder *C. albicans* Disruptanten wurde eine PCR auf ganzen Zellen durchgeführt. Es wurde etwas Kolonie in 15 µl 0,02 M NaOH-Lösung resuspendiert, für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. In die folgende PCR wurden 2 µl der Suspension bei einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Es wurde die von Roche bezogene HighFidelity-Polymerase eingesetzt und für die PCR den Angaben des Herstellers gefolgt.

2.5.2 Mutagenese-PCR

Punktmutationen wurden mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene generiert.

2.5.3 Konstruktion eines c-myc Epitop markierten Sec20-Proteins

Zur Einführung eines c-myc-Epitops in das *CaSEC20*-Gen wurde eine PCR mit den Primern #346 und #357 (Tabelle 10) auf dem Plasmid pYW1 durchgeführt (94°C, 45 s; 50°C, 45s; 68°C, 1 min; 35 Zyklen). Beide Primer enthalten eine *NotI*-Schnittstelle sowie Homologien zum *CaSEC20*-Gen. Der Primer #357 beinhaltet zusätzlich die 33 Basenpaare umfassende Sequenz für das c-myc-Epitop. Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch Gelelektion aufgereinigt und anschließend über Nacht mit *NotI* geschnitten. Das lineare PCR-Fragment wurde zur Entfernung des Ausgangsplasmids aus dem PCR-Ansatz eine Stunde mit 2 U *DpnI* geschnitten und anschließend wieder durch Gelelektion aufgereinigt. Nach Religation und Transformation in *E. coli* wurde das erhaltene Plasmid (pYW61, siehe Abb. 5) sequenziert, um die Integration des Epitops zu überprüfen. Anschließend wurde der offene Leserahmen von *CaSEC20* einschließlich des Epitops *BamHI* aus pYW61 herausgeschnitten und in pBI-1 unter die Kontrolle des *PCK1*-Promotors gestellt. Das generierte Plasmid wurde mit pYW69 bezeichnet.

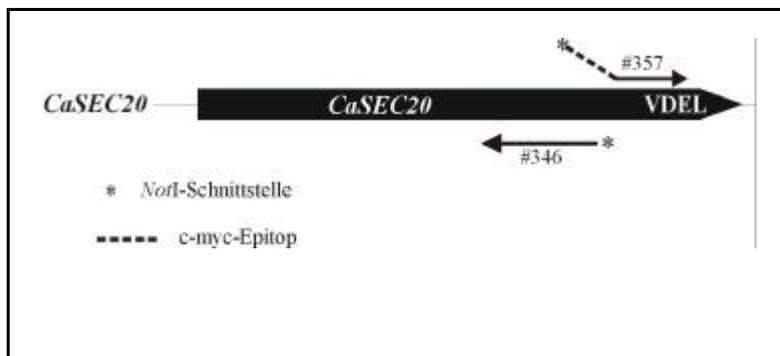


Abb. 5: Schematische Darstellung zur Einführung eines c-myc Epitops in das *CaSEC20*-Gen zur Konstruktion des Plasmids pYW61. Durch die synthetischen Oligonukleotide, die beide eine *NotI*-Schnittstelle enthalten, wurde das c-myc-Epitop in das Leseraster des *CaSEC20*-Gens direkt N-terminal vor dem möglichen ER-Retentionssignal VDEL kloniert.

2.5.4 RT-PCR

Gesamt-RNA wurde wie unter 2.11.2 beschrieben hergestellt und anschließend die Konzentration (vergleiche 2.4.7) abgeschätzt. Die Hefe-RNA wurde nach den Angaben des Herstellers mit DNaseI (Gibco BRL) behandelt. Die reverse Transkription und die anschließende PCR (RT-PCR) wurde in einer Ein-Schritt-Reaktion durchgeführt. Reverse Transkriptase (RT von Sigma), spezifische Primer sowie dNTP's wurden den Angaben des Herstellers folgend in einem Volumen von 50 µl zusammengegeben. Die cDNA Synthese erfolgte bei 45°C für 45 Minuten. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde das Reaktionsgemisch 3 min auf 95°C erhitzt. Es folgte eine PCR mit 30 Zyklen (94°C, 45 s; 56°C, 40s; 72°C, 45s).

2.6 Transformation

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Transformation ist zur Amplifikation klonierter Gene notwendig, sowie zur Herstellung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken. Ihr Erfolg ist abhängig von der DNA (Struktur), der Art der Transformationsmethode und dem Kompetenzgrad der als Empfänger eingesetzten Bakterien. Die Transformation von *E. coli* erfolgt nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan (1983) oder durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988; Wirth *et al.*, 1989).

2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* wurde in Anlehnung an die Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991), durchgeführt.

Zur Konstruktion von Deletionsstämmen und für Transformationen von Genbanken wurden die Zellen mittels der Lithiumacetat-Methode (Gietz *et al.*, 1992) transformiert.

2.6.3 Herstellung von *S. cerevisiae*-Deletionsstämmen

Die Deletion von Genen in *S. cerevisiae* wurde nach der „One-Step-Gene-Replacement“-Methode (Rothstein, 1983) durchgeführt. Die Deletionskonstrukte wurden über PCR in Anlehnung an die von Wach (1996) entwickelte Methode konstruiert. Dabei wurden PCR-Produkte von den Plasmiden pFA6a-kanMX6-PGAL1 oder pFA6a-TRP1-PGAL1 (Longtine *et al.*, 1998) mit den, unter 2.3.4 angegebenen, Oligonukleotiden erzeugt. Zur Herstellung von Deletionsstämmen wurden Stämme mit 10-20 µg DNA des PCR-Produkts mit der Lithiumacetat-Methode transformiert. Transformanden wurden nach einer 8-stündigen Regeneration in Vollmedium auf Geneticin-haltigem Vollmedium (G418 200 mg/l) oder direkt auf Tryptophan-freiem Minimalmedium selektioniert. Die Überprüfung der korrekten Deletion erfolgte mittels PCR.

2.6.4 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans*- Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Sherman *et al.* (1986) in der von Srikantha *et al.* (1995) modifizierten Form. Die Zellen wurden sphäroplastiert. 3 µg Plasmid DNA und 10 µg Fragment (für eine Integration ins Genom) wurden für die folgende Transformation eingesetzt. Alternativ wurde für die Transformation von Plasmiden eine „Schnell-Trafo-Methode“ verwendet. Hierbei wurden 200 µl einer über Nacht Kultur abzentrifugiert und in 100 µl 10 x OSB-Mix (0,2 ml 1 M LiAc, 0,8 ml 50 % PEG 8000, 15 mg DTT, 250 µg ssDNA) aufgenommen. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurden die Zellen gemischt und 60 min bei 43°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C drei Tage inkubiert.

2.7 Herstellung diploider *S. cerevisiae*-Stämme

2.7.1 Induzierter Paarungstyp-Wechsel bei *S. cerevisiae*

Ein haploider Stamm wurde mit dem Plasmid YCpHO transformiert (Russell *et al.*, 1986) und auf Uracil-freiem Medium selektioniert. Durch die auf dem Plasmid kodierte HO-Endonuklease kommt es zum Paarungstypwechsel und anschließend zur Paarung der Hefen. Nach der Paarung erhält man diploide Zellen, die wieder ihr Plasmid verlieren sollen, damit der Paarungstyp, der haploiden Nachkommen, konstant bleibt. Hierfür wurden Transformanden in Vollmedium bis zur stationären Wachstumsphase angezogen und anschließend 1:1000 in frischem Vollmedium verdünnt. Die Anzucht in Vollmedium erfolgte über 4 Tage. Dann wurden die Zellen auf Vollmedium plattiert und nach Wachstum auf Uracil-Mangelmedium gestempelt, um Plasmid-freie diploide Kolonien zu identifizieren.

2.7.2 Sporulation und Tetradenpräparation

Zur Tetradenpräparation wurden die diploiden Zellen in 5 ml YPD-Medium bis zur stationären Wachstumsphase angezogen, 5 min bei 3000 Upm abzentrifugiert und auf 1%igen Kaliumacetat-Platten zur Sporulation aufgetropft. Nach erfolgter Tetraden Bildung (ca. 4-6 Tage bei 30°C) wurden die sporulierten Zellen in 500 µl H₂O suspendiert. Durch eine Inkubation bei RT (7 min), nach Zugabe von 5 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase (Roche, Mannheim) wurde die Ascuswand teilweise abgebaut. Auf Eis konnten die Zellen ca. 2 h aufbewahrt werden. Die Trennung der einzelnen Sporen erfolgte mittels eines Mikromanipulators (Bachhofer Typ 4086) auf einem H₂O-Agaroseplättchen (2,5 %). Nach der Beimpfung mit Sporen wurde dieses auf Vollmedium (0,1 % Glucose; 2 % Galactose) gegeben und bei 30°C für zwei Tage inkubiert.

2.8 Analyse von Proteinen

2.8.1 Antikörper

Die Analyse von Proteinen erfolgte unter anderem mit Hilfe von den in Tabelle 11 angegebenen Antikörpern. Zum Nachweis der Peroxidase des Sekundärantikörpers wurde der ein Chemilumineszenz Essay (PIERCE, Super-Signal[®]Ultra) eingesetzt.

Tabelle 11: Verwendete Antikörperkombinationen

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-c-myc, Maus, 1:500 (9E10; Roche)	Anti-Maus, polyklonal aus Ziege, konjugiert mit Peroxidase, 1:60000 (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.)
Anti-c-myc, Maus, 1:1000 (9E10, Babco)	Anti-Maus, polyklonal aus Ziege, konjugiert mit FITC, 1:3000 (Molecular Probes)
Anti-c-myc, Maus, konjugiert mit Peroxidase, 1:1000 (9E10, Boehringer Mannheim)	
Anti-flag, Maus, konjugiert mit Peroxidase, 1:1000 (Sigma)	
Anti-SAP2, Maus, 1: 2000 (freundlicher Weise von Frau Borg-von Zepelin zur Verfügung gestellt)	Anti-Maus, polyklonal aus Ziege, konjugiert mit Peroxidase, 1:60000 (Jackson Immunologie Research Lab. Inc.)

2.8.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten

Zur Herstellung von Rohextrakten wurden 20 ml SCAA Medium aus einer Übernachtskultur auf OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft und mehrere Stunden bei 30°C inkubiert. Diese Kultur wurde dann bei einer OD₆₀₀ = 1-4 abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm) und das Pellet in 2 ml dH₂O gewaschen und über Nacht bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluß wurde das Pellet in 500 µl RE-Puffer (50 mM HEPES-KOH, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 µg/ml Antipain (Sigma A6191) und PepstatinA (Sigma P4262) und Leupeptin (Sigma L2884), pH 7,5 aufgenommen und mit einem Volumen Glasperlen versetzt. Nach 10 min Schütteln auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel) auf höchster Stufe bei 4°C erfolgte eine Abtrennung der Zelltrümmer und der Glasperlen von dem klaren Überstand durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm). Nach

Bestimmung der Proteinkonzentration (2.8.4) wurden die Rohextrakte (= Überstand) bei -70°C gelagert.

2.8.3 Herstellung von Membranextrakten

Zur Herstellung von Membranextrakten wurden 20 ml logarithmisch wachsende Zellen geerntet. In Anlehnung an die von Sherman *et al.* (1986) in der von Srikantha *et al.* (1995) beschriebenen Methode wurden sphäroplastierte Zellen hergestellt. Diese wurden mit 1 M Sorbitol gewaschen und in 1,2 ml Lysis-Puffer (0,4 M Sorbitol; 150 mM KAc; 20 mM HEPES pH 6,8; 2 mM MgAc; 0,5 mM EGTA) aufgenommen um in 200 μl Aliquots bei -70°C gelagert zu werden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml unterschiedliche Puffer überführt. Es wurde Lysis-Puffer, Lysis-Puffer mit 1 % Triton-X-100, Natriumcarbonat (0,5 M, pH 11,5), Natriumchlorid (1 M) oder Harnstoff (5 M) verwendet. Allen Ansätzen wurde 10 μl DTT (1 M) und Proteaseinhibitor zugesetzt. Nach 1 h auf Eis und 1 h bei RT erfolgte eine Zentrifugation mit 100000 g für 30 min. Das Pellet wurde in 50 μl Laemmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proteine des Überstands wurden mit 10 % TCA gefällt und anschließend auch in Laemmli-Puffer aufgenommen. Auf das Gel wurden jeweils 10 μl des Pellets und die gesamten Proteine des Überstands aufgetragen.

2.8.4 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 15 min bei RT inkubiert und die Messung erfolgte in einem Spektrometer bei 595 nm. Als Standard wurde eine Eichkurve mit 1-15 μg BSA erstellt.

2.8.5 Two-Hybrid-Analyse

Für den Test auf Interaktion zwischen zwei Proteinen wird das eine Protein an die Gal4p-DNA-Bindedomäne (=Gal4p-BD) und das andere an die Gal4p-Aktivierungsdomäne (=Gal4p-AD) fusioniert bzw. umgekehrt. Für die Expression dieser Hybrid-Proteine werden 2 μ -Vektoren verwendet mit der Gal4p-BD bzw. AD unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors. Die Proteine wurden in dem Stamm PJ69-4A (James *et al.*, 1996) auf Interaktion getestet. Dieser Stamm enthält die Reporter-Gene *lacZ*, *HIS3* und *ADE3* unter Kontrolle von Gal4p-abhängigen Promotoren. Als Positivkontrollen werden Proteine verwendet, von denen eine Interaktion bekannt ist. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedlich stark interagierende Proteinpaare eingesetzt. Die stärkste Aktivierung wird durch das Gal4-Protein ausgelöst (+++), gefolgt von der Aktivierung durch die Interaktion des zellulären p53-Proteins und des „large T-Antigen“ vom SV40-Virus (++) (Li und Fields, 1993). Als Positivkontrolle einer schwachen Interaktion wurde die Interaktion von SNF1 und SNF4 (+) (Celenza und Carlson, 1989) eingesetzt.

2.8.6 Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten

2.8.6.1 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („Overlay-Assay“)

Zur groben und schnellen Abschätzung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde der „Overlay-Assay“ verwendet (Suckow und Hollenberg, 1998). Dazu wurden Zellen auf Platten ausgestrichen oder „gefrorgert“ und über Nacht inkubiert. 1 % Agarose wurde mit 10 ml H_2O aufgeköcht und danach mit 10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,0, versetzt. Nach Abkühlen wurden diesem Gemisch 50 μl SDS-Lösung (10 %) und 400 μl X-Gal-Lösung (5 mg/ml in DMF gelöst) zugesetzt. Jede Platte wurde mit 10 ml dieser Lösung überschichtet. Die Platten wurden nach dem Überschichten noch 10 min – 2 h bei 30°C inkubiert und die Blaufärbung überprüft.

2.8.6.2 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die genaue Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die in der „Two-Hybrid“-Analyse verwendet bzw. gefunden wurden, erfolgte mittels einer Endpunktbestimmung. Die OD₆₀₀ einer Übernachtskultur wurde gemessen und 1 ml dieser Kultur abzentrifugiert (2 min, 13000 Upm). Das Pellet wurde in 100 μ l Lysis-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) aufgenommen und bei -70°C mindestens zwei Stunden gelagert. Die Proben wurden bei 30°C aufgetaut und mit 750 μ l Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mg/ml O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid, pH 7,0) bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt und die Inkubationszeit (t) ermittelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Extinktion bei 420 nm photometrisch bestimmt, wobei die Extinktion 1,0 nicht überschreiten sollte. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt (Golemis und Khaha, 1994; Miller, 1992):

$$(1000/t) \times (\text{OD}_{420}/\text{OD}_{600}) = y \text{ Miller-Units.}$$

Für den Test wurden jeweils doppelte Übernachtskulturen angesetzt, von denen wiederum Doppelproben untersucht wurden. Es wurden bei jedem Testansatz Positivkontrollen sowie Negativkontrollen eingesetzt.

2.8.7 Messung der Chitinase-Aktivität

Die Herstellung der Extrakte und die Durchführung des Enzymtests erfolgte in Anlehnung an die Methode von McCreath *et al.* (1995). Von einer in YPD (4 % Glukose) stationär gewachsenen Kultur wurde 1 ml abgenommen und zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet wurde zweimal mit 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und anschließend in 1 ml McIlvaine-Puffer (39 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 61 ml 0,1 M Citronensäure, pH 4,0) resuspendiert. Je 20 μ l des Kulturüberstands bzw. der Zellen wurden mit 20 μ l 250 μ M MUF-Chitotetraose (Sigma; gelöst in McIlvaine-Puffer, pH 4,0) und 60 μ l McIlvaine-Puffer versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 0,5 M Natriumcarbonat-Lösung abgestoppt und anschließend wurde die relative Fluoreszenz der Proben in einem Fluorometer (Fluoroskan Ascent FL von Labsystems) gemessen. Als Negativkontrolle diente McIlvaine-Puffer, als Positivkontrolle diente ein *Dpmt1*-Stamm (Timpel *et al.*, 1998), von dem bekannt ist, daß er eine veränderte Chitinase-Aktivität hat.

2.8.8 BSA Metabolisierung und SAP Sekretion

Die Untersuchungen zur BSA (bovin serum albumin) Metabolisierung und SAP (secreted aspartyl protease) Sekretion in *C. albicans* erfolgte in Anlehnung an die von Moa *et al.* (1999) beschriebene Methode. 5 ml einer SD-Übernachtskultur wurden 5 min bei 5000 Upm abzentrifugiert und in Promotor-inhibierendem Medium aufgenommen. Der Stamm CA2d2m (*sec20 Δ ::hisG/MET3p-SEC20*) wurde in Minimalmedium mit 0,5 M Methionin und 0,5 M Cystein aufgenommen. Bei Versuchen mit dem Stamm CAr10a3 (*sec20 Δ ::hisG/PCK1p-SEC20*) wurde Minimalmedium mit 4 % Glukose eingesetzt. Nach einer Inkubation von weiteren acht Stunden wurden die Zellen 5 min bei 5000 Upm abzentrifugiert und in BSA Medium [1,17 % YCB (yeast carbon base) pH 4,4; 0,01 % YE (yeast extract); 1 % BSA und 4 % Glukose bzw. 2 % Glukose und 0,5 M Methionin/Cystein] aufgenommen. Es wurde eine OD₆₀₀ von zehn eingestellt. Die Zellen wurden weiterhin bei 30°C inkubiert und zu den Zeitpunkten null, zwei, vier usw. Stunden wurden 100 μ l Kultur entnommen. Die entnommene Probe wurde 3 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 3xLaemmli (siehe 2.8.9) versetzt. Anschließend wurden die Proben über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

2.8.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Herstellung der Gele:

Zur Auftrennung von Proteinen wurden denaturierende SDS-Gele verwendet, deren Polyacrylamidkonzentration zwischen 8 und 16 % für Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 150 und 14 kDa variierte. Zunächst wurde das untere Trenngel mit folgender Zusammensetzung gegossen (hier exemplarisch für ein 10 % iges Gel angegeben):

1,56 ml	Trenngelpuffer [1,5 M Tris-HCl; 1,0 % (w/v) SDS; pH 8,8]
2,0 ml	Acrylamidlösung [30 %iges Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); Fa. BioRad]
2,44 ml	aqua bidest.
6 mg	Ammoniumpersulfat
6 µl	TEMED

Das Trenngel wurde sofort nach dem Gießen mit 0,5 %iger (w/v) SDS-Lösung überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wurde die SDS-Lösung mit Wasser herausgespült und das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung gegossen:

0,25 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl; 1,0 % (w/v) SDS; pH 6,8)
0,26 ml	Acrylamidlösung (30 %iges Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); Fa. BioRad)
1,22 ml	aqua bidest.
2 mg	Ammoniumpersulfat
2 µl	TEMED

Zum Gießen der Gele wurde eine Apparatur von Hoefer Scientific (San Francisco, USA) verwendet.

Vorbereitung der Proben:

Die aufzutrennenden Proteine wurden sofort nach der Präparation im Verhältnis 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer (30 % Glycerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/HCl pH 6,8, 15 % β -Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau; Laemmli, 1970) vermischt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proteine im Gel wurden ggf. mit Coomassie (0,3 g Coomassie-Brilliantblue G250, 1,5 ml Methanol, 30 g TCA, ad 30 ml aqua bidest., filtrieren, 180 ml 50 % (w/v) TCA) angefärbt und anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Blaufärbung wieder entfärbt (15 % (v/v) Methanol, 7,6 % (w/v) Essigsäure).

2.8.10 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine über Western Blot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.8.7) auf eine Immobilon-P-Membran (PVDF-Membran von Millipore, Eschborn) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde wie vom Hersteller empfohlen vorbehandelt.

Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) über Nacht bei 150 mA. Eine reversible Anfärbung der übertragenen Proteine wurde ggf. mit Ponceau S-Lösung (250 mg Ponceau S, 40 ml Methanol, 15 ml Essigsäure, ad 100 ml aqua bidest.) durchgeführt.

Zur Sättigung freier Bindungsstellen für anschließende Versuche wurde die Membran über Nacht bei RT mit „Blocking“-Lösung (Roche) geblockt.

2.9 Nachweis von Proteinmodifikationen

2.9.1.1 Glykosylierung

Die Glykosylierung sollte durch die Verwendung von Concanavalin A (ConA) detektiert werden. ConA hat eine relativ geringe Spezifität und bindet eine Reihe von Zuckerstrukturen. Hier wurde, angelehnt an eine Vorschrift von Sweet und Pelham (1992), verfahren. Abweichend von der oben beschriebenen Methode zur Herstellung von Zell-Rohextrakten (2.8.2) erfolgte der

Zellaufschluß mit ConA-Präzipitations-Puffer (1,6 % TritonX-100, 0,1 % SDS, 0,5 M NaCl, 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,6) und Glasperlen. Nach Zellaufschluß wurde die Probe geteilt und in zwei Parallelansätzen weiter bearbeitet (Abb. 6). 150 µg Protein wurden 1:18 in ConA-Sepharose (Pharmacia) und ConA-Präzipitations-Puffer verdünnt und für vier Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die ungebundene Fraktion durch zwei Vol. Aceton gefällt und in 2xLaemmli-Puffer (siehe 2.8.7) aufgenommen. Die Sepharose-Matrix wurde in ConA-Präzipitations-Puffer resuspendiert und mit bzw. ohne 10 % Methyl α D-Mannopyranosid (Sigma) für 45 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit zwei Vol. Aceton versetzt und die Proteine wurden gefällt. Das Präzipitat wurde viermal mit 250 µl ConA-Bindepuffer (0,05 % SDS, 20 mM TrisHCl pH 7,4, 0,5 M NaCl) gewaschen und anschließend in 2x Laemmli aufgenommen. Es wurden jeweils 30 µg Protein über ein SDS-Gel aufgetrennt und wie oben beschrieben (siehe 2.8.10) detektiert. Die 30 µg entsprachen 10 µl P1, 60 µl Ü1, 60 µl Ü2, 10 µl P3 und 60 µl Ü3 (vergleiche Abb. 6).

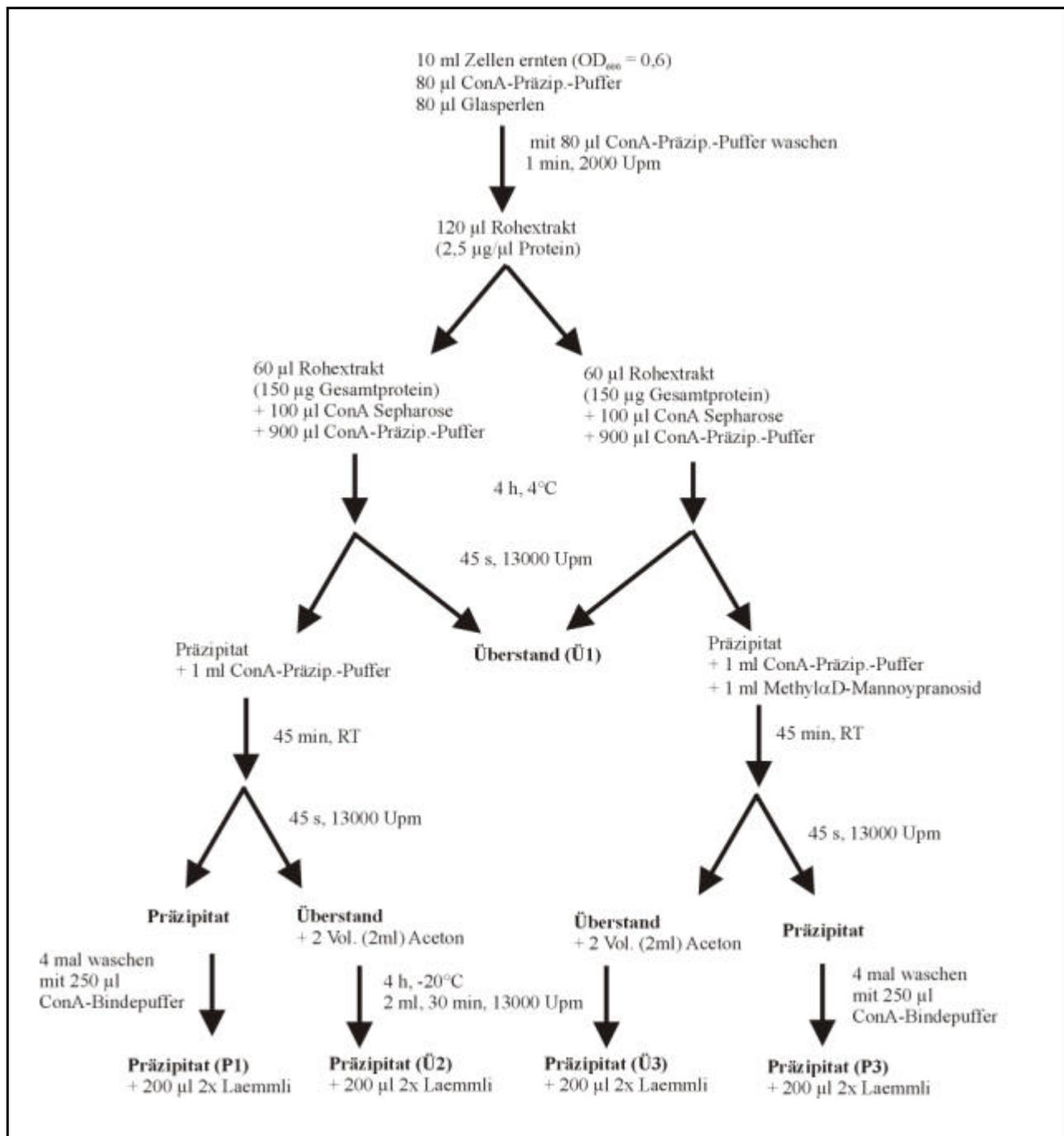


Abb. 6: Flußschema zur Bindung von Glykoproteinen an Concanavalin A
Die Versuchsdurchführung erfolgte auf Eis in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (1 µg/ml Antipain, Pepstatin und Leupeptin).

2.9.1.2 N-Glykosylierung

Zum Nachweis der Art der Glykosylierung wurde eine PNGaseF (Peptid:N-glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum*, Roche) Behandlung der Rohextrakte durchgeführt. PNGase F ist eine Amidase, die zwischen dem Asparagin und dem ersten GlcNAc (N-Acetylglukosamin) der Glykosylketten in N-glykosylierten Proteinen spaltet. Rohextrakte (50 µg Protein) wurden mit 1/10 Volumen Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Reaktionspuffer (0,5 M Na-Citrat pH 7,5), 1/10 Volumen 10%igem Detergenz NP-40 (hebt aus unbekanntem Gründen die Hemmung der PNGase durch SDS auf) und 1 µl PNGase F (10 U) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 3x Laemmli versetzt und es folgte ein immunologischer Nachweis der Proteine (siehe 2.8.10).

2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten und dann entweder bei -20°C gelagert oder mit dem JET-SORB-Kit (Fa. Genomed) aus dem Gel isoliert. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.11 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

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

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte in Anlehnung an die Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989). Für präparative Zwecke wurde die Plasmid-DNA über Säulen der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Hierbei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in entsprechenden H₂O-Mengen aufgenommen, um eine Endkonzentration von 1 µg/µl zu erhalten.

2.11.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden 20 ml Hefekultur (OD₆₀₀=0,8 – 1,0) durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm) geerntet und die RNA nach der Methode von Schmitt *et al.* (1990) isoliert. Nach Bedarf erfolgte die Aufreinigung von PolyA-RNA im Anschluß daran mit Hilfe von oligo-dT-Säulen nach Vorschrift des „Oligotex-mRNA“-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Bei Verwendung der RNA für die RT-PCR wurde die isolierte mRNA noch mit DNaseI behandelt. Der DNA-Abbau erfolgte wie vom Hersteller (GibcoBRL) angegeben.

2.12 Blotting-Methoden

2.12.1 Southern Blot

Mit Hilfe der von Southern (1975) eingeführten Methode kann die DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran transferiert werden. Anschließend ist die Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente durch die Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden möglich. Es wurde jeweils 1 µg DNA (wenn nicht anders beschrieben) über Nacht mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten, danach gefällt, rückgelöst und in einem Agarosegel aufgetrennt. Der DNA-Transfer erfolgte mit Hilfe einer Vakuumblokkammer (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia) nach dem Protokoll des Herstellers. Die im Gel aufgetrennte DNA wurde hierfür nach Anlegen eines stabilen Vakuums zuerst 3 min denaturiert, dann 3 min neutralisiert und schließlich wurde die DNA mit Transferpuffer auf die Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Nach

dreiminütiger UV-Fixierung (312 nm) erfolgte die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde bei 68°C im Wasserbad. Die Detektion wurde mit Hilfe von polyklonalen Schaf-anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten von Boehringer (Mannheim) nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt. Für den Nachweis spezifischer Hybride wurde hierbei die kolorimetrisch Variante gewählt, bei der es durch die Zugabe von NBT (0,388 mg/ml) und X-Phosphat (0,175 mg/ml) zur Blaufärbung kommt.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 3 M Na-Acetat, pH 5,5

Transferpuffer: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0

2.13 Immunochemische Detektion spezifischer Proteine

Der Nachweis exprimierter Proteine erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Assays der Fa. Boehringer Mannheim (No. 1500708). Es wurden die auf eine Immobilon-P-Membran (PVDF-Membran von Millipore, Eschborn) fixierten Proteine mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Der resultierende Immunkomplex konnte mit Peroxidase gekoppeltem Antikörper detektiert werden.

Die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen wurden nach kurzem Anfeuchten in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1 % „Blocking“-Lösung (Roche) geblockt. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h unter leichtem Schütteln mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurden die Filter zweimal mit TBST-Puffer [0,1 % (w/w) Tween 20 in TBS] und zweimal mit 0,5 % „Blocking“-Lösung bei RT jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation (1 h) mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper in 1 % „Blocking“-Lösung.

Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 4-mal mit TBST-Puffer für 15 min gewaschen. Nach kurzem Waschen in PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM, KH₂PO₄, pH 7,4) erfolgte die Detektion durch die Verwendung des Chemilumineszenzsubstrates „Super-SignalULTRA“ (Pierce) entsprechend der Anweisung des Herstellers.

2.14 Pulse-Chase-Experimente

Für Pulse-Chase-Experimente wurden Hefezellen in Na-Laktat-Medium über Nacht vorgezogen und aus dieser Vorkultur wiederum über Nacht eine 40 ml Kultur in Na-Laktat-Medium angeimpft. Es wurden 20 OD₆₀₀-Einheiten logarithmisch wachsender Zellen abzentrifugiert und in 2,5 ml frischem Na-Laktat-Medium aufgenommen. Nach 20 min Vorinkubation bei 30°C wurde die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine durch Zugabe von 100 µCi [³⁵S]-Methionin („Pulse“) begonnen (TRAN³⁵S-LABEL™, ICN). Nach den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten wurde 1/50 Volumen konzentrierter „Chase-Lösung“ (0,3 % Cystein; 0,4 % Methionin) zugegeben („chase“). Nach den angegebenen Zeiten wurden Aliquots zu je 500 µl abgenommen, 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und in 1 ml kalter 10 mM NaN₃-Lösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 110 µl Lysis-Puffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM NaN₃; pH 7,5) aufgenommen und in ein 2 ml „Safe-Lock-Eppendorf-Reaktionsgefäß“ mit 250 mg Glasperlen (0,25-0,50 mm Glasperlen, ROTH) überführt. Der Aufschluß erfolgte durch siebenminütiges Schütteln auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel). Nach Zugabe von 100 µl 2x Laemmli-Puffer (siehe 2.8.9) wurden die Zellextrakte 10 min bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verarbeitung (2.15) auf Eis gesammelt.

2.15 Immunopräzipitation

Der Zellaufschluß erfolgt zunächst wie in 2.14 beschrieben. Zu 210 µl denaturierter Probe wurden 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25 % Triton X-100; 6 mM EDTA, 60 mM Tris/HCl; pH 7,6) gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurde unlösliches Zellmaterial abgetrennt und der Überstand in 1,5 ml „Safe-Lock“ Eppendorf-Reaktionsgefäße

überführt. Nach Inkubation mit 5 µl c-myc-Antikörper (Babco, 9E10) bei 4°C, über Nacht und leichtem Invertieren wurden die Proben mit 50 µl 20 %iger ProteinA-Sepharose-Lösung (20 % ProteinA-Sepharose in IP-Puffer, siehe unten) versetzt und weitere 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit IP-Puffer (1 % Triton X-100; 0,2 % SDS, 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Sepharose-Pellet wurde mit 50 µl IP-Puffer, 50 µl 2x Laemmli-Puffer (siehe 2.8.9) und 100 mM DTT versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Die jeweils im Methodenteil angegebenen Mengen des immunpräzipitierten Materials wurde auf ein 11,5 % SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.8.9). Das Gel von Pulse-Chase-Experimenten wurde anschließend 30 min in Fixierer (20 % Methanol; 7 % Essigsäure) gegeben, nach weiteren 30 min in Amplify (Amplify Fluorographic Reagent, Amersham) wurde das Gel für 2 h bei 80°C getrocknet. Die Proteine wurden durch Autoradiographie mit einem Röntgenfilm nachgewiesen. Gele ohne vorheriges Pulse-Chase-Experiment wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und diese mit 2 % „Blocking“ in PBST (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM N_2HPO_4 , 1,8 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4, 0,05 % Tween20) 2 h geblockt und einmal mit PBST gewaschen. Die Antikörperkopplung erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten c-myc-Antikörper (Boehringer Mannheim) in PBST für 1 h. Nach viermaligem Waschen mit PBST wurde einmal mit PBS gewaschen (PBST ohne Tween20) und die Detektion erfolgte mit dem Chemilumineszenzsubstrate „Super-SignalULTRA“ (Pierce) entsprechend der Anweisung des Herstellers.

2.15.1 Koimmunopräzipitation (adaptiert nach Shulewitz *et al.*, 1999)

Analog zu 2.8.2 wurden aus zwei Stämmen, die die entsprechenden Proteine überexprimieren, Rohextrakte gewonnen. Die Herstellung der Rohextrakte erfolgte allerdings mit einem abgewandelten RE-CO-Puffer (20 mM TrisHCl, pH 7,2; 12,5 mM KAc; 10 mM $MgCl_2$; 5 mM Na-Bisulfit; 0,5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 1 % Tween20). Durch Zugabe von 40 µl Protein-A-Sepharose zu 200 µl Rohextrakt (je 100 µl der zwei unterschiedlichen Rohextrakte mit einer Proteinkonzentration von ca. 2 µg/µl) und anschließender Inkubation bei 4°C unter Bewegung für eine Stunde wurden unspezifisch an Protein-A bindende Bestandteile des Rohextraktes durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand zu 40 µl neuer Protein-A-Sepharose gegeben. Nach einer Stunde wurden 5 µl Antikörper (9E10, Babco) zugegeben und weitere drei Stunden unter Bewegung bei 4°C inkubiert, anschließend dreimal mit RE-CO-Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl SDS-Auftragspuffer mit 5 µl 1M DTT für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Durch Detektion mit dem Antikörper gegen das zweite Protein kann nach einem SDS-PAGE und einer Western-Blot-Analyse eine Bindung des zweiten Proteins and das erste Protein nachgewiesen werden.

2.16 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm „Adobe Photoshop 5.0“ nachbearbeitet.

2.16.1 Immunfluoreszenz

Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden durch Zugabe von Formaldehyd (5 % Endkonzentration) zum Kulturmedium für vier Stunden fixiert. Die Sphäroplastierung der Zellen erfolgte, nach einmaligem Waschen mit Sorbitol-Puffer, durch Zymolyase (100T 10 mg/ml), 30 µl β -Glucoronidase (Boehringer, Mannheim) und 10 µl 1 M DTT bei 37°C für 60 min (Pringle *et al.*, 1989). Die Zellen wurden auf einem mit Polylysin (0,1 % in H_2O) vorbehandelten „acht Loch“-Objektträger fixiert. Zum Nachweis des c-myc-Epitop markierten Sec20p wurde der anti-c-myc Antikörper 9E10 (BAbCO) verwendet. Zur Färbung der DNA wurde der DNA-bindende Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) eingesetzt (Sigma Chemicals, St. Louis).

2.17 Elektronenmikroskopie

Die Membranstrukturen innerhalb der Zellen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Die Zellen wurden in selektivem Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend durch Zentrifugation (5 min, 3500 Upm) geerntet und fixiert. Die Fixierung erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden, wie unten beschrieben.

2.17.1 Zellfixierung durch Glutaraldehyd

C. albicans Zellen wurden während ihrer logarithmischen Wachstumsphase geerntet und mit 2,5 % Glutaraldehyd in 200 mM Cacodylatpuffer (pH 7,2) für 2 h bei 4°C vorfixiert. Nach dem Waschen mit Cacodylatpuffer wurden die Zellen mit 1,5 % Osmiumtetroxid in 100 mM Cacodylatpuffer noch einmal für eine Stunde bei RT fixiert. Es folgte ein stufenweises Entwässern der Zellen in Ethanol (15 %ig, 30 %ig, 50 %ig, 70 %ig in 200 mM Cacodylatpuffer), wobei je 30 min pro Stufe gewaschen wurde. Nach mindestens 8 Stunden in 70 % Ethanol bei 4°C wurden die Zellen in 100 %igem Ethanol vollständig dehydriert. Nach einer Reihe von Waschungen mit 1,2-Epoxypropylenoxid (30 %ig, 50 %ig, 70 %ig und 100 %ig in Ethanol) wurden die Zellen dann in Harz (Epon 812) eingebettet. Die Harzeinbettung wurde wie bei Luft *et al.* (1961) angegeben durchgeführt. Anschließend wurden Schnitte von den Präparaten angefertigt, die mit 2 %igem wässrigem Uranylacetat und Reynold's Eisencitrat angefärbt wurden. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Philips Model 301 eingesetzt. Die Präparation der Zellen wurde unter Anleitung von Dr. U. J. Santore (Universität, Düsseldorf) durchgeführt.

2.17.2 Zellfixierung durch Kaliumpermanganat

Für eine Fixierung mit Kaliumpermanganat wurden die *C. albicans* Zellen während ihrer logarithmischen Wachstumsphase für 10 min bei RT mit Glutaraldehyd (0,6 %) versetzt und anschließend geerntet und mit dH₂O gewaschen. Durch Rücklösen in Kaliumpermanganat (4 %ig in dH₂O) und wenigstens 4 Stunden Schütteln bei 4°C wurden die Zellen vollständig fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit dH₂O gewaschen und in Uranylacetat (2 %ig in dH₂O) über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde dem in 2.17.1 beschriebenen Protokoll der Entwässerung und Einbettung gefolgt.

3 Ergebnisse

Für die Pathogenität von *C. albicans* werden hauptsächlich drei Virulenzfaktoren verantwortlich gemacht, die sich gegenseitig beeinflussen. Hierzu zählen der Dimorphismus, die Adhäsion an Wirtszellen und die Sekretion von Enzymen, im besonderen die Sekretion von extrazellulären Hydrolasen. Proteine des Sekretionsweges sind neben der Ausschleusung von Enzymen auch am Dimorphismus beteiligt (Nieto *et al.*, 1993).

Der Sekretionsweg bei einem Eukaryoten wurde sehr genau an der apathogenen Hefe *S. cerevisiae* untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Mechanismen des vesikulären Transports in Hefen und höheren Eukaryoten ähnlich sind. Bei diesen Untersuchungen wurde auch das essentielle ER-Membranprotein Sec20p gefunden. Dieses Transmembranprotein ist einzigartig unter den Komponenten der Sekretion bei Hefen und es konnte kein Struktur-Homolog in Säugern gefunden werden (Sweet und Pelham, 1992).

Trotz seiner Bedeutung für die Virulenz ist dem sekretorischen Weg von Proteinen bei *C. albicans* bisher kaum Beachtung geschenkt worden. Von *C. albicans* sind erst drei *SEC*-Gene kloniert und näher charakterisiert worden. Bei diesen Genen handelt es sich um Homologe zu essentiellen *S. cerevisiae*-Genen *SEC14*, *SEC18*, *SEC4* und neuerdings auch *YPT1* (Monteolivia *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 1993; Clement *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Ein homologes Protein in *C. albicans* zu dem essentiellen, pilzspezifischen *ScSEC20*-Gen war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisiert worden (Swoboda *et al.*, 1993). Seine Pilzspezifität macht das Sec20-Protein von *C. albicans* zu einem potentiellen Zielprotein zukünftiger Antimykotika. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das *SEC20*-Gen aus *C. albicans* isoliert und charakterisiert.

3.1 Isolierung und Sequenzierung von *CaSEC20*

3.1.1 Screening der Fosmide

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß eine Reihe von cDNA-Klonen des *C. albicans* Stammes 3153, die *C. albicans* Proteine kodieren, mit menschlichem Serum reagieren (Swoboda *et al.*, 1993). Einer dieser Klone, Klon 1-8-1, zeigte Homologie zu dem *S. cerevisiae*-Gen *SEC20* und wurde zum Screening einer Fosmid-Bibliothek des *C. albicans*-Stammes 1161 (Chibana *et al.*, 1998) eingesetzt. Es konnten drei mögliche Kandidaten aus der Fosmid-Bibliothek ermittelt werden, die *CaSEC20* enthalten (R. Swoboda, persönliche Mitteilung).

Für die vorliegende Arbeit standen der 1018-bp cDNA-Klon (1-8-1) sowie die drei Fosmide (14H1, 7B11 und 17B7) der Fosmid-Bibliothek zur Verfügung.

Zur Isolierung des vollständigen *CaSEC20* Genes wurden Restriktionsschnitte der Fosmide 14H1, 7B11 und 17B7 mit *Bam*HI, *Hind*III und *Xba*I durchgeführt und anschließend Southern-Blots angefertigt. Diese drei Restriktionsenzyme wurden gewählt, da sie den Klon 1-8-1 nicht schneiden und somit mit einer vollständigen Isolierung von *CaSEC20* gerechnet werden konnte. Als *CaSEC20*-Sonde diente ein 660 bp großes *Xho*I/*Eco*RI-Fragment aus dem Klon 1-8-1. Wie in Abb. 7 gezeigt, konnten ein 8,2 kb *Bam*HI-, ein 4,2 kb *Hind*III- und ein 4,3 kb *Xba*I-Fragment von Fosmid 7B11 detektiert werden. Bei der Restriktionsanalyse von Fosmid 14H1 mit *Hind*III ergab sich ein anderes Bandenmuster, wie in Spur 5 zu sehen ist (Abb. 7). Es schien eine zusätzliche Schnittstelle vorhanden zu sein, wodurch sich ein kleineres Fragment (4,1 kb) zeigte. Allerdings sind auch die aus Fosmid 7B11 bekannten 4,3 kb *Xba*I-Bande sowie eine 8,2 kb *Bam*HI-Bande zu sehen. Die zusätzliche *Hind*III-Schnittstelle in Fosmid 14H1 wurde später durch Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich um eine Punktmutation in diesem Fosmid. Das dritte Fosmid zeigte kein Signal mit der eingesetzten *SEC20* Sonde und wurde daher nicht weiter untersucht.

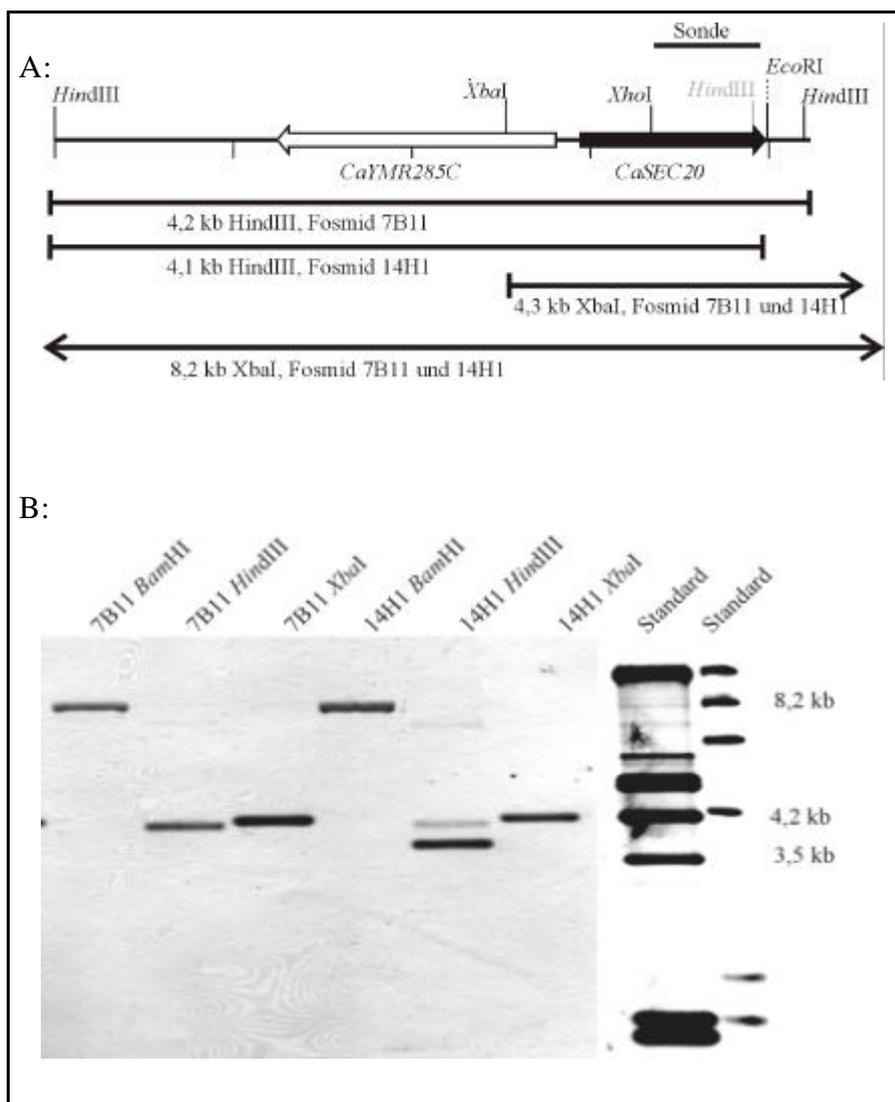


Abb. 7: Southern-Blot Analyse der Fosmide 7B11 und 14H1. A: Übersichtsschema zur Restriktionsanalyse der Fosmide. Ein 4,2 kb-Fragment mit den für die Analyse verwendeten Schnittstellen ist abgebildet. Außerhalb dieses Bereiches liegende Schnittstellen sind nicht eingetragen. Die zusätzlich im Fosmid 14H1 vorhandene *Hind*III-Schnittstelle ist in grauer Schrift gezeigt. B: 50 ng DNA der Fosmide 14H1 und 7B11 wurden entweder mit *Bam*HI, *Hind*III oder *Xba*I geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt. Für den Southern-Blot wurde ein 660 bp großes Fragment des cDNA-Klones 1-8-1 als Sonde eingesetzt. Als Standard diente mit *Eco*RI/*Hind*III bzw. mit *Hind*III geschnittene λ -DNA.

Das *HindIII*- sowie das *XbaI*-Fragment von Fosmid 7B11 wurde aus dem Agarosegel isoliert und in die Vektoren pRC18 bzw. pUC18 kloniert. Die später isolierten Plasmide wurden als pYW2/8 bzw. pYWC3 bezeichnet. Auch das kleinere *HindIII*-Fragment aus Fosmid 14H1 wurde isoliert und in pUC18 inseriert; das erhaltene Plasmid wurde als pYW1411 bezeichnet (siehe Tabelle 9).

3.1.2 Subklonierung von *CaSEC20* und Sequenzierung

Um *CaSEC20* vollständig sequenzieren zu können, wurden aus den oben beschriebenen Vektoren verschiedene Subklone hergestellt. Die in Abb. 8 angegebenen Klone wurden beidseitig ansequenziert. So konnte das *CaSEC20*-Gen vollständig doppelsträngig sequenziert werden.

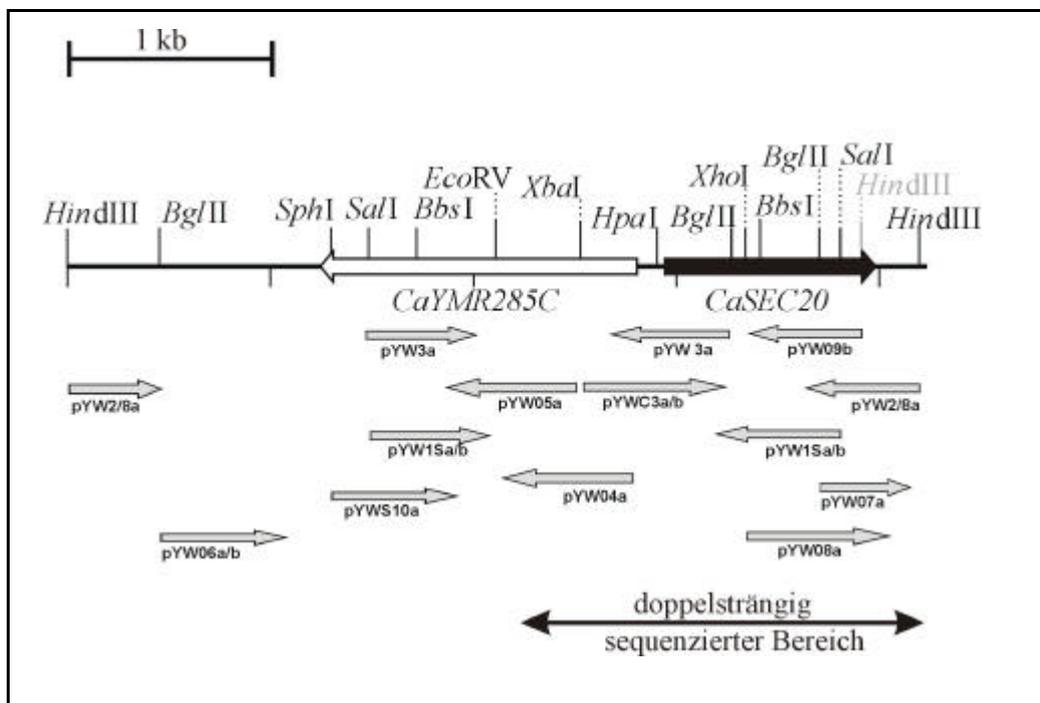


Abb. 8: Subklone von *CaSEC20*. Es ist ein 4,2 kb-DNA-Fragment mit dem *CaSEC20*-Gen sowie dem vom Gegenstrang kodierten *CaYMR285C*-Gen dargestellt. Die durch Restriktionsanalyse erhaltenen DNA-Fragmente wurden jeweils in pUC18, pUC19, pUC21 oder pRC18 kloniert und mit dem „U-40“ und dem „reverse“-Primer sequenziert (siehe 2.3.4). Dadurch wurden *CaSEC20* sowie 260 bp am 3'-Ende und 555 bp am 5'-Ende vollständig doppelsträngig sequenziert. Die mit a bezeichneten Sequenzen sind vom Fosmid 7B11 abgeleitet, wohingegen die mit b bezeichneten Sequenzen von Fosmid 14H1 abgeleitet wurden. Die in grau eingezeichnete *HindIII*-Schnittstelle ist nur in Fosmid 14H1 zu finden. Die Klonierung der einzelnen Plasmide ist in der Tabelle 9 beschrieben.

Das sequenzierte 1,8-kb Fosmid-Fragment und die davon abgeleitete Proteinsequenz von *C. albicans SEC20* sind in Abb. 9 dargestellt. Die Sequenz ist unter DDBJ/EMBL/GenBank „nucleotide sequence accession No.“ AJ272499 in der EMBL Datenbank zu finden.

ATATTTTCCCATTGTAGGGTATATTTCTC
-520 -500 -480 -460
TTCGGATCAATGTCTGTGCTAAGATATTGTAGCTCATGATCTTGATGGACGGAAGCCCAGGTTTGGGTTTGCAGA
-440 -420 -400 -380
CTTCTAGCATTGGTCGTTTTCAAAAACTTTTCTTTTTNTGGAGGAGGTATCAAACCTAATGCTTCCTTCTGTGGAC
-360 -340 -320
GTATCTTTTCCTTACGTAGTTCCCTGAGACGTCTTTGTTCAAGGATATACTCCTCTGTAAGTAATTTGGGTCCA
-300 -280 -260 -240
TGGGTTTTTTTTGTTACCGGTTTTCGAAGTATTAGCTATATCACCAGCCCCATTAGACAAATTACTTTTTATTGTTTC
-220 -200 -180 -160
TTTCATTACTTGTGCGCAGCATTCTAATGTTGTCTAGAGATATGAATAGAAAAGTTCAAAAAGAAAAAAGAAAGT
-140 -120 -100 -80
AAAAAATAACATGTCAAGGGTTTTTAAATTTGGCAGTACTCACCAGTTGATCTGACTAGAGACACCGAACAAA
-60 -40 -20
GTATCCGAAAAAAAATGTAGGTGTTCCACCAAGTGTAAACACATACTACTTTTTCCATTCTCTACAGCTTCTAAA
1 20 40 60
ATGTCAACAGTATATTATAAAAAACTAGATAAATTACAATTCAGATTTACGATTTGTTTCAGCTCTTTGCTTCAA
M S T V Y Y K K L D K L Q F Q I Y D L F S S L L Q
80 100 120 140
TTATCCGAAGCTGAAGATGAATCTGTCTACAAGGCCAGCTTTGATGACACCGTGCAAGAAATTGATCTGTTATTG
L S E A E D E S V Y K A S F D D T V Q E I D S L L
160 180 200 220
ATTGCTTTCAAAGACCTCCTTAGACTTTTACGACCCAAAGATAAATCCAACAAATTCGATACATACGAATTGAAA
I A F K D L L R L L R P K D K S N K F D T Y E L K
240 260 280 300
TTTCATTCTTTGAAGCACAAATTGCGTGAGTTGCAAGTATTTATTAATGATCAACAACAAGACAAGTTGCATGAA
F H S L K H K L R E L Q V F I N D Q Q Q D K L H E
320 340 360
TATAGGATAAAGCATTTCATCTACAAGATCTGCTGCTGTGGATAACCATCAATAACGAATTTGCTCGAGACCAATTA
Y R I K H F H L Q D S P V D T I N N E F A R D Q L
380 400 420 440
TTTGCTGATCGTTCCACTAAGAAGACTAAGAAAGAAATGGAAGCATCTATAAATCAACAAATTGTCAGCCAAAAT
F A D R S T K K T K K E M E A S I N Q Q I V S Q N
460 480 500
AAACAAATAACAAAATCCTTGCAAGCATCGAGACAATTTGTTATCAGCAGGTATATTGCAGAGTGAATTGAACATT
K Q I T K S L Q A S R Q L L S A G I L Q S E L N I
540 560 580
GACAACATTGATCAGCAAACCAAGGATTTATACAAGTTAAATGAAGGATTTATCCAATTCACGATTTGTTAAAT
D N I D Q Q T K D L Y K L N E G F I Q F N D L L N
600 620 640 660
AGATCTAAGAAAATTGTCAAGTTTATTGAAAAGCAAGATAAAGCTGACCGTCAACGTATATATTTGAGTATGGGG
R S K K I V K F I E K Q D K A D R Q R I Y L S M G
680 700 720 740
TTCTTCATACTTTGTTGTTCTTGGGTGGTTTTATAGAAGAATTTTAAAGGCGACCACTTAAAATATTCTTGTGGTCC
F F I L C C S W V V Y R R I L R R P L K I F L W S
760 780 800 820
TTTTTCAAGATCTTTAATATTTTCAACTGGTTGCTTGGAGGTGGTAGAAGTAAAGGGTTATCTGCAAGTGATATG
F F K I F N I F N W L L G G R S K G L S A S D M
840 860 880 900
ATAGTTTCATCTGTGATTGCTGCTACCACGAAATCGTCGACTATGAGGCAACGAAAACCTTTGTTGGATACCTTG
I V S S V I A A T T E I V D Y E A T K T L L D T L
920 940 960
TCGAACGCTGTGGACTCTAATACAGCGATTGATACACTTGCAATGGTAGTGAATCTCTTACGACATCATCAATG
S N A V D S N T A I D T L A M V V E S L T T S S M
980 1000 1020 1040
GAACATATTGTAGATGAACTATAGGTTTTATAAACAAAGTAATAAGAATTCGATACGTGTTTTTTTTATACATC
E H I V D E L *
1060 1080 1100 1120
CTATGGAGTTTCTACTTTGACATTAGATCCGTTGTTTTTTGAAGATTCTAATGCAGCAGCCACAATTGCTAAATG
1140 1160 1180 1200
ATGGAATGCTTTTCTCGGTGGTACTTTGACCAACTTTTTGTCCTTGTGGCAATTGCATCTTTGAAATCTTGAA
1220 1240 1260
TTCTTCTTCTATGGTGTGACTTCATCTATTTCAATAGTAGTTTTTATAGAAGCTT

Abb. 9: Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz von *CaSEC20*. Zusätzlich zu der kodierenden Region sind 138 Nukleotide des Promotors und 260 Nukleotide der 3'-untranslatierten Region abgebildet. Die fettgedruckten Nukleotide kodieren für das *C. albicans* Homolog zu *ScYMR285* bzw. *ScYML118W*, ein Protein, welches vom Gegenstrang kodiert wird. Grau unterlegt sind die TATA Sequenzen im 5'-untranslatierten Bereich, kursiv und unterstrichen geschrieben sind die möglichen Terminationssequenzen TTTTATA im 3'-untranslatierten Bereich. Im Promotorbereich sind die Transkriptionsstartpunkte für Starts in beide Richtungen angegeben (<http://www-hgc.lbl.gov/cgi-bin/promoter.pl>). Schwarz für *ScYMR285*, weiß auf schwarz für *CaSEC20*. Schwarz unterlegt sind die *Candida* spezifischen Kodons.

Der offene Leserahmen von 996 Nukleotiden zwischen dem Nukleotid an Position 556 und 1551 kodiert 332 Aminosäuren, die einem errechneten Molekulargewicht des Proteins von 36,5 kDa entsprechen. An den Aminosäuren an Position 47 und 111 (in Abb. 9 weiß auf schwarz dargestellt) befinden sich CUG-Kodons, die in *C. albicans* nicht für Leucin, sondern für Serin kodieren (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995; White *et al.*, 1995).

Der 5'-untranslatierte Bereich von *SEC20* enthält 3 mögliche TATA-Box-Sequenzen an Position -531 bis -527, -325 bis -321 und -265 bis -261, bezogen auf das ATG des Translationsstarts (in Abb. 9 schwarz auf grau dargestellt). Es wurde noch ein zusätzlicher ORF (in Abb. 9 fett dargestellt) in der hier angegebenen Sequenz, gefunden. Dieser beginnt nur 138 bp stromaufwärts der translatierten Region von *SEC20* und ist von dem complementären Strang kodiert. Das wahrscheinliche Produkt dieses ORFs umfaßt 519 Aminosäuren mit 39 % bzw. 34 % Identität zu den *S. cerevisiae* Genen *YMR285* bzw. *YML118W*, mit bisher unbekannter Funktion. Eine Funktion als DNase/RNase wird vermutet (<http://www.proteome.com/databases/YPD/reports/NGL2.html>). Der 3'-untranslatierte Bereich enthält Sequenzen, die identisch sind zu den aus *S. cerevisiae* bekannten Konsensussequenzen für den effizienten Translationsstop. Mögliche TTTTATA-Terminationssequenzen sind an Position +2, +41 und +144 nach dem *SEC20* Stopkodon lokalisiert (in Abb. 9 kursiv, unterstrichen dargestellt).

3.2 Vergleich von *CaSec20p* mit *ScSec20p*

Bei einem Vergleich der Proteinsequenzen von *C. albicans Sec20p* und *S. cerevisiae Sec20p* zeigte sich eine Identität von 27 %. In Abb. 10 ist der Sequenzvergleich auf Proteinebene dargestellt. Im Vergleich zu *ScSec20p* ist das *Candida*-Homologe im N-terminalen Bereich 95 Aminosäuren kürzer. Das *C. albicans Sec20*-Protein ist vermutlich ein Typ II integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne. Dies wurde von dem TMPred Programm vorhergesagt (http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_from.html). Die Transmembranregion befindet sich zwischen Aminosäure 220 und 234 (in Abb. 10 fett dargestellt). Für den zytoplasmatischen Bereich wird eine „coiled coil“ Region vorhergesagt (in Abb. 10 grau hinterlegt dargestellt) sowie eine N-Glykosylierungsstelle (in Abb. 10 kursiv dargestellt). Aufgrund der wahrscheinlich zytoplasmatischen Lokalisation dieser Konsensussequenz ist eine Glykosylierung an diesem Asparagin sehr unwahrscheinlich. Die C-terminale VDEL Sequenz hat eine auffällige Ähnlichkeit zu der HDEL Sequenz in *S. cerevisiae*, welche als ER-Retentionssignal in Hefe bekannt ist (Pelham, 1989).

3.3 Disruption von *CaSEC20*

Um die Funktion von *CaSec20p* in *C. albicans* näher zu charakterisieren, sollten beide Allele des Gens im Stamm CAI4 disruptiert werden. Das Disruptionsschema ist in Abb. 11 dargestellt. Für die Disruption des ersten Allels wurden zwei unterschiedliche Vektoren bzw. Fragmente eingesetzt. Der Grund für die zwei unterschiedlichen Konstrukte ist (wie in 3.1.2 beschrieben) der nur 138 bp vom *CaSEC20*-ATG entfernte Startpunkt für einen auf dem Gegenstrang kodierten weiteren offenen Leserahmen, der als *CaYMR285* bezeichnet wird.

Die Vektoren pYW01 und pYW02 wurden zur Isolation des Disruptionsfragmentes eingesetzt. Aus den Vektoren wurde ein 6,0 kb bzw. 5,7 kb großes *BbsI/HindIII*- Fragment (*sec20-Δ2* bzw. *sec20-Δ10*, in Abb. 11 beschrieben) isoliert und in den Stamm CAI4 transformiert. Die beiden Fragmente unterscheiden sich in ihrem 5'-Bereich. Das Fragment aus Vektor pYW01 enthält die gesamte Promotorregion von *CaSEC20* einschließlich der ersten 330 bp des offenen Leserahmens. Hiermit sollte sichergestellt werden, daß auch nach Integration ins *C. albicans* Genom die Promotorregion des *CaYMR285* intakt ist. In Vektor pYW02 hingegen fehlen der gesamte *CaSEC20* offene Leserahmen sowie 40 bp der Promotorregion. Es besteht also die Möglichkeit, daß nach der Integration ins Genom der Promotor von *CaYMR285* verändert ist und damit auch die Expressionsrate von *CaYMR285* unterschiedlich im Vergleich zum Wildtyp wäre. In beiden Fragmenten folgt dem 5'-Bereich der sogenannte „URA-Blaster“. Die 3'-Region der eingesetzten Fragmente besteht jeweils aus 240 bp des 3'-Endes des ORF von *CaSEC20* mit anschließendem 250 bp-großem 3'-untranslatierten Bereich. Die Verwendung der 1,2 kb (pYW02) bzw. 1,6 kb (pYW01) langen homologen Sequenz am Anfang und der 500 bp langen homologen Sequenz am Ende des Integrationsfragmentes ermöglichte eine homologe Rekombination. Diese wurde in einer Southern Blot-Analyse in acht von zehn der getesteten Transformanten nachgewiesen. Drei Halbdisruptanten mit dem *sec20-Δ2* Fragment aus pYW01 und fünf Halbdisruptanten mit dem *sec20-Δ10* Fragment aus pYW02 wurden erhalten.

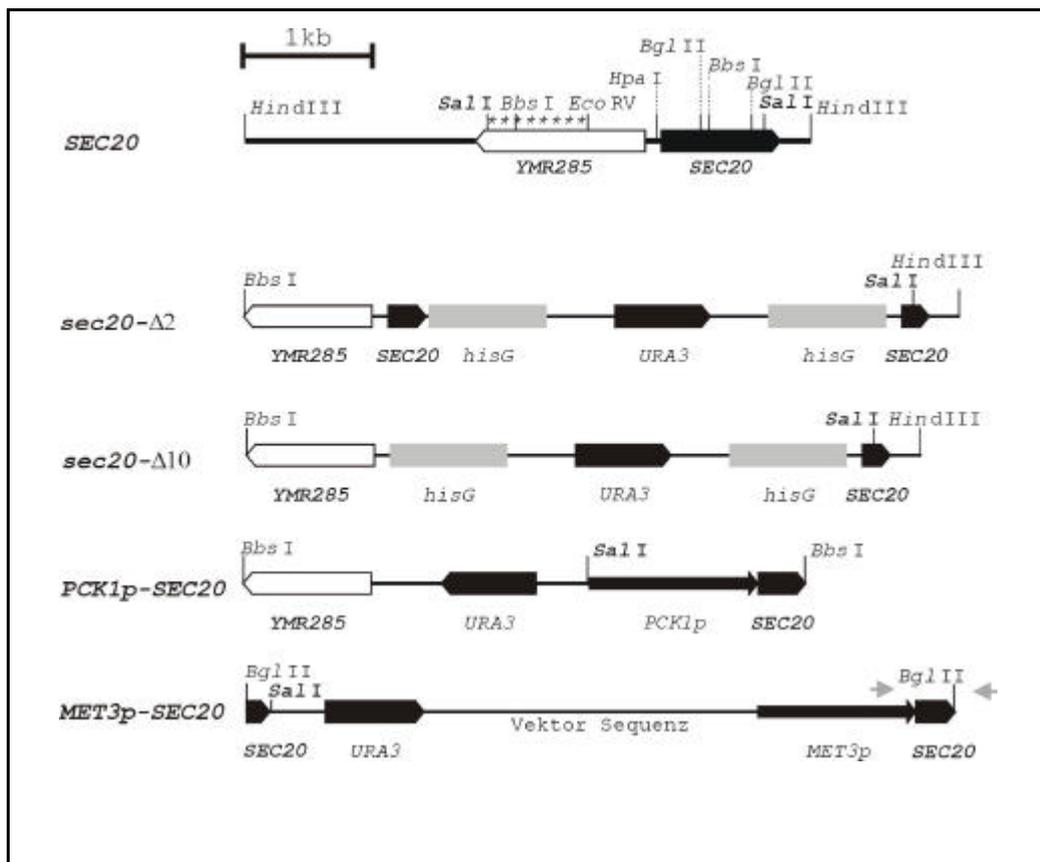


Abb. 11: Disruptionsschema für *CaSEC20*. Angegeben sind die genomischen Strukturen des Wildtyp *SEC20*-Allels und der unterschiedlichen mutierten Allele. Die „URA-Blaster“-Module (*hisG-URA3-hisG*) wurden benutzt, um das erste *SEC20*-Allel zu disruptieren (*sec20-Δ2* und *sec20-Δ10*). Zusätzlich wurde die kodierende *SEC20* Region auch unter die transkriptionale Kontrolle des *PCK1*-Promotors (*PCK1p-SEC20*) oder des *MET3*-Promotors (*MET3p-SEC20*) gestellt. Die in *MET3p-SEC20* angegebenen grauen Pfeile stellen die für die Kolonie-PCR eingesetzten Oligonukleotide dar. Die mit * gekennzeichnete Region im WT gibt die im Southern-Blot verwendete genomische Sonde an.

Repräsentativ für die von pYW01 abgeleitete, Halbdisruptante ist in Abb. 12 (Spur 2) das Ergebnis der Analyse von Stamm CA2 (*SEC20/sec20-Δ2::hisG-URA3-hisG*) dargestellt. Dieser Stamm sowie ein mit CA10 bezeichneter Stamm, der sich von dem Fragment aus pYW02 ableitet, wurden ausgewählt und auf Medium mit 0,02 % FOA ausgestrichen. Auf diesem Medium können nur Stämme ohne *URA3*-Gen wachsen, da FOA auf Stämme mit dem *URA3*-Gen toxisch wirkt (siehe 2.2.4).

Nach der Selektion auf FOA-Medium wurden acht Kolonien, die nicht mehr auf SD-Medium ohne Uridin wachsen konnten, in einem Southern-Blot untersucht. Sieben dieser acht Kolonien enthielten den erwarteten Genotyp *SEC20/sec20Δ::hisG*. Unter diesen sieben Kolonien befanden sich drei Kolonien, die vom CA2-Stamm abgeleitet waren, und vier Kolonien, die vom CA10-Stamm abgeleitet waren, mit herausrekombiniertem *URA3*-Gen. Jeweils einer dieser Stämme, CA2d bzw. CA10a (*SEC20/sec20-Δ2::hisG* bzw. *SEC20/sec20-Δ10::hisG*), wurde für eine weitere Transformation mit den Disruptionsfragmenten verwendet. In Abb. 12 ist exemplarisch die Southern-Blot Analyse für den Stamm CA2d gezeigt (Spur 3). Trotz wiederholter Versuche konnte das zweite *SEC20*-Allel in keinem der beiden Stämmen deletiert

werden. Es wurden 56 Transformanten des CA2d Stammes untersucht und 33 Transformanten des CA10a Stammes, aber in allen Transformanten blieb ein WT *SEC20*-Allel erhalten. Es war also nicht möglich, eine vollständige Disruption von *SEC20* in *C. albicans* vorzunehmen. Dies legt nahe, daß *CaSEC20* ein essentielles Gen in *C. albicans* ist und wie *ScSEC20* in *S. cerevisiae* nicht vollständig disruptiert werden kann.

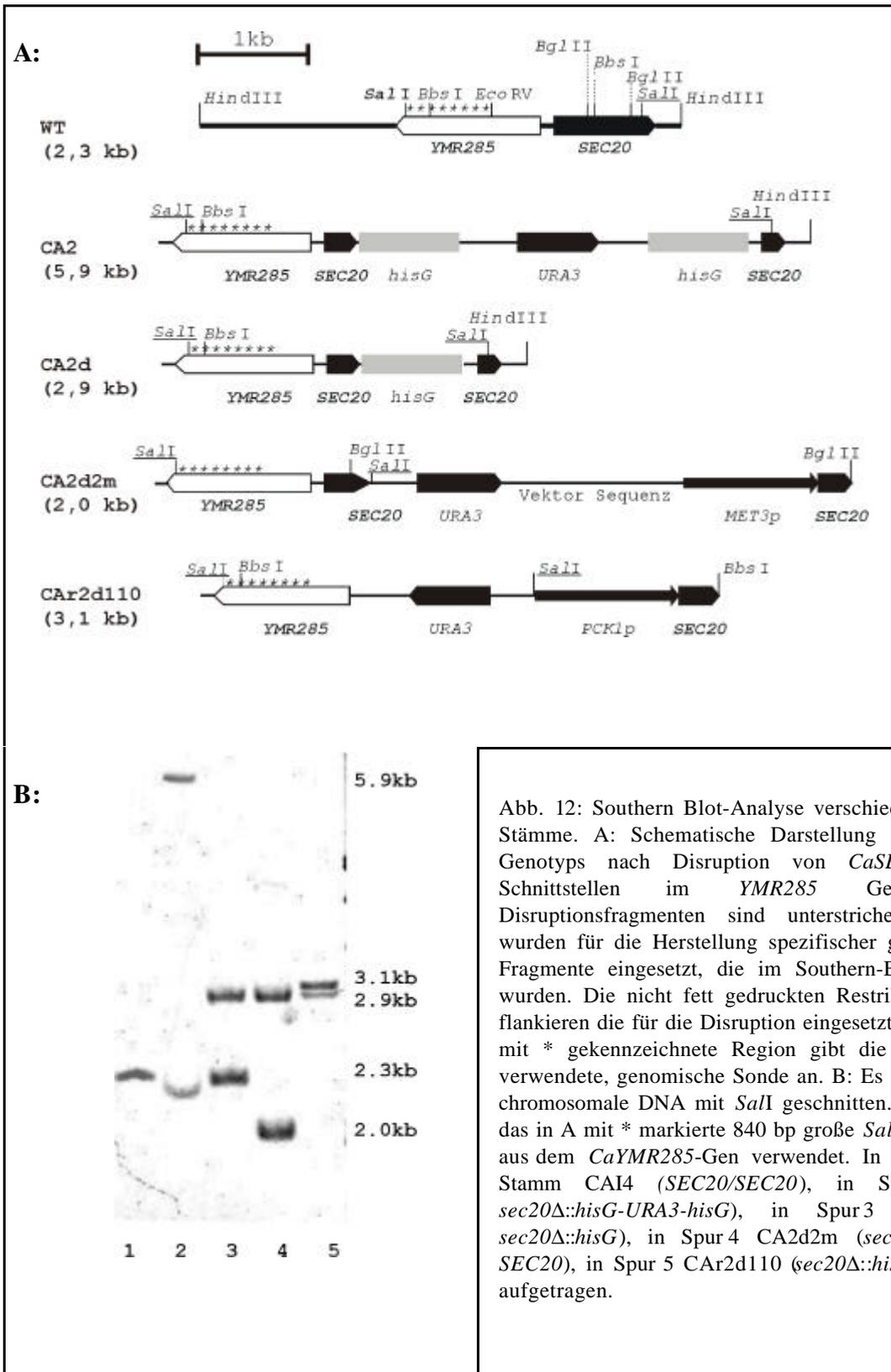
Zur weiteren Charakterisierung von *CaSEC20* sollten konditionale Mutanten hergestellt werden, in denen ein *SEC20*-Allel unter der Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors steht.

3.3.1 Erzeugung einer konditionalen *SEC20*-Mutante mit dem *PCK1*-Promotor

Das Gen *PCK1* beinhaltet die Sequenzinformation für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, die als Schlüsselenzym während der Glukoneogenese aktiviert wird. Dies bedeutet, daß der *PCK1*-Promotor in Anwesenheit von Glukose reprimiert und in Abwesenheit von Glukose induziert ist (Leuker *et al.*, 1997).

Um eine konditionale *SEC20*-Mutante zu erhalten, wurde, ausgehend von den Stämmen CA2d und CA10a, das zweite *SEC20*-Allel unter die Kontrolle des *PCK1*-Promotors gestellt. Hierzu wurde das chromosomale Gen durch eine *PCK1p-SEC20*-Fusion ersetzt. Aus dem Vektor pYW4 wurde ein 4,8 kb großes *BbsI*-Fragment isoliert und in die Stämme CA2d und CA10a transformiert. Das Fragment besteht aus einem homologen Bereich zu *CaYMR285*, dem *CaURA3*-Gen als Selektionsmarker und der *PCK1p-SEC20*-Fusion (Abb. 11). Die Verwendung der 1,2 kb langen homologen Sequenz am Anfang und der 0,4 kb lange homologen Sequenz am Ende des Integrationsfragmentes ermöglichte eine homologe Rekombination. Diese wurde in einer Southern Blot-Analyse in sieben von neun Transformanten nachgewiesen. Repräsentativ für die konditionale *SEC20*-Mutante mit dem *PCK1*-Promotor ist in Abb. 12 (Spur 4) das Ergebnis der Southern-Analyse von dem Stamm CAr2d110 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) dargestellt.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, waren diese Transformanten auch unter reprimierenden Promotorbedingungen noch lebensfähig, daher wurden noch weitere konditionale Mutanten mit dem *CaMET3*-Promotor verwendet (Care *et al.* 1999).



3.3.2 Erzeugung einer konditionalen *SEC20*-Mutante mit dem *MET3*-Promotor

Das Gen *MET3* beinhaltet die Sequenzinformation für die ATP-Sulphonylase, die die Produktion von Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) aus anorganischem Sulfat und ATP katalysiert (Marzluf, 1997; Thomas und Surdin-Kerjan, 1997). Der *MET3*-Promotor ist ein konditionaler Promotor, der in Anwesenheit von Methionin und S-Adensyl Methionin (SAM) (Cherest *et al.*, 1985; Mountain *et al.*, 1991) reprimiert wird.

Um eine konditionale *MET3p-SEC20*-Mutante zu erhalten, wurde, ausgehend von den Stämmen CA2d und CA10a, das zweite *SEC20*-Allel unter die Kontrolle des *MET3*-Promotors gestellt. Hierzu wurde das chromosomale Gen durch eine *MET3p-SEC20*-Fusion ersetzt. Der Vektor pYW20 wurde mit *Bgl*III geschnitten und der gesamte linearisierte Vektor in die Halbdisruptanten transformiert. Das linearisierte DNA-Fragment ist in Abb. 11 (*MET3p-SEC20*) dargestellt. Der 5'-Bereich enthält 250 bp homologe *SEC20*-Sequenz gefolgt vom *CaURA3*-Gen als Selektionsmarker und der Vektorsequenz. Dahinter befindet sich die *MET3p-SEC20* Fusion (330 bp). Die Integration wurde in 12 erhaltenen Transformanten mittels Kolonie-PCR (siehe 2.5.1) getestet. Es wurden die Primerkombinationen #355 und #356 (siehe 2.3.4) verwendet, die ein PCR-Produkt von 694 bp ergaben. Auf diese Weise konnten sechs der 12 Klone als positiv verifiziert werden (Daten nicht gezeigt), von denen vier auch im Southern-Blot die ortsspezifische Integration des pYW20 Vektors aufwiesen. Exemplarisch ist im Southern-Blot in Abb. 12 der Stamm CA2d2m (Spur 5) dargestellt.

3.4 Analyse der konditionalen *SEC20*-Mutanten

3.4.1 Wachstumsanalyse der konditionalen *PCK1p-SEC20* Mutante

Das Wachstum von Zellen ist ein wichtiger Anhaltspunkt für die Vitalität eines Stammes. Durch eine Wachstumsanalyse sollte untersucht werden, ob die Deletion eines Allels von *SEC20* oder die Repression der *SEC20*-Expression einen Wachstumsdefekt verursacht. Hierzu erfolgte die Anzucht der Zellen in verschiedenen Medien, wodurch die Expression des *SEC20*-Gens gezielt variiert werden konnte. Zellen mit *PCK1p-SEC20* (Stamm CA2d110) wurden aus einer Übernachtskultur in S4D-Medium, d.h. Minimalmedium mit 4 % Glukose, und in SCAA Medium, d.h. Minimalmedium mit 2 % Casaminoäuren, auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Halbstündlich wurde die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt. Durch die Wahl der Medien wurde einerseits eine Überexpression von *SEC20* erzeugt (SCAA-Medium) und andererseits durch Anwesenheit von Glukose die *SEC20*-Expression verhindert (S4D-Medium). Es zeigte sich, daß die Repression der *SEC20*-Expression Auswirkung auf die Wachstumsrate der Zellen hat (Abb. 13). Die Generationszeit ist signifikant von 90 min auf 130 min erhöht. Eine Überexpression von *Sec20p* hatte keinen Einfluß auf die Wachstumsrate der Zellen (Abb. 13). Zum Vergleich wurden WT *C. albicans* Zellen sowie *SEC20*-Halbdisruptanten (Stamm CA2) betrachtet. Es zeigte sich, daß die Disruption des ersten Allels von *SEC20* keinen Einfluß auf die Wachstumsrate der Zellen hat (Abb. 13).

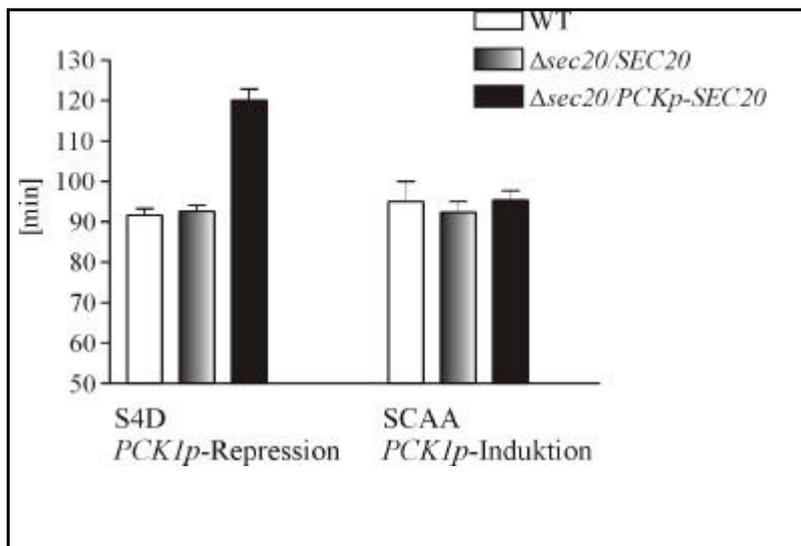


Abb. 13: Generationszeiten von *C. albicans*-Stämmen in verschiedenen Medien. Die Vorkulturen der verschiedenen Stämme wurden in SD-Medium angezogen. Bei den in der Graphik angegebenen Werten handelt es sich um Dreifachbestimmungen. Das Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde gemittelt. Es wurden vier unabhängige Transformanten getestet, wobei bei zwei Transformanten das erste Allel mit *sec20-D* disruptiert wurde und bei den anderen zwei Transformanten das erste Allel mit *sec20-D10* disruptiert wurde (siehe Abb. 11)

Wie oben beschrieben, ist das Wachstum bei reprimierter *SEC20* Expression möglich, aber stark reduziert. Dies bestätigt die, daß *SEC20* ein essentielles Gen ist und daher keine vollständigen Disruptanten hergestellt werden konnten.

3.4.2 Detektion der *SEC20* mRNA unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen

Es sollte nun überprüft werden, ob trotz *PCK1p* Repression noch *Sec20p* Expression stattfindet. Da durch Northern Blot-Analyse die Expression von *SEC20* aufgrund zu geringer Expressionsrate auch im WT nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde die RT-PCR als sensiblere Methode zum Expressionsnachweis verwendet.

Um zu untersuchen, ob das *SEC20* Transkript auch unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingungen in den konditionalen Mutanten vorhanden ist, wurde die RT-PCR verwendet. Hierzu wurden der WT-Stamm sowie der Stamm *CAr2d110 (sec20D::hisG/PCK1p-SEC20)* in *PCK1p*-reprimierendem Medium (S4D) und in *PCK1p*-induzierendem Medium (SCAA) angezogen. Zunächst wurde Gesamt-RNA der Zellen hergestellt. Wie in 2.11.2 beschrieben, wurde die Gesamt-RNA mit DNase I behandelt, bevor sie in die RT-PCR eingesetzt wurde. Die reverse Transkription sowie die folgende PCR erfolgten in einer Ein-Schritt Reaktion wie vom RT-PCR Kit Hersteller (Sigma) beschrieben. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit *CaSEC20* spezifischen Primern sowie *CaEFB1* spezifischen Primern (siehe Tabelle 10). Die cDNA Synthese erfolgte bei 45°C für 45 min und wurde danach durch Inkubation bei 95°C für drei Minuten abgestoppt. Nach anschließender PCR (94°C 45s, 56°C 40s, 72°C 45s) wurde das Produkt auf ein Agarose Gel aufgetragen. Das Kontrollgen *CaEFB1* zeigte hier deutlich, daß die präparierte RNA auch wirklich DNA-frei vorliegt. Das Gen enthält ein Intron, wodurch bei einer Verunreinigung der RNA durch DNA ein größeres PCR Produkt entsteht (vergleiche Spur 2 und 3) als bei der PCR mit reiner RNA (Schaller *et al.*, 1998). Die Ergebnisse sind in der Abb. 14 zu sehen. Keine der mit DNaseI behandelten RNA-Präparationen generiert ein *EFB1* RT-PCR Produkt von 0,7 kb, welches charakteristisch für das ungespleißte

Gen wäre. Alle zeigen das 0,5 kb Produkt, welches auf die gespleißte mRNA deutet. Es konnte also gezeigt werden, daß die RNA Präparation frei von DNA ist. Das 0,4 kb *SEC20* RT-PCR Produkt konnte in allen RNA Präparationen detektiert werden auch in RNA aus dem *PCK1p-SEC20* Stamm, der unter reprimierenden Bedingungen gewachsen war.

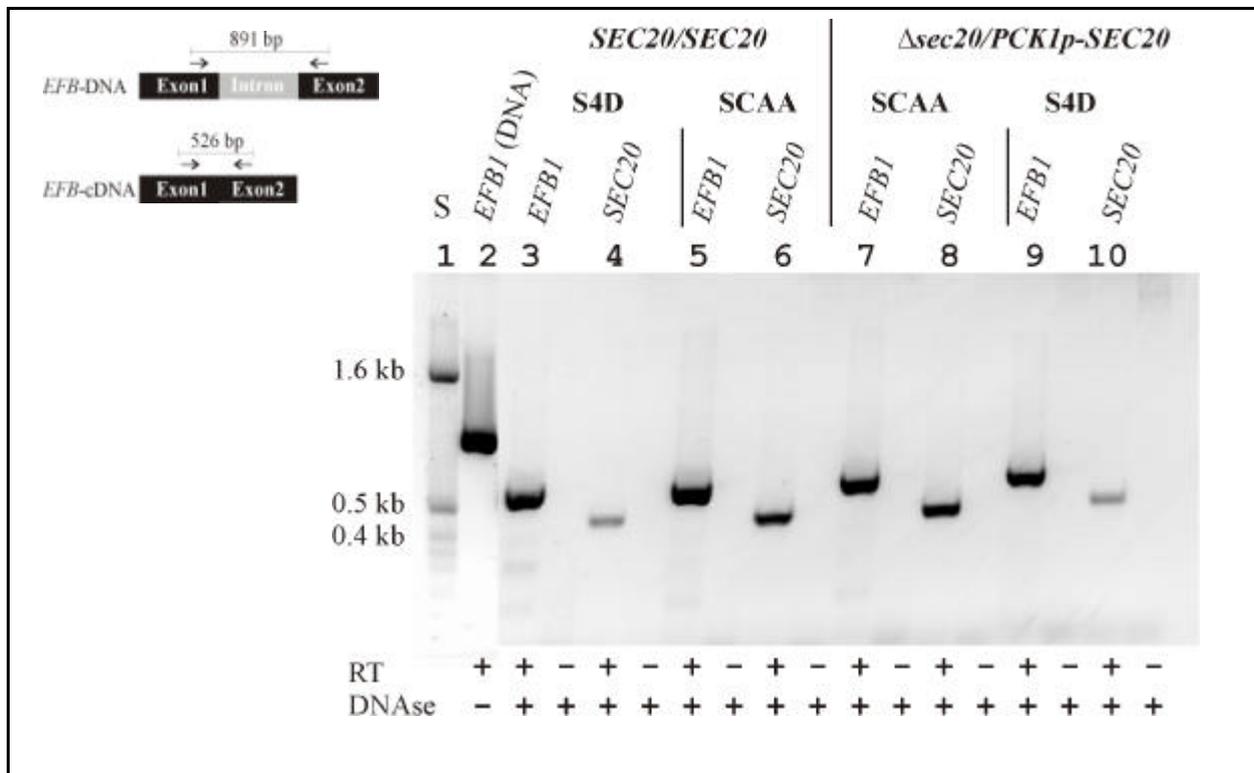


Abb. 14: Analyse der RT-PCR Produkte von *C. albicans* mRNA vom WT (*SEC20/SEC20*) und Car2d110 (*sec20D::hisG/PCK1p-SEC20*). Ein 526 bp Fragment wurde bei der Amplifikation mit *EFBI*-Primern (als Pfeile im Schema oben links dargestellt) erhalten, was den cDNA Ursprung dokumentiert (Spur 3, 5, 7, 9). Hingegen wurde ein 891 bp Fragment erhalten bei der Amplifikation von DNA (Spur 2). Ein 420 bp Fragment wurde bei der Amplifikation mit *SEC20*-Primern erhalten, sowohl bei dem WT-Stamm als auch bei der konditionalen Mutante (Spur 4, 6, 8, 10). Als molekularer Massenstandard wurde pBR322 DNA/*Hinf*II mit Fragmenten der Größe 1,6 kb; 0,5 kb; 0,4 kb verwendet (Spur 1). Allen Proben bis auf die DNA-Kontrolle (Spur 1) wurde DNaseI zugesetzt. Zu jeder PCR wurde eine Negativkontrolle ohne die Zugabe von reverser Transkriptase durchgeführt.

Die Anwesenheit des *SEC20*-Transkripts deutet darauf hin, daß das langsame Wachstum des *PCK1p-SEC20* Stammes CAR2d110 auf eine minimale Aktivität des *PCK1*-Promotors in Anwesenheit von Glukose beruht. Daher konnte trotz des Wachstums auf Glukose nicht ausgeschlossen werden, daß *SEC20* essentiell ist. Die Intensität der Signale in Abb. 14 haben keine quantitative Bedeutung, da es sich nur um eine qualitative RT-PCR handelt.

3.4.3 Wachstumsanalyse der konditionalen *MET3p-SEC20* Mutante

Zur Überprüfung der Frage, ob *CaSEC20* in *C. albicans* essentiell ist, wurde die CA2d2m-Mutante (*sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*) verwendet. Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurde eine konditionale Mutante hergestellt, in der ein *SEC20* Allel disruptiert und das andere Allel unter die Kontrolle des *MET3*-Promotors gestellt ist. Wie bei Care *et al.* (1999) beschrieben, ist der

MET3-Promotor in Anwesenheit von Methionin und Cystein reprimiert und in deren Abwesenheit induziert. Die Stämme wurden nun zunächst in selektivem Medium (SD) angezogen und anschließend in dem *MET3*-Promotor-reprimierenden Medium (SD-MC, SD-Medium mit 2,5 mM Methionin und Cystein) auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft. Die Zellen wurden bei 30°C inkubiert, und alle 30 min wurde die OD_{600} bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 15A gezeigt. Das Wachstum der konditionalen Mutante ist in reprimierendem Medium nach 20 h beendet, wohingegen der WT durch die Anwesenheit von Methionin und Cystein im Wachstum nicht beeinträchtigt ist. Auch auf festem Medium konnte die konditionale Mutante unter reprimierenden Bedingungen nicht mehr wachsen. Es wurden SD-Agarplatten hergestellt, die jeweils 2,5 mM Methionin und Cystein enthielten. Es wurden der WT, *SEC20*-Halbdisruptanten und konditionale Mutanten untersucht. Die zu testenden *C. albicans*-Stämme wurden aus einer frischen SD-Übernachtskultur entnommen, gleiche Zellzahlen auf die Platten ausgestrichen und bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 15B zu sehen. Die Anwesenheit von Methionin und Cystein verursacht einen völligen Wachstumsarrest der konditionalen Mutante, hat aber keinen Einfluß auf das Wachstum des WT oder der Halbdisruptante. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei *SEC20* tatsächlich um ein essentielles Gen handelt, wobei ein Allel für das Wachstum von *C. albicans* ausreicht.

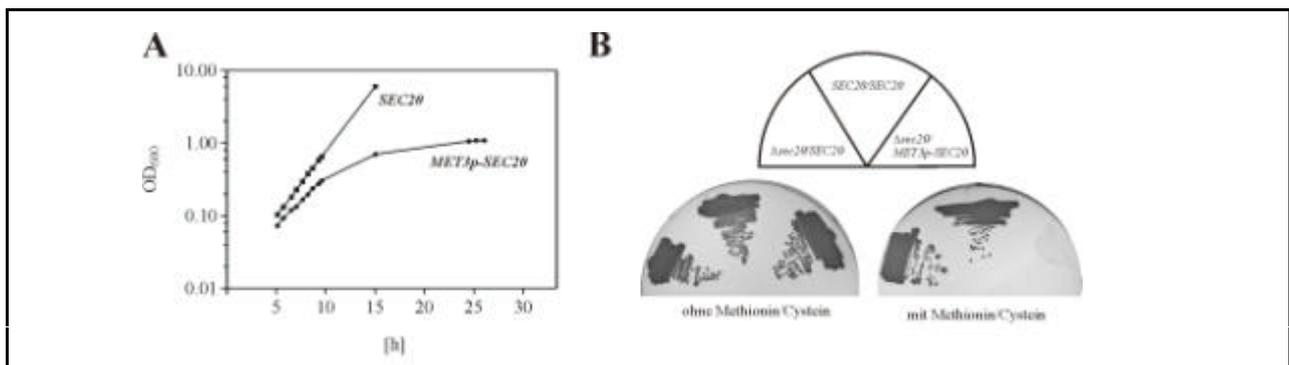


Abb. 15: Wachstum der konditionalen *MET3p*-Mutante. Das Wachstum der konditionalen Mutante CA2d2m (*sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*) wurde verglichen mit CA14[pBI-1] (*SEC20/SEC20*) und der heterozygoten Mutante CA2 (*sec20Δ::hisG/SEC20*). (A) Die Stämme wurden in SD-Medium über Nacht angezogen und anschließend auf eine $OD_{600} = 0,05$ in *MET3p* reprimierendem SD-Medium mit 2,5 mM Methionin und Cystein verdünnt (Zeitpunkt 0). Das Wachstum erfolgte bei 30°C. Nach 12 Stunden wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 in demselben Medium verdünnt, um die Zellen in der logarithmischen Phase zu halten. (B) Die Stämme wurden in SD-Medium über Nacht angezogen und gleiche Zellzahlen auf Platten mit oder ohne 2,5 mM Methionin und Cystein ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C zwei Tage inkubiert.

Der hier beobachtete Wachstumsarrest bedeutet allerdings nicht, daß die Zellen nicht mehr lebensfähig sind. Es konnte beobachtet werden, daß nach ca. fünf Tagen Inkubation in SDMC-Medium die Zellen wieder in der Lage waren zu wachsen. PCR-Analyse sowie Southern-Blot ergaben, daß sich die Anordnung im Genom nicht verändert hatte (Daten nicht gezeigt). Die Zellen zeigten den Genotyp *sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*. Diese adaptierten Zellen behielten ihren neuen Phänotyp auch nach fünftägigem Wachstum in SD-Medium bei. Es konnte auch dann keine Repression durch die Anwesenheit von Methionin und Cystein mehr festgestellt werden. Es scheint sich also bei diesem Phänomen um eine permanente Adaption zu handeln.

3.5 Expression von *CaSEC20* in *S. cerevisiae*

Das aus *S. cerevisiae* bekannte Sec20p ist zu 27 % identisch zu dem *C. albicans* Sec20p. Es kann vermutet werden, daß beide Proteine ähnliche Funktion haben. Obwohl eine Homologie von Proteinen nicht immer auf eine ähnliche Funktion schließen läßt. Dieses sollte in den folgenden Versuchen näher untersucht werden.

3.5.1 Komplementation einer *S. cerevisiae* *sec20*-Mutante durch *CaSEC20*

Um zu überprüfen, ob *CaSEC20* in *S. cerevisiae* die Funktion von *ScSEC20* übernehmen kann, wurden die Vektoren pYW9 (*CaSEC20* in *CEN*-Vektor unter der Kontrolle des *PFK2*-Promotors), pYW10 (*CaSEC20* in 2μ -Vektor unter der Kontrolle des *PFK2*-Promotors) und pYW11 (*CaSEC20* in *CEN*-Vektor unter dem eigenen Promotor) in den *S. cerevisiae* Stamm RSY275 transformiert. Dieser Stamm enthält das temperatursensitive *sec20-1* Allel (Sweet und Pelham, 1992). Als Kontrolle wurde der Vektor STM20 (*ScSEC20* in 2μ -Vektor unter der Kontrolle des *TPI*-Promotors) in diesen Stamm transformiert, der das *ScSEC20* Gen trägt. Die Transformanten wurden bei 25°C in selektivem Medium angezogen und anschließend gleiche Zellzahlen auf Vollmedium plattiert. Wie in Abb. 16 dargestellt, ist nur das *ScSEC20* in der Lage, die temperatursensitive Mutante zu komplementieren. Es konnte also gezeigt werden, daß das *C. albicans* *SEC20*-Allel in *S. cerevisiae* nicht funktionsfähig ist. Ein möglicher Grund dafür könnte der in 3.2 beschriebene unterschiedliche Kodongebrauch der beiden Hefen sein. Weitaus wahrscheinlicher ist allerdings, daß der erhebliche Größenunterschied der beiden Gene im N-terminalen Bereich der Grund für die Funktionsunfähigkeit von *CaSEC20* in *S. cerevisiae* ist.

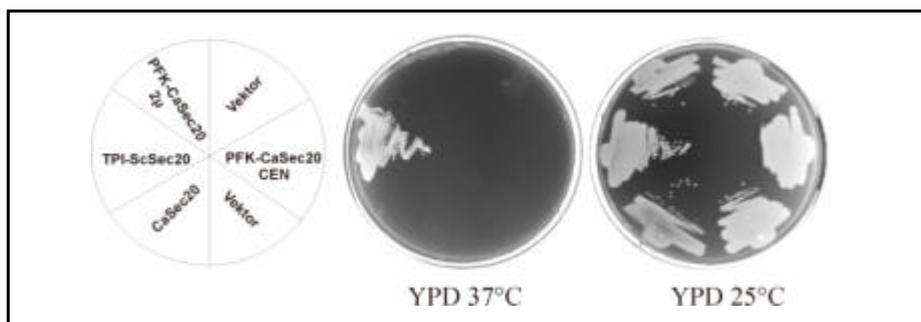


Abb. 16: Versuch zur Komplementation der temperatursensitiven *Scsec20-1* Mutante durch unterschiedliche *CaSEC20* Vektoren. Der temperatursensitive *Scsec20-1* Stamm RSY275 wurde mit den Vektoren pYW9 (*CaSEC20* in einem *CEN*-Vektor unter der Kontrolle des konstitutiven *PFK2*-Promotors), pYW10 (*CaSEC20* in einem 2μ -Vektor unter der Kontrolle des konstitutiven *PFK2*-Promotors), pYW11 (*CaSEC20* in einem *CEN*-Vektor unter der Kontrolle des eigenen Promotors), Vektor ohne Insert und STM20 (*ScSEC20* in einem 2μ Vektor unter der Kontrolle des konstitutiven *TPII*-Promotors) transformiert. Die Transformanten wurden bei 25°C in selektivem Medium über Nacht angezogen und anschließend zu gleicher Zellzahl auf Vollmediumplatten plattiert. Diese wurden dann bei 25°C bzw. bei 37°C für zwei Tage inkubiert.

3.5.2 Disruption des ScSec20p N-Terminus

Der Sequenzvergleich zwischen CaSec20p und ScSec20p zeigte, daß das CaSec20p am N-Terminus verkürzt ist. Um eindeutig zu zeigen, daß das Fehlen der ersten 95 Aminosäuren der Grund dafür ist, daß CaSec20p ScSec20p nicht ersetzen kann, wurde ein Stamm konstruiert, der eine N-terminale Disruption des ScSec20p produziert. Hierfür sollte der regulierbare *GAL1*-Promotor vor das N-terminal verkürzte *ScSEC20* gesetzt werden. Dieser Promotor wird in Anwesenheit von Glukose reprimiert und in Anwesenheit von Galaktose induziert.

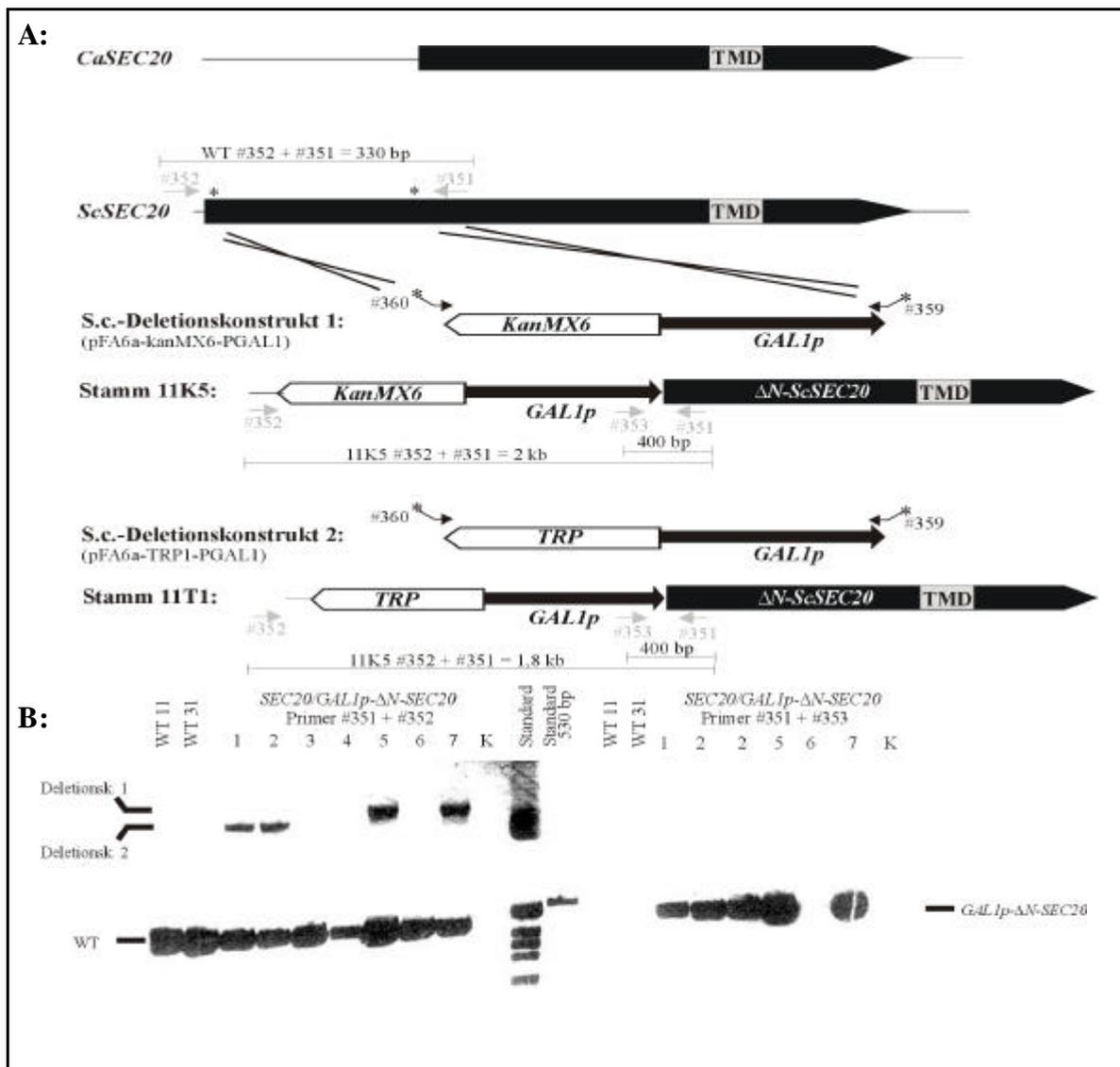


Abb. 17: Deletion des N-Terminus von *ScSEC20*. A: Schematische Darstellung der eingesetzten Deletionskonstrukte sowie des disruptierten Lokus. Angegeben sind die genomischen Strukturen des *CaSEC20* und des *ScSEC20* zur Verdeutlichung des Größenunterschieds. Es ist jeweils nur ein Allel dargestellt. Die Deletionskonstrukte 1 und 2 wurden mit Hilfe der PCR und der Primer #360 und #359 auf den Plasmiden pFA6a-TRP1-PGAL1 und pFA6a-kanMX6-PGAL1 hergestellt. Die mit * gekennzeichneten Stellen sind für die Rekombination eingesetzte homologe Bereiche. Der deletierte Lokus des Stammes 11K5 und 11T1 ist unter dem jeweilig eingesetzten Deletionskonstrukt angegeben. Die grauen Pfeile stellen die zur Überprüfung der ortsspezifischen Integration des Fragments eingesetzten, Oligonukleotide dar. TMD steht für Transmembrandomäne.

B: Überprüfung der Deletion von *ScSEC20*. In den Spuren wurden die PCR-Produkte aufgetrennt, die mit den Oligonukleotiden #351, #352 und #353 von den Stämmen WT11, WT31 (diploider SEY6210), und verschiedenen potentiellen Deletionsstämmen erhalten wurden. Die Stämme wurden abgeleitet von ihrem diploiden Ausgangsstamm und, abhängig von dem Deletionskonstrukt (mit *trp*- oder *kan*-Marker), als 11T1, 31T2, 11K5 und 31K7 bezeichnet. K: Kontrolle

Zur Deletion dienten durch PCR amplifizierte Konstrukte (2.6.3). Es wurde eine PCR auf den Vektoren pFA6a-TRP1-PGAL1 und pFA6a-kanMX6-PAGL1 mit den Primern #360 und #359 durchgeführt. Der haploide *S. cerevisiae*-Stamm SEY6210 wurde mit den zwei unterschiedlichen Deletionskonstrukten transformiert (Abb. 17, Deletionskonstrukte 1 und 2).

Es wurden keine Transformanten erhalten, daher wurde vermutet, daß der N-terminale Bereich von *ScSEC20* essentiell ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein diploider *S. cerevisiae* Stamm aus dem Stamm SEY6210 hergestellt. Der Stamm wurde, wie 2.7.1 beschreiben, mit dem Vektor YCpHO (kodiert HO-Endonuklease) transformiert und anschließend auf Uracil-freiem Medium selektioniert. Die so erhaltenen diploiden Zellen, hier als Stamm 31 und Stamm 11 bezeichnet (2.2.3, Tabelle 2), wurden erneut mit den zwei unterschiedlichen Deletionskonstrukten (Abb. 17A, Deletionskonstrukt 1 und 2) transformiert. Die Richtigkeit der Integration in den erhaltenen Transformanten wurde mit Hilfe der PCR, wie in 2.5.1 beschrieben, überprüft. Die PCR-Ergebnisse sind in Abb. 17B zu sehen. Die Transformanten 1,2,5 und 7 wurden als positiv identifiziert und mit 11T1, 31T2, 11K5 und 31K7 bezeichnet (Tabelle 2). Bei den vier positiven Transformanten handelt es sich also um diploide Zellen mit einem WT-Allel und einem N-terminal disruptiertem *SEC20*-Allel unter der Kontrolle des regulierbaren *GALI*-Promotors.

Um zu untersuchen, ob die Deletion des N-Terminus tatsächlich letal ist, wurden Tetradenanalysen durchgeführt. Hierbei sollte sich zeigen, ob auch haploide Zellen mit dem verkürzten *SEC20*-Gen lebensfähig sind. Von den vier positiven Transformanten wurde nach Sporulation eine Tetradenanalyse durchgeführt. Die einzelnen Sporen wurden mittels eines Mikromanipulators auf H₂O-Agaroseplättchen gegeben. Das Auskeimen der Sporen erfolgte auf Vollmedium mit Galaktose. Galaktose induziert den *GALI*-Promotor, so daß es zu einer Expression von *SEC20-ΔN* kommt.

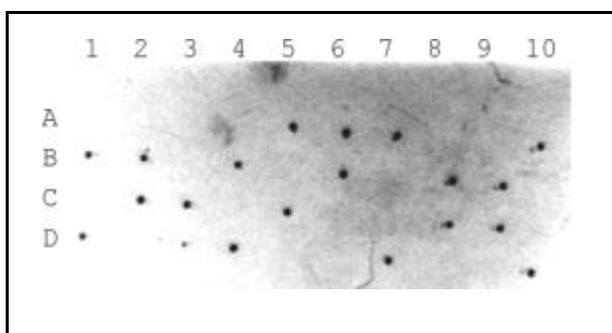


Abb. 18: Tetradenanalyse nach Sporulation. Die 4 Sporen wurden jeweils im gleichen Abstand auf ein H₂O-Agaroseplättchen (2,5 % Agarose) untereinander gelegt, welches anschließend auf eine Vollmediumplatte mit 2% Galaktose gegeben wurde. Die Platte wurde 2 Tage bei 30°C inkubiert. Es sind 10 Tetraden des Stammes 31T7 dargestellt.

Die ausgekeimten Sporen wurden anschließend auf den Resistenzmarker (Kanamycin oder Tryptophan) getestet, der die *SEC20-ΔN*-Deletion markiert. Es zeigte sich bei allen vier Stämmen eine 2:0 Segregation (eine Analyse-Platte ist exemplarisch in Abb. 18 dargestellt). Es wurden von allen vier Stämmen mindestens 10 Tetraden gelegt, wobei nur 5 % nicht einer 2:0

Segregation entsprachen. Dies bedeutet, daß nur jeweils zwei der vier erhaltenen Sporen lebensfähig sind. Die anschließende Resistenzanalyse ergab, daß die lebensfähigen Stämme keinen Resistenzmarker enthielten. Dies bedeutet, daß jeweils die Spore mit dem WT-Allel lebensfähig ist und nicht die Spore mit dem eingeführten Marker. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß *CaSEC20* den Stamm *sec20-1* aufgrund seines kürzeren N-Terminus nicht komplementieren kann. Daraus läßt sich schließen, daß die Deletion der ersten 95 Aminosäuren von ScSec20p zur Letalität führt.

3.6 Antimykotika-Sensitivität in konditionalen *SEC20*-Mutanten

Der Transport von Proteinen zur Zellmembran sowie die Sekretion von Proteinen leistet einen wichtigen Beitrag zu den Abwehrmechanismen der Hefen gegen Antimykotika. Eine Permeabilisierung der Membran durch einen gestörten Transport oder eine Veränderung der Proteine (z. B. Unterglykosylierung) führen zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegen verschiedene Antimykotika.

Daher sollte mit Hilfe der hier konstruierten konditionalen *SEC20*-Mutanten getestet werden, ob es zu einer gestörten Sekretion oder Glykosylierung und zu einer erhöhten Antimykotika-Sensitivität kommt.

3.6.1 Sensitivität von *SEC20*-Mutanten gegen Antimykotika

Zur Phänotypisierung der konditionalen *SEC20*-Mutante wurden Vollmedium-Platten mit 4 % Glukose (*SEC20*-Expression reprimiert) sowie Platten mit 2 % Casaminoäuren (*SEC20*-Expression induziert) als C-Quelle hergestellt, die definierte Konzentrationen des jeweiligen Antibiotikums enthielten (Abb. 19, reprimierte *SEC20*-Expression). Die zu testenden *C. albicans*-Stämme wurden einer Übernachtskultur entnommen und verschiedene Zellzahlen auf die Antibiotika-haltigen Platten aufgetragen und bei 30°C für ein bis zwei Tage inkubiert.

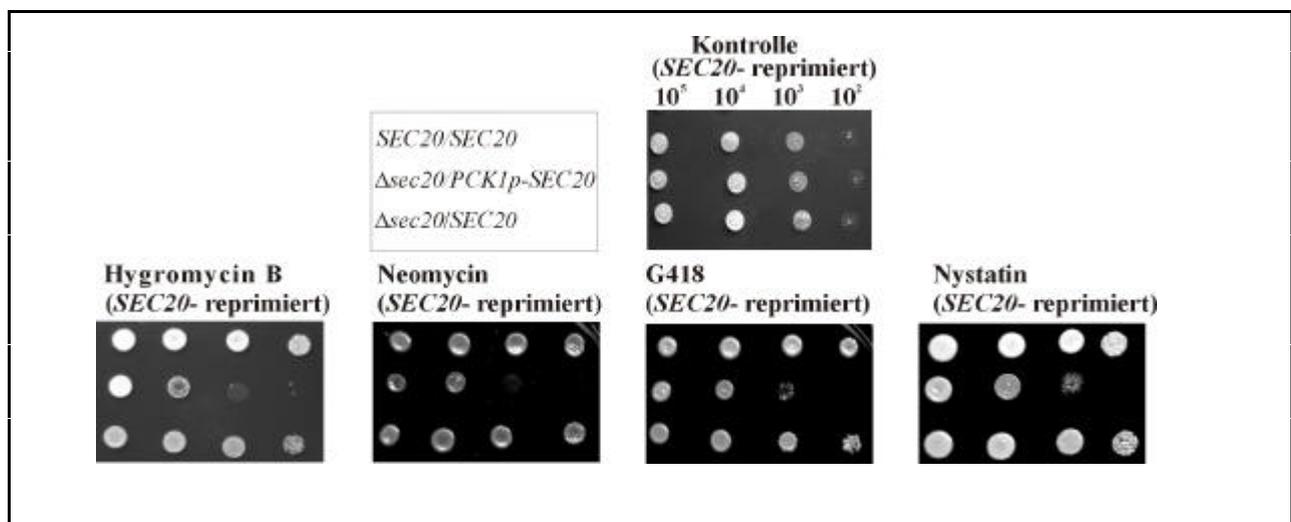


Abb. 19: Sensitivität der konditionalen *SEC20*-Mutanten gegen die Antibiotika. Die Aminoglykosidantibiotika Hygromycin B (0,25 mg/ml), Neomycin (30 mM) und G418 (0,6 mg/ml) sowie das Polyantibiotikum Nystatin (1,5 µg/ml) wurden eingesetzt. 5 µl einer Übernachtskultur wurden auf Vollmedium-Platten mit 4 % Glukose (YP4D) und den angegebenen Antibiotika-Mengen aufgetragen. Die 5 µl enthielten 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 oder 5×10^2 Zellen. Es wurden ein WT-Stamm CAI4 [pBI-I] (*SEC20/SEC20*), die konditionale Mutante, CAr2d110 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) und eine Halbdisruptante, CA2 (*SEC20/sec20Δ::hisG*) aufgetropft. Die Platten wurden ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Stämme auf YP4D-Agar aufgetragen.

Die getesteten Aminoglykosidantibiotika verursachten einen Wachstumsdefekt bei verringerter *SEC20*-Expression, d.h. wenn die konditionale Mutante auf *PCK1*-Promotor-reprimierenden Platten wuchs. Dieses wurde für die Aminoglykosidantibiotika Hygromycin B (0,25 mg/ml), Neomycin (30 mM) und G418 (0,6 mg/ml) gezeigt (Abb. 19). Kein vermindertes Wachstum wurde auch in Anwesenheit von Aminoglykosidantibiotika unter *PCK1*-Promotor-induzierenden Bedingungen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Es war deutlich zu sehen, daß in Anwesenheit von Sec20p die verwendeten Antimykotika in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf das Wachstum der konditionalen Mutante haben. Die für die konditionale Mutante festgestellte erhöhte Sensitivität unter Promotor-reprimierenden Bedingungen war bei Halbdisruptanten nicht zu beobachten. Neben den Aminoglykosidantibiotika zeigt auch das Polyen Nystatin (1,5 µg/ml) einen reprimierenden Einfluß auf das Wachstum von Zellen mit verminderter *SEC20*-Expression. Auch hier war kein Wachstumsdefekt in Halbdisruptanten sowie auf Kontrollplatten mit induzierter *SEC20*-Expression festzustellen. Auf die gleiche Weise wurden Clotrimazol (0,5 µg/ml) als Beispiel für die synthetischen Azole sowie Natrium-Orthovanadat getestet. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Sensitivität der Zellen gegenüber diesen Substanzen. In diesen Versuchen wurden die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen der Antibiotika getestet (siehe Tabelle 4, 2.2.4). Geringere Konzentrationen der Substanzen zeigten eine schwächere Ausprägung des gezeigten Phänotyps, wohingegen höhere Konzentrationen auch zu vermindertem Wachstum des *C. albicans* WT-Stammes führten (nicht gezeigt).

Auch in Anwesenheit des Polyantibiotikums Nystatin fand ein reduziertes Wachstum bei verminderter *SEC20*-Expression statt. Auch hier hatte die Disruption eines Allels keinen Einfluß auf die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Antibiotikum.

3.6.2 Sensitivität von *sec20*-Mutanten gegenüber verschiedenen Substanzen

Neben den oben erwähnten Antibiotika geben noch weitere Substanzen Aufschluss über die durch die *sec20*-Mutation ausgelösten Veränderungen in der Zelle. So ist z. B. bekannt, daß Calcofluor White bei Zellwanddefekten eine erhöhte Sensitivität hervorruft (Ram *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden noch eine Reihe weiterer Substanzen auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegenüber der konditionalen *SEC20*-Mutante getestet.

Eine Übernachtskultur wurde so verdünnt, daß auf alle Platten eine Verdünnungsreihe (siehe 3.6.1), aufgetragen werden konnte. Die Platten wurden nach der Beimpfung ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Es zeigte sich, daß die konditionale *SEC20*-Mutante unter *PCK1*-

Promotor-reprimierenden Bedingungen nicht mehr auf YP4D mit 100 µg/ml Calcofluor White bei einer zu geringen Zelldichte wachsen kann (Abb. 20). Auf das Wachstum der Halbdisruptante sowie den Wildtyp hatte Calcofluor White in dieser Konzentration keinen Einfluß.

Der Farbstoff Congo Red, der an das Glukannetzwerk der Zellwand bindet und die Bildung der β 1,3-Glukanmikrofibrillen verhindert (Kopecka und Gabriel, 1992), sollte auf seinen Einfluß auf die Sekretionsmutante getestet werden. Die konditionale *SEC20*-Mutante konnte auf Medium mit 1 mg/ml Congo Red nicht mehr wachsen.

Für Proteinkinase C - Mutanten (*Pkc*) ist aus *S. cerevisiae* eine Sensitivität gegenüber SDS bekannt (Jacoby *et al.*, 1997). Die Aktivierung vieler Proteine, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, wird maßgeblich von der Proteinkinase C beeinflusst (Igual *et al.*, 1996). Die Sensitivität gegen SDS kann also auch hier auf Defekte in der Zellwand, z. B. durch veränderte Sekretion, zurückgeführt werden. Aus diesem Grund sollte das Wachstum der konditionalen *C. albicans* Mutante auf Medium mit SDS getestet werden.

Die Übernachtskulturen wurden so verdünnt, daß auf allen Platten einer Versuchsreihe jeweils die gleichen Zellmengen aufgetragen wurden. Aufgrund der verringerten Oberflächenspannung von Platten mit SDS konnten keine ‚Tropftests‘ durchgeführt werden. Es wurden daher jeweils gleiche Zellzahlen ausgestrichen. Es zeigte sich, daß die konditionale Mutante unter *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingungen im Gegensatz zum Wildtyp und der Halbdisruptante auf Platten mit 0,09 % SDS nicht mehr wachsen kann (Abb. 20).

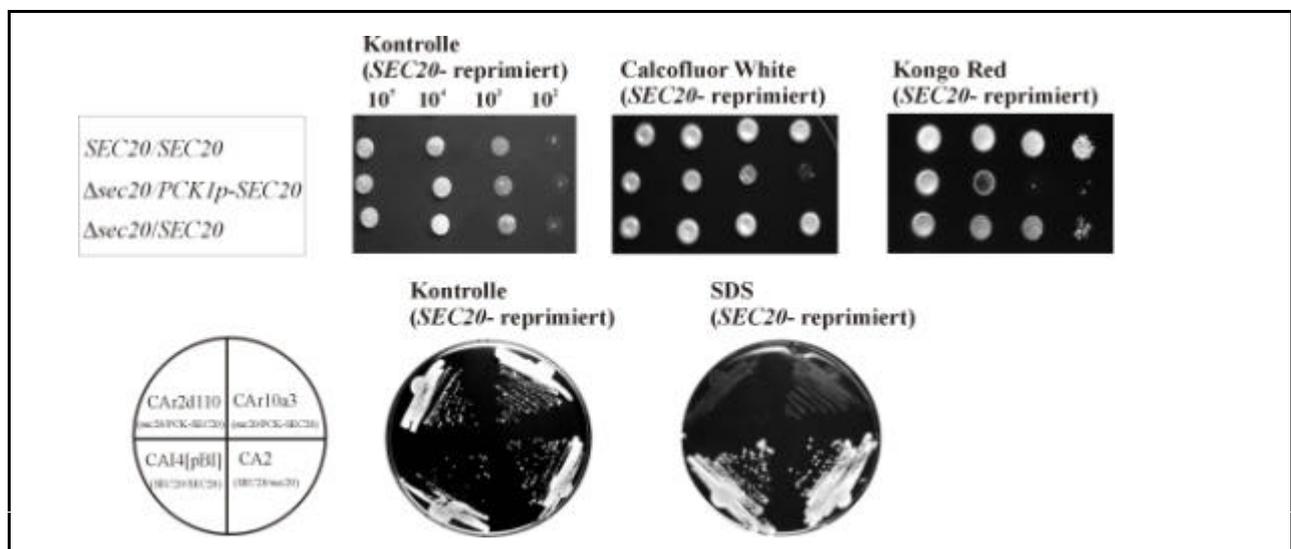


Abb. 20: Sensitivität der *C. albicans*-Stämme gegen verschiedene Substanzen. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur verdünnt, und es wurden je 5 µl Zellen auf Vollmedium-Platten mit 4 % Glukose aufgetragen. Die 5 µl enthielten 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 oder 5×10^2 bis 5×10^2 Zellen (von links nach rechts). Es wurden der WT-Stamm CAI4 [pBI-I] (*SEC20/SEC20*), die konditionale Mutante CAr2d110 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) und eine Halbdisruptante CA2 (*SEC20/sec20Δ::hisG*) aufgetropft. Die Platten wurden ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle wurden die Stämme auf YP4D-Platten ohne Zusätze gegeben. Es ist der Sensitivitätstest gegenüber Calcofluor White (100 µg/ml), Congo Red (1 mg/ml) und SDS (0,09 %) abgebildet. Auf SDS-Platten wurden gleiche Zellzahlen ausgestrichen.

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß sich Glykosylierungsmutanten sensitiv gegenüber dem Diesterase-Inhibitor Koffein verhalten (Gentsch und Tanner, 1996). Die hier getestete Sekretionsmutante zeigte aber keine veränderte Sensitivität gegenüber Koffein im Vergleich zum Wildtyp. Des weiteren hatten sowohl der Eisenchelator EDDHA (vergleiche Ramanan und Wang, 2000) als auch Bipyridin keinen Einfluß auf das Wachstum der konditionalen *SEC20*-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Eine Mutation der Phosphatidylinositol-3-Kinase in *C. albicans*, die maßgeblich am Transport von Hydrolasen zwischen dem Endosom und der Vakuole sowie dem späten Golgi und der frühen Vakuole beteiligt ist, führt zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegen osmotischen Stress (Bruckmann *et al.*, 2000). Es wurde daher hier das Wachstum der Sekretionsmutante unter hyperosmotischen Bedingungen untersucht. Sowohl der Zusatz von 1,5 M NaCl, 1,5 M KCl als auch Sorbitol hatte keinen Einfluß auf das Wachstum der konditionalen Mutante unter reprimierenden Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Aus allen diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß nur ein bestimmtes „Set“ von Proteinen, die direkt oder indirekt an einer Antimykotikaresistenz beteiligt sind, bei einer verringerten *SEC20* Expression beeinflusst wird.

3.7 Einfluß der *SEC20*-Expression auf die ultrastrukturelle Zellmorphologie

Für eine genaue Untersuchung der Zellmorphologie der konditionalen Mutanten wurde die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Es wurden die intrazellulären Membranstrukturen in *C. albicans* Zellen mit normaler bzw. reduzierter *SEC20*-Expression untersucht. Sowohl die konditionale Mutante mit *SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors als auch die konditionale Mutante mit *SEC20* unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors wurden eingesetzt. Die unter Promotor-reprimierenden Bedingungen herangezogenen Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden fixiert. Zum einen wurde eine Glutaraldehyd-Fixierung durchgeführt (vergleiche 2.17.1). Die Ergebnisse sind in Abb. 21 (A1-C1) zu sehen. Des weiteren wurde eine Kaliumpermanganat-Fixierung wie in 2.17.2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Fixierung sind vergleichend in Abb. 21 (A2-C2) zu sehen. Die Kaliumpermanganat-Fixierung fixiert und zeigt nur Membranen in den Zellen. Es wird hierbei selektiv Manganoxid an die Membranen gelagert, daher nur diese fixiert und später sichtbar. Die Glutaraldehyd-Fixierung hingegen erhält die gesamten Zellinhalte und gibt daher alle Komponenten der Zelle wieder.

Die zu untersuchenden Stämme wurden in Promotor-reprimierendem Medium bei 30°C angezogen und in der logarithmischen Phase geerntet. Die Bilder A1 und A2 zeigen jeweils WT-Zellen, Bilder B1 und C1 zeigen die konditionalen Mutanten mit *PCK1*-Promotor (Abb. 21). Alle unter 1 gezeigten Zellen wurden unter *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingungen, d. h. in Minimalmedium mit 4 % Glukose, angezogen und mit Glutaraldehyd fixiert. Es wird deutlich, daß eine reduzierte *SEC20*-Expression eine Anhäufung von Membranen in der Zelle hervorruft. Die angereicherten Membranen erscheinen in langen Stapeln, meistens bestehend aus drei Membranlagen. Daher kann man feststellen, daß ein Zellwachstum bei verminderter Menge an

Sec20-Protein zu einer veränderten Membranverteilung in der Zelle führt. Es scheint möglicherweise eine extensive Anreicherung von ER-Membranen oder Golgi stattzufinden. Der gleiche Phänotyp ist auch bei den konditionalen Mutanten mit *MET3*-Promotor zu sehen. In Abb. 21 sind eine WT-Zelle (A2) und konditionale Mutanten (B2 und C2) gezeigt, die unter Promotor-reprimierenden Bedingungen, d. h. in Minimalmedium mit 2,5 mM Methionin und Cystein, angezogen wurden. Auch bei der hier verwendeten Kaliumpermanganat-Fixierung ist die massive Anreicherung von Membranen zu beobachten. Aufgrund der Art der Fixierung sind hier die Membranen deutlicher zu erkennen.

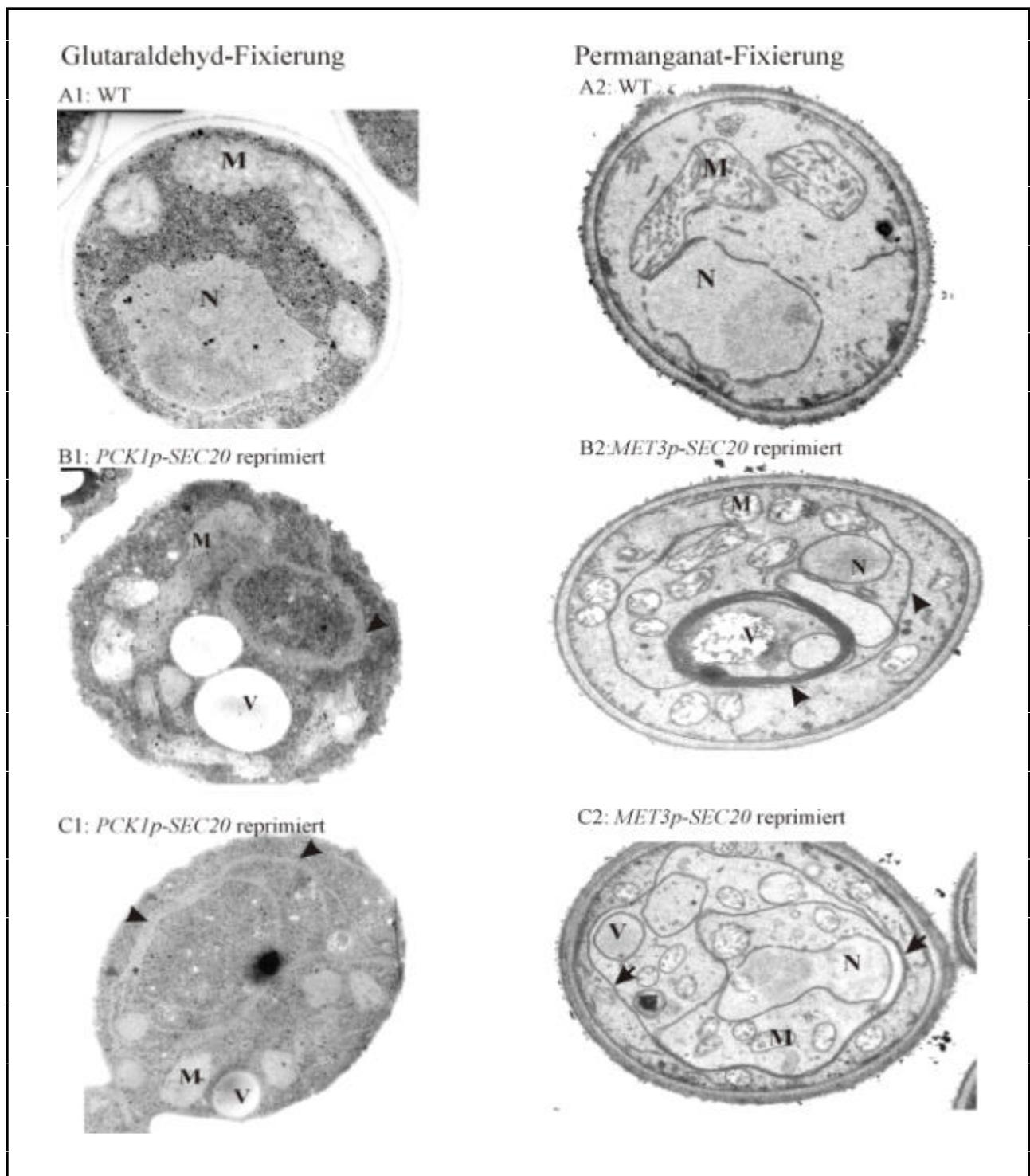


Abb. 21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stämmen mit normaler (WT) oder reduzierter *SEC20*-Expression. Ein WT-Stamm CAI4[pBI-1] (*SEC20/SEC20*) ist in A1 und A2 zu sehen. Die Bilder B1 und C1 zeigen die konditionale Mutante CAr2d110 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) und die Bilder B2 und C2 die konditionale Mutante CA2d2m (*sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*). Die Stämme wurden in *PCK1*-Promotor-reprimierendem S4D Medium (A1 bis C1) oder in *MET3*-Promotor-reprimierendem SDMC Medium (A2 bis C2) angezogen. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Es wurde eine Glutaraldehyd-Fixierung (A1 bis A3) oder zur selektiven Membranfixierung eine Kaliumpermanganat-Fixierung (B1 bis B3) durchgeführt. Die Pfeile zeigen die angereicherten Membranen. N steht für Nukleus, M für Mitochondrium und V für Vakuole.

3.8 Einfluß der *SEC20* Expression auf die Hypheninduktion

Die Hyphenbildung von *C. albicans* wird als wichtiger Faktor bei der Virulenz angesehen. Die Sekretion von spezifischen Proteinen, z. B. Proteasen, steht in einem funktionellen Zusammenhang mit der Hyphenbildung und dem Eindringen in Epithelgewebe. Daher sollte untersucht werden, ob eine veränderte Sekretion durch verminderte *SEC20*-Expression Einfluß auf die Hyphenbildung von *C. albicans* hat.

Es ist bekannt, daß *C. albicans* unter der Einwirkung von positiven Stimuli wie Serum oder N-Acetylglukosamin (GlcNAc) Hyphen ausbildet (Odds, 1988). Um zu überprüfen, ob eine verminderte *SEC20* Expression einen Einfluß auf diese Hyphenbildung hat, wurden verschiedene *C. albicans*-Stämme zunächst auf serumhaltigen Nährböden ausgestrichen. Die Platten enthielten jeweils 5, 10 oder 20 % Pferdeserum (Sigma) und wurden mit 4 % Glukose hergestellt. Nach einer Inkubation bei 37°C wurden die Platten im Abstand von einer halben Stunde mikroskopiert. Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp-Zellen und mutierten Zellen (*sec20/PCK1p-SEC20*) festgestellt werden. Das gleiche wurde beobachtet, wenn man die Zellen in Flüssigmedium anzog. Das Ergebnis zeigt, daß die Proteine, die zur Hyphenbildung durch positive Stimulation beitragen, in *sec20* Mutanten nicht beeinträchtigt sind. Es könnte auch sein, daß die Beeinträchtigung durch eine verminderte *SEC20* Expression nicht für einen beobachtbaren Phänotyp ausreichend ist.

Auch Mangelmedien, wie z. B. die sogenannten „Spider“-Platten, sind in der Lage, die Hyphenbildung von *C. albicans* auszulösen (Liu *et al.*, 1994). Es wird davon ausgegangen, daß die durch positive Stimulation induzierte, Hyphenbildung und die Induktion des filamentösen Wachstums unter Mangelbedingungen durch zwei unabhängige Signale gesteuert werden (Köhler und Fink, 1996; Lo *et al.*, 1997). Die Hyphenbildung der *sec20*-Mutanten, ausgelöst durch Mangelbedingungen, konnte aufgrund des eingesetzten *PCK1*-Promotors nicht getestet werden, da die zur Repression notwendige Glukose die Hyphenbildung auf Spider-Medium unterdrückt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß Sec20p einen Einfluß auf die Hyphenbildung unter diesen Bedingungen hätte.

3.9 Analyse der Sec20p-Funktion in der Sekretion

Bei der Suche nach der Funktion von Sec20p im Sekretionsweg wurden verschiedene Proteine untersucht. Um zu testen, ob sezernierte Proteine in *C. albicans* vom *SEC20*-Expressionslevel abhängig sind, wurde die Sekretion von Chitinasen und Aspartylproteasen (Sap) untersucht.

3.9.1 Untersuchungen zur Sap2-Sekretion

Zur Untersuchung des Einflusses von Sec20p auf die Sekretion wurde die Sap2-Protease-Isoform als „Sekretionsindikator“ eingesetzt. Versuche mit konditionalen Mutanten wurden durchgeführt, wobei *SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors oder unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors exprimiert wurde. Die Expression und Sekretion von *SAP* wurden in den Transformanten durch Wachstum in BSA (bovine serum albumin) enthaltendem Medium induziert.

Eine stationär gewachsene Kultur des Stammes CA2d2m (*sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*) wurde mit 0,5 M Methionin/Cystein versetzt und weitere acht Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in BSA-Medium in einer OD₆₀₀ von 10 aufgenommen (Methode angelehnt an Mao *et al.*, 1999). Alle zwei Stunden wurden 100 µl Probe abgenommen und abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde mit 3x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und über ein SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte entweder eine Coomassie-Färbung (siehe 2.8.9) zur Anfärbung des noch vorhandenen BSA im Kulturüberstand (Abb. 22A) oder eine Detektion der sezernierten Aspartylproteasen (Abb. 22B und C). Mit einem Sap2-Antikörper konnte nach einer Western-Blot-Analyse sekretiertes Protein nachgewiesen werden (Abb. 22B und C). Untersuchungen mit dem *C. albicans* Stamm CAr10a3 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) erfolgten wie oben beschrieben, allerdings wurde anstelle der Methionin/Cystein-Zugabe der Glukosegehalt auf 4 % erhöht, um den *PCK1*-Promotor zu reprimieren.

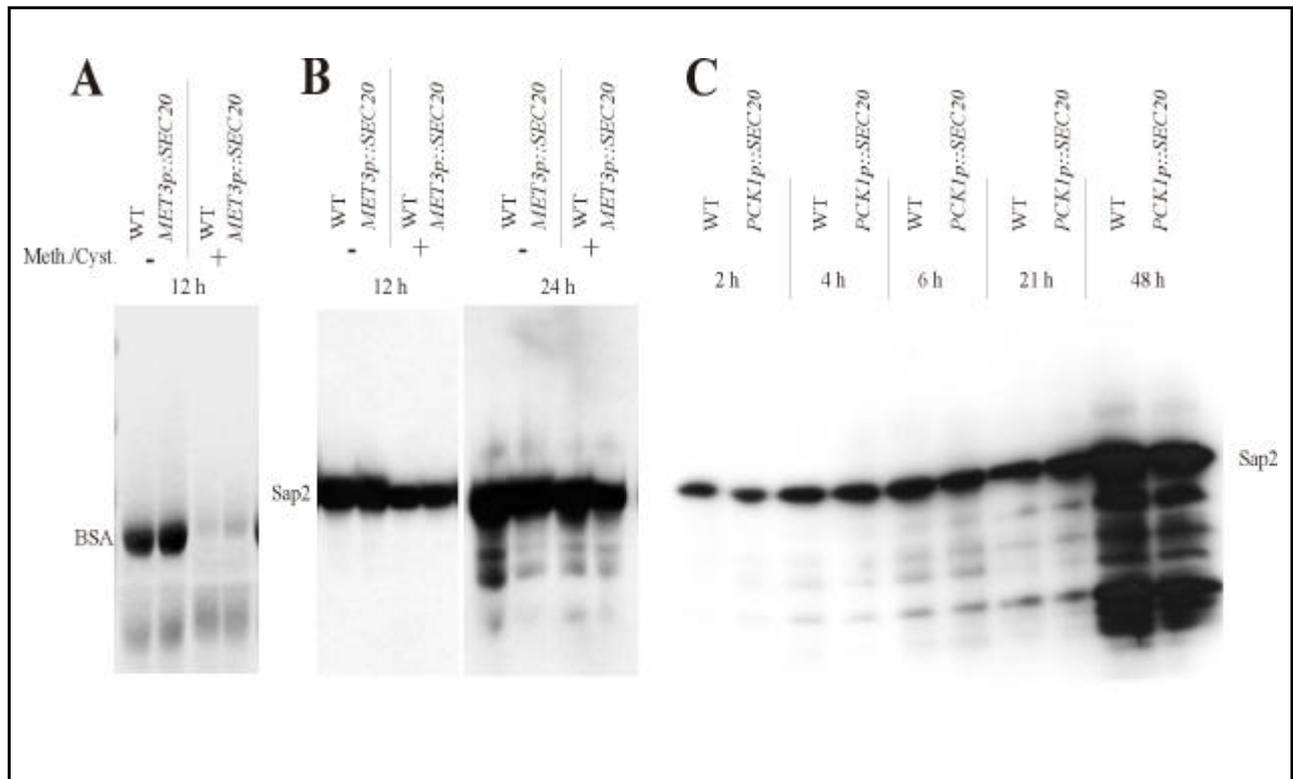


Abb. 22: Einfluß der Sec20p-Expression auf die Sap2-Sekretion.

A: Wildtyp und Mutante CA2d2m (*sec20Δ::hisG/MET3p-SEC20*) wurden in BSA-Medium mit oder ohne Zusatz von 0,5 M Methionin/Cystein bei 30°C für zwölf Stunden inkubiert. Es wurden 50 µl Kulturüberstand auf ein SDS-PAGE aufgetragen und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt.

B: Western-Blot-Analyse des in A gezeigten Gels, sowie eines Gels mit nach 24 Stunden entnommenen Kulturüberständen. Es wurden 20 µl Kulturüberstand nach zwölf Stunden und 10 µl Kulturüberstand nach 24 Stunden aufgetrennt. Nachweis des Proteins mit dem Maus-anti-Sap2-Antikörper.

C: Western-Blot unter Verwendung des Maus-anti-Sap2-Antikörpers. Der Wildtyp und die Mutante CA10a3 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) wurden bei 30°C in BSA-Medium mit 4% Glukose inkubiert. Von den, zu den unterschiedlichen Zeiten entnommenen, Proben wurden je 20 µl aufgetragen. Von der „48 Stunden“-Probe wurden 10 µl aufgetragen.

Wie in Abb. 22A sichtbar ist der BSA-Verbrauch von Zellen in Anwesenheit von Methionin und Cystein deutlich erhöht, allerdings nicht nur bei den Mutanten, sondern auch beim Wildtyp. Es kann also angenommen werden, daß es sich hierbei nicht um eine Auswirkung einer verminderten Sec20p-Expression handelt, sondern einen Effekt, der durch zugesetzte Aminosäuren hervorgerufen wird. Die Sekretion von Sap2 scheint hiermit allerdings nicht zu korrelieren, wie man in Abb. 22B sehen kann, da nach zwölf Stunden die sekretierte Proteinmenge in Gegenwart von Aminosäuren geringer ist als ohne Zugabe von Aminosäuren. Nach 24 Stunden ist kein Unterschied in der Menge des sekretierten Proteins mehr zu erkennen.

Abb. 22C macht sichtbar, daß die Sap2 Sekretion im Stamm CA10a3 (*sec20Δ::hisG/PCK1p-SEC20*) und im Wildtyp gleich ist. Dies deutet darauf hin, daß eine verringerte SEC20-Expression keinen Einfluß auf die Sap2 Sekretion hat. Das Wachstum der Zellen während des Versuchs wurde durch eine OD₆₀₀-Bestimmung zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme

untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Stämmen festgestellt.

3.9.2 Untersuchungen zur Chitinase-Sekretion

Chitinase, ein *O*-glykosyliertes Protein, wird in *C. albicans* sowohl in die Zellwand eingebaut als auch sezerniert. Um zu untersuchen, ob Sec20p für die Sekretion von Chitinasen notwendig ist, wurde die enzymatische Aktivität von zellgebundener und sekretierter Chitinase bestimmt. Es wurde die konditionale Mutante mit *SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors in 5 ml YPD (4 % Glukose zur Repression des Promotors) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. fünf herangezogen und anschließend 1 ml Kultur abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und schließlich in 1 ml McIlvaine-Puffer pH 4,0 aufgenommen. Für den Enzymtest wurden je 20 µl Kulturüberstand bzw. Zellsuspension eingesetzt, wobei die eingesetzte Menge der OD₆₀₀ angepaßt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 zusammengefaßt.

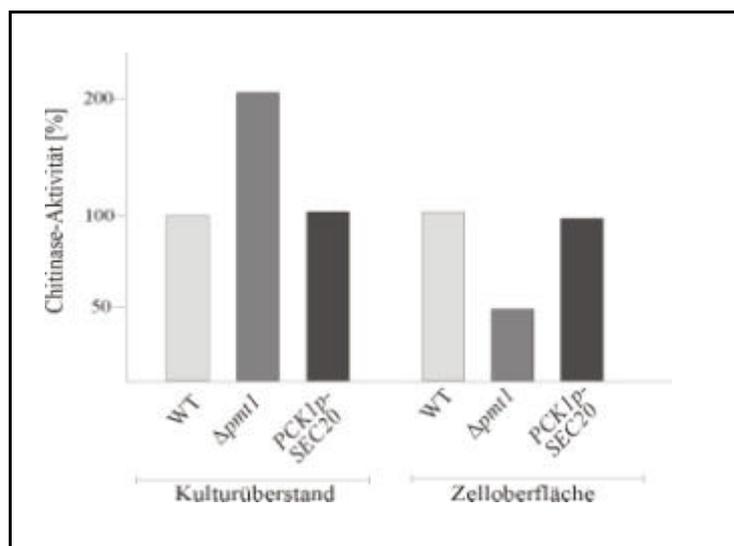
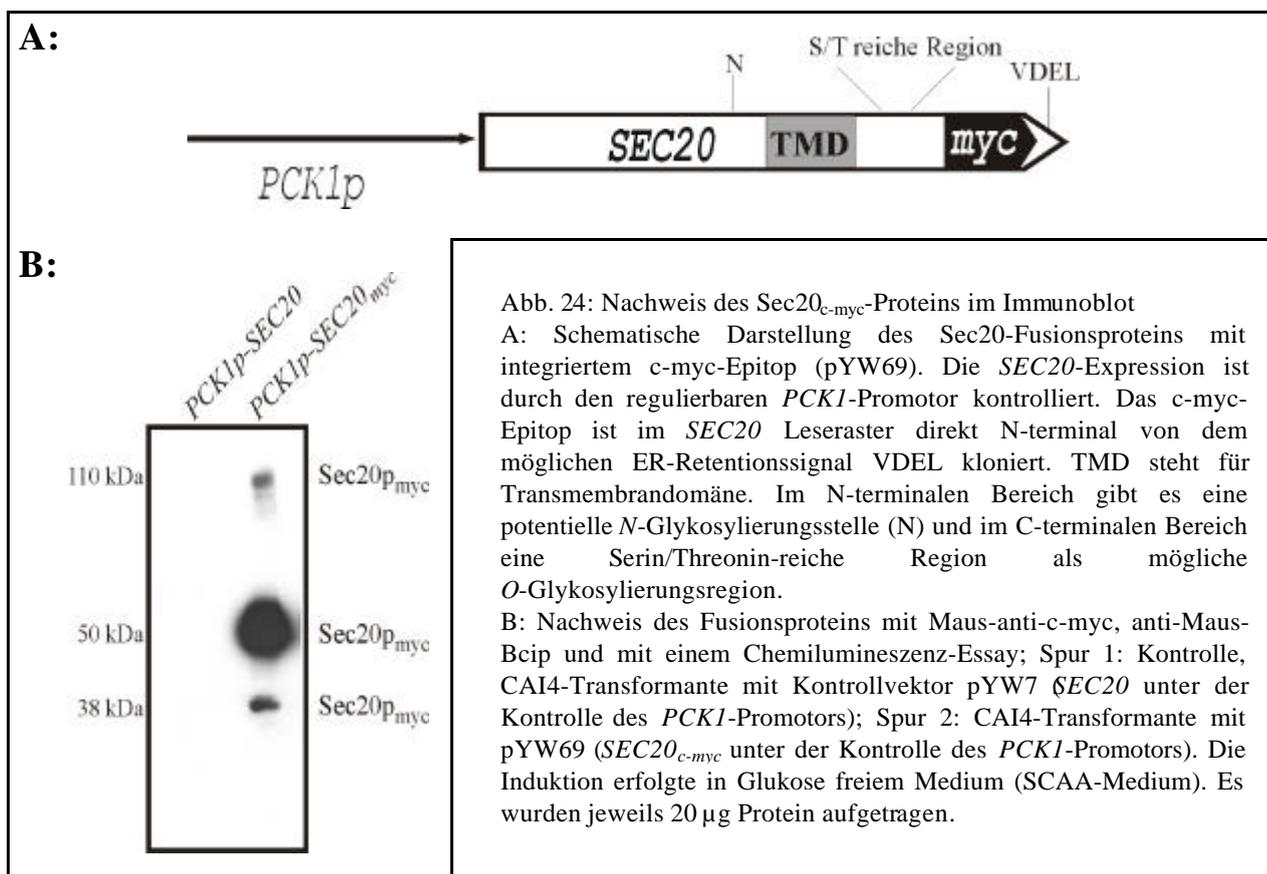


Abb. 23: Messung der Chitinase-Aktivität. Die Fluoreszenz wurde in einem Fluorometer gemessen und es sind hier die Werte in Prozent angegeben. Die Chitinase-Aktivität des WT-Stammes wurde als 100 % gesetzt. Ein $\Delta pmt1$ -Stamm wurde als Positivkontrolle eingesetzt, ein WT-Stamm als Negativkontrolle. Jeder Wert gibt den Mittelwert einer Doppelbestimmung von zwei Versuchen wieder.

Für den Wildtyp und die Mutanten (*sec20/PCK1p-SEC20*) wurden sowohl im Kulturüberstand als auch an der Zelloberfläche ähnliche Enzymaktivitäten gemessen. Es scheint daher, daß die Sec20p-Expressionsrate in Zellen keinen Einfluß auf die Chitinase-Aktivität hat. Die Positivkontrolle (*pmt1/pmt1*) zeigte wie erwartet eine erhöhte Enzymaktivität im Kulturüberstand und eine verringerte Enzymaktivität an der Zelloberfläche (Timpel *et al.*, 1998).

3.10 Nachweis von Sec20p im Immunoblot

Mit Hilfe einer Immunoblot-Analyse sollte Sec20p näher charakterisiert werden. Der hierfür verwendete Expressionsvektor pYW69 kodiert für ein Sec20p-Fusionsprotein, das am C-terminalen Ende ein internes c-myc-Epitop trägt (siehe Abb. 24A). Dieses interne Epitop wurde eingesetzt, um das etwaige Retentionssignal (VDEL) nicht zu zerstören. Zur Überproduktion von Sec20_{p-c-myc} wurde die Genfusion unter die Kontrolle des *PCK1*-Promotors gestellt. Für den Immunoblot wurden die CAI4-Transformanten, die die *PCK1p-SEC20_{c-myc}*-Fusion in SCAA-Medium (induzierendem Medium) exprimieren, angezogen und Rohextrakte hergestellt (siehe 2.8.2). Aus dem 1 kb umfassenden offenen Leserahmen von *SEC20* und der c-myc-Epitop-Sequenz ergibt sich eine theoretische Molekularmasse des Sec20-Fusionsproteins von 38 kDa; aus diesem Grund erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel. Sec20_{c-myc} wurde mit dem c-myc-Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in der Abb. 24B dargestellt.



Bei der hier eingesetzten Methode zur Darstellung des Sec20-Proteins im Immunoblot wurden drei Signale detektiert. Eine Bande bei 38 kDa, was der erwarteten Größe des Sec20-Proteins entspricht und je eine Bande bei einer Laufhöhe von 50 kDa und 110 kDa (Abb. 24). Das Ergebnis wurde jeweils mit unabhängigen Transformanten bestätigt. Zusätzlich wurden die CAI4-Transformanten mit pYW69 auch in glukosehaltigem Medium angezogen. Rohextrakte von diesen unter *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingungen angezogenen Zellen zeigten kein

Signal im Immunoblot (Daten nicht gezeigt). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß es sich bei den spezifischen Signalen tatsächlich um das c-myc-markierte Sec20-Protein handelt.

3.11 Untersuchung von Sec20p auf posttranslationale Modifikationen

Da das Sec20p teilweise eine unerwartete Größe im Immunoblot aufwies, sollte untersucht werden, ob das Laufverhalten durch posttranslationale Modifikationen bedingt sein kann. Eine mögliche post-translationale Modifikation ist die Glykosylierung, die eine wichtige Modifikationsform von Proteinen in Eukaryoten darstellt. Die Proteinsequenz von Sec20p läßt die Vermutung zu, daß Glykosylierung möglich ist. Es sind sowohl eine N-Glykosylierungsstelle als auch eine Serin/Threonin reiche Region vorhanden (vergleiche Abb. 24A). Von Serin/Threonin reichen Regionen ist bekannt, daß dort häufig O-Glykosylierung stattfindet (Bause und Lehle *et al.*, 1979; Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991).

3.11.1 Nachweis der Glykosylierung von Sec20p

Fast alle Glykoproteine der Hefe binden an das Lektin Concanavalin A (ConA). Um den Glykosylierungszustand von Sec20p zu analysieren, wurden die gebundene und ungebundene Fraktion einer ConA-Sepharose-Fällung von Rohextrakten der Hefe analysiert. Hierfür wurden Rohextrakte von Transformanten, die das Sec20_{c-myc}-Protein produzieren, für vier Stunden mit ConA-Sepharose inkubiert (Abb. 25A). Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat entweder gewaschen oder mit Methyl- α D-Mannopyranosid inkubiert. Es ist bekannt, daß Methyl- α D-Mannopyranosid die Bindung von Glykoproteinen an ConA-Sepharose kompetitiv verdrängt (Munske *et al.*, 1978). Nach erneuter Zentrifugation wurden von den einzelnen Fraktionen je 30 μ g Protein in einem SDS-PAGE aufgetrennt; dann konnte mittels des c-myc-Antikörpers Sec20 Protein detektiert werden (Abb. 25 B).

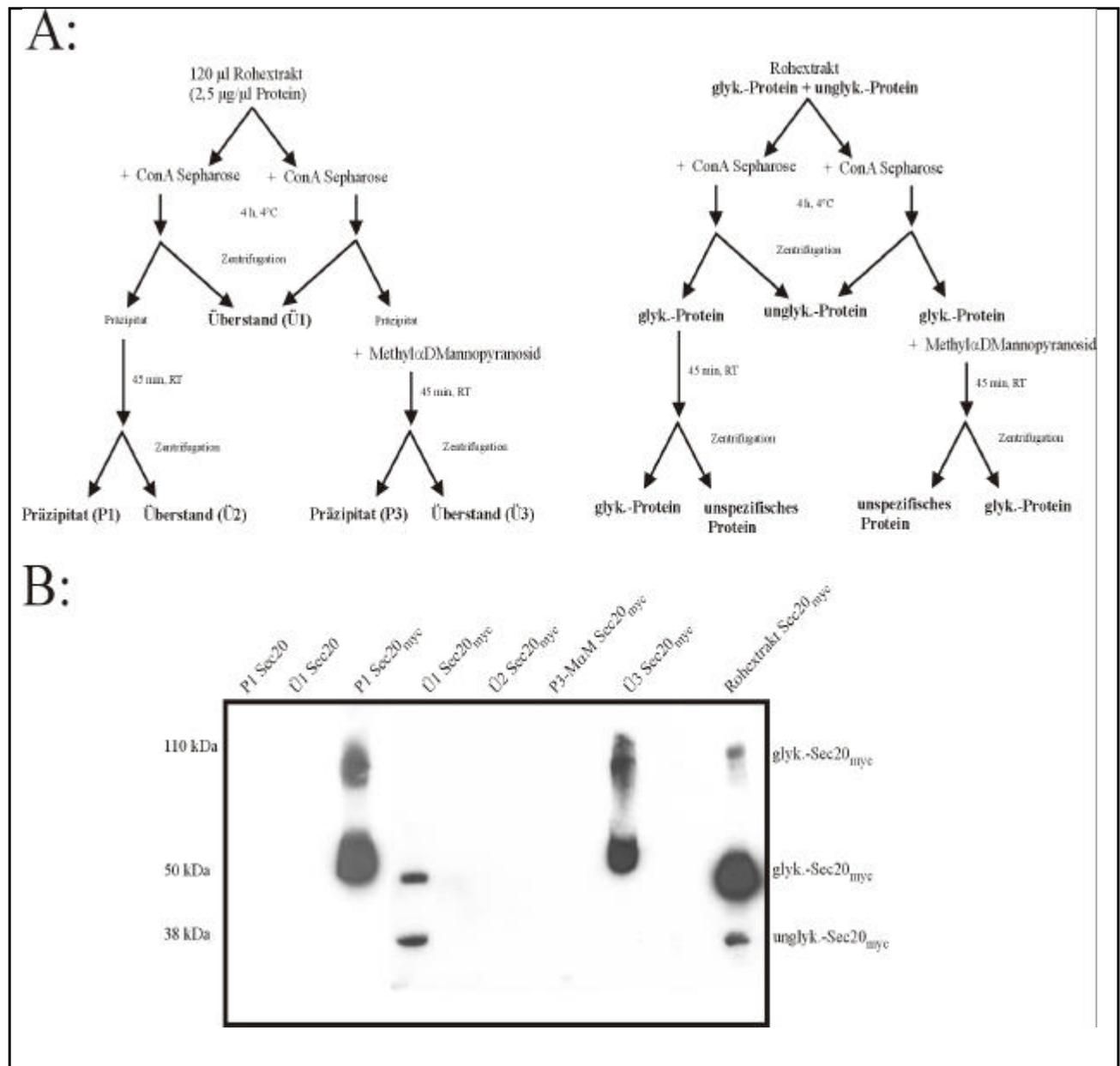


Abb. 25: Bindung des Sec20-Proteins an Concanavalin A. A (linker Teil): Flußschema zur Versuchsdurchführung der Sec20p-Bindung an ConA. Zweimal 150 µg Protein wurden für vier Stunden mit ConA Sepharose inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ü1 bezeichnet. Eines der Präzipitate aus den Parallelansätzen wurde mit Methyl- α -D-Mannopyranosid versetzt und beide Ansätze gleich weiter behandelt. Nach 45 min Inkubation und anschließender Zentrifugation wurden das Präzipitat und der Überstand aus dem Ansatz mit Methyl- α -D-Mannopyranosid als P3 und Ü3 bezeichnet, aus dem Ansatz ohne Methyl- α -D-Mannopyranosid als P1 und Ü2. A (rechter Teil): Flußschema zur Verteilung der glykosylierten und unglykosylierten Proteine im Versuchsverlauf. Entsprechend der links gezeigten Versuchsdurchführung ist rechts angegeben, in welcher Fraktion sich glykosyliertes (glyk.) bzw. unglykosyliertes (unglyk.) Protein befindet. B: SDS-PAGE zum Nachweis der Sec20p Bindung an ConA. Es wird die in A beschriebenen Fraktionen der ConA Bindung auf ein 10 %iges SDS-Gelel aufgetragen. Dabei handelte es sich jeweils um 30 µg Protein, entsprechend 10 µl P1 und P3 und 60 µl Ü1, Ü2 und Ü3. Der Nachweis erfolgte mit Maus-anti-c-myc Primärantikörpern und anti-Maus-Bc1p Sekundärantikörpern mittels eines Chemilumineszenz Essays; Spur 1 und Spur 2: Kontrolle, P1 einer CAI4-Transformante mit Kontrollvektor pYW7 (*SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors); Spur 3 bis Spur 7: CAI4-Transformante mit pYW69 (*SEC20_{c-myc}* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors); Spur 8: Rohextrakt einer CAI4-Transformante mit pYW69.

Es wird deutlich, daß der Großteil des Sec20-Proteins an ConA bindet (Abb. 25; Spur P1). Sowohl das 110 kDa-Protein als auch das 50 kDa-Protein werden gebunden, allerdings nicht das 38 kDa-Protein. Die Bindung der Proteine an ConA wurde durch die Zugabe von Methyl- α D-Mannopyranosid aufgehoben, wie bei einem Vergleich von den Spuren P1 und P3 zu erkennen ist. Die vorher gebundenen Proteine finden sich nun im Überstand (Ü3).

Das Protein mit einer Größe von 38 kDa scheint nicht glykosyliert zu sein und es bindet daher nicht an ConA, wie man bei einem Vergleich von der Spur P1 und Ü1 sehen kann. Dies war zu erwarten, da 38 kDa die Größe des unglykosylierten Sec20-Proteins ist. Auch das 50 kDa große Protein ist in Ü1 noch zu detektieren, was darauf zurückgeführt werden kann, daß die Menge der eingesetzten ConA-Sepharose nicht ausreichend, für eine quantitative Fällung, war.

3.11.2 Untersuchung von Sec20p auf potentielle N-Glykosylierung

Nachdem gezeigt werden konnte, daß es sich bei Sec20p um ein glykosyliertes Protein handelt, sollte ermittelt werden, um welche Art von Glykosylierung es sich handelt. Es ist bekannt, daß durch die Behandlung von Glykoproteinen mit dem Enzym PNGase N-glykosidisch gebundene Zucker entfernt werden können (Tarentino *et al.*, 1985). Rohextrakte von Sec20p_{c-myc} überproduzierenden Transformanten wurden einer PNGase-Behandlung unterzogen. Diese Enzymbehandlung hatte keinen Einfluss auf das Laufverhalten der Proteine im SDS-PAGE. Als Kontrolle wurde die N-glykosylierte Invertase von *S. cerevisiae* der gleichen Enzymbehandlung unterzogen. Hierbei konnte eine deutlich erhöhte Laufgeschwindigkeit der Invertase nach Behandlung mit PNGaseF im SDS-PAGE detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Es ist also wahrscheinlich, daß das Glykoprotein Sec20p nicht durch eine N-Glykosylierung, sondern durch eine O-Glykosylierung posttranslational modifiziert wird. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der vorhergesagten Orientierung des Sec20p in der ER-Membran überein (http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_from.html). Die potentielle N-Glykosylierungsstelle läge demnach im Zytoplasma, wohingegen sich die O-Glykosylierungsstellen im ER-Lumen befinden und damit zugänglich für die im ER lokalisierten Protein-Mannosyltransferasen (Pmt) zur O-Glykosylierung sind.

3.11.3 Das Sec20p in *Dpmt*-Mutanten

Die *PMT*-Genfamilie ist maßgeblich an der O-Glykosylierung in *C. albicans* beteiligt. Es sind bisher fünf *PMT* Gene identifiziert worden (S. Prill, persönliche Mitteilung). Drei dieser Gene sind in *C. albicans* disruptiert worden, so daß drei unterschiedliche *pmt*-Mutanten zur Verfügung standen. Dabei handelt es sich um die Stämme $\Delta pmt1$, $\Delta pmt4$ und $\Delta pmt6$ (Timpel *et al.*, 1998, Timpel *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, welches der Pmt-Proteine für die Glykosylierung von CaSec20p verantwortlich ist, wurde Sec20p_{c-myc} in den drei Disruptionsstämmen exprimiert.

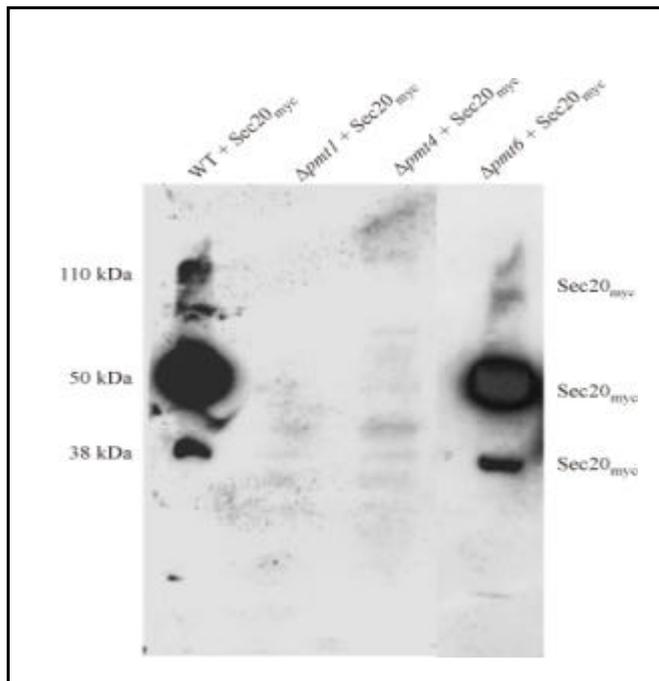


Abb. 26: Einfluß von Δpmt -Mutanten auf das Laufverhalten von Sec20p. Es wurden Rohextrakte der verschiedenen *C. albicans*-Stämme hergestellt, die in induzierendem SCAA-Medium angezogen wurden. Bei den Stämmen handelt es sich um $\Delta pmt1$ -, $\Delta pmt4$ - oder $\Delta pmt6$ -Mutanten, die mit pYW69 ($SEC20_{c-myc}$ unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors) transformiert wurden. Es sind je 5 μ l Rohextrakt entsprechend einer Gesamtproteinmenge von 30 μ g aufgetragen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit Maus-anti-c-myc (Primärantikörper, 1:1000 verdünnt) und anti-Maus-BcIp (Sekundärantikörper, 1:5000 verdünnt).

Nach Transformation der $\Delta pmt1$ -, $\Delta pmt4$ - und $\Delta pmt6$ -Stämme mit dem Plasmid pYW69 ($SEC20_{myc}$ unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors; siehe 2.6.4) wurden Rohextrakte von mindestens zehn Transformanten je Stamm hergestellt. Diese Rohextrakte wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und Sec20_{p-c-myc} mit einem Maus-anti-c-myc Antikörper detektiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt.

Es wird deutlich, daß in *pmt1*- oder *pmt4*-disruptierten Stämmen kein Sec20_{p-c-myc} zu detektieren ist (Abb. 26). Durch die Bestimmung des Proteingehalts der Rohextrakte wurde sichergestellt, daß der Aufschluß der Zellen und die Proteinextraktion bei allen Transformanten in gleichem Maße erfolgte. Es kann daher geschlossen werden, daß die *SEC20*-Expression in *pmt1*- und *pmt4*-disruptierten Stämmen beeinträchtigt ist oder das Protein schneller degradiert wird. Wie Spur 4 (Abb. 26) zeigt, hat die Disruption von *pmt6* keinen Einfluß auf die Expression von Sec20p. Das Laufverhalten sowie die Proteinmenge sind mit der Expression von Sec20p im Wildtyp zu vergleichen (siehe Spur 1 und Spur 4). Interessanterweise ist in den *pmt1*- und *pmt4*-disruptierten Stämmen auch kein unglykosyliertes Protein zu detektieren. Auch wenn die glykosylierte 50 kDa-Form von Sec20_{myc} nicht zu detektieren ist, sollte die Menge der 38 kDa-Form unverändert sein. Im Western-Blot konnte dies nicht bestätigt werden.

Auch die Doppeldeletionsstämme (*pmt1/pmt6* und *pmt4/pmt6*) wurden mit pYW69 transformiert. Bei Transformanten dieser Stämme konnte wie in den *pmt1* und *pmt4*-Stämmen, kein Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.11.4 Stabilität von Sec20p

3.11.4.1 Pulse-Chase-Experimente mit Sec20p

Da in $\Delta pmt1$ - und $\Delta pmt4$ -Mutanten Sec20p nicht detektiert werden konnte, sollte geprüft werden, ob Sec20p in diesen Stämmen instabil ist.

Für Untersuchungen zur Stabilität sowie zur auftretenden posttranslationalen Modifikation von Sec20p wurden Pulse-Chase-Experimente durchgeführt. Zunächst wurde im *C. albicans* Stamm CAI4 Sec20p_{c-myc} unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors überproduziert. Die Zellen wurden über Nacht in induzierendem Na-Lactat-Medium angezogen und dann 15 Minuten bzw. 45 Minuten mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert („pulse“). Nach Zugabe eines Überschusses an nicht-radioaktivem Methionin („chase“) wurden in halbstündigen Abständen Proben entnommen und durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie auf die Anwesenheit von Sec20p_{c-myc} hin untersucht.

Wie Abb. 27 verdeutlicht werden zwei unterschiedlich große Varianten von Sec20p präzipitiert. Es handelt sich um die 38 kDa-große Form (unglyk.-Sec20p_{c-myc}), die der errechneten Molekularmasse entspricht, und die glykosylierte 50 kDa-große Form von Sec20p (glyk.-Sec20p_{c-myc}) (Abb. 25). Zum Zeitpunkt 0, d. h. direkt nach Beendigung des „Pulse“, ist sowohl die unglykosylierte als auch die glykosylierte Form vorhanden. Nach 30 Minuten allerdings hat die Menge der unglykosylierten Form stark abgenommen, wohingegen die Menge der glykosylierten Form zugenommen hat. Dies wird noch deutlicher nach 60 Minuten; dann ist kaum noch unglykosylierte Form detektierbar. Man kann also folgern, daß in den 30 bzw. 60 Minuten die Glykosylierung der radioaktiv markierten unglykosylierten Form stattgefunden hat (vergleiche Tabelle 12). Als Kontrolle diente in diesem Versuch der *C. albicans* Stamm mit Sec20p (ohne c-myc-Epitop) unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors (Abb. 27, letzte Spur).

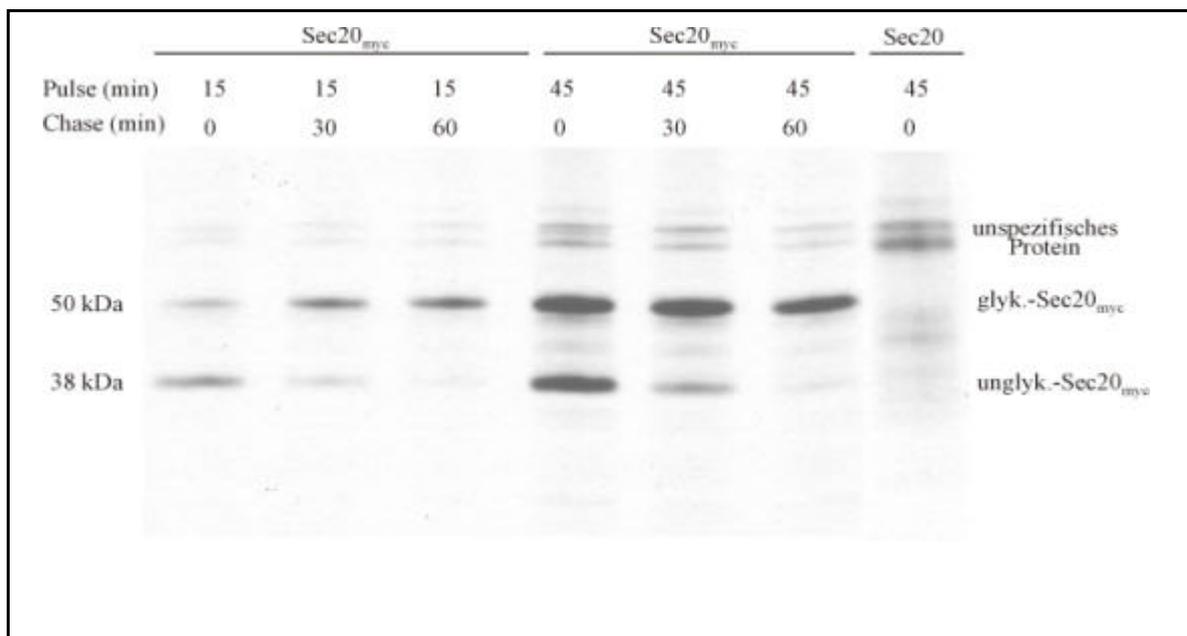


Abb. 27: Pulse-Chase-Messung von Sec20p. Der WT Stamm CAI4 wurde mit dem Plasmid pYW69 (*PCK1p-SEC20_{c-myc}*) bzw. mit pYW7 (*PCK1p-SEC20*) transformiert. Die Halbwertszeit von Sec20_{myc} wurde mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Die Zellen wurden 20 min mit [³⁵S]-Trans-Label markiert, nach Zugabe eines Überschusses nicht markiertem Methionins/Cysteins wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Sec20-Menge entnommen. Der spezifische Nachweis erfolgte durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 12 angegeben.

Auch die in Tabelle 12 angegebene densitometrische Auswertung macht deutlich, daß es nicht zu einem Abbau der unglykosylierten Form von Sec20p kommt, sondern eine Verschiebung zur glykosylierten Form stattfindet. Es konnte außerdem errechnet werden, daß die Halbwertszeit der glykosylierten Form mit über 120 Minuten sehr hoch ist. Man kann also davon ausgehen, daß Sec20p in seiner 38 kDa unglykosylierten Form zunächst gebildet wird und nach der O-Glykosylierung in einer stabileren 50 kDa Form in der Zelle vorliegt.

Tabelle 12: Densitometrisch quantifizierte Signalstärken der Autoradiographie aus Abb. 27. Durch die Quantifizierung unspezifischer Signale wurden die Abweichungen im Zellaufschluß und der Immunpräzipitation in die angegebenen Werte eingerechnet.

Pulse (min)	15	15	15	45	45	45
Chase (min)	0	30	60	0	30	60
Gesamtmenge (%)	100	96	91	100	86	71
glykosylierte Form (%)	43	60	63	56	60	53
unglykosylierte Form (%)	57	36	28	44	26	18

3.11.4.2 Stabilität von Sec20p in Glykosylierungsmutanten

Da, wie oben beschrieben (Abb. 26), in den Glykosylierungsmutanten $\Delta pmt1$ und $\Delta pmt4$ kein Sec20p detektiert werden konnte, sollte die Abhängigkeit der Sec20-Protein Stabilität von seinem Glykosylierungsstatus mit Pulse-Chase-Experimenten untersucht werden.

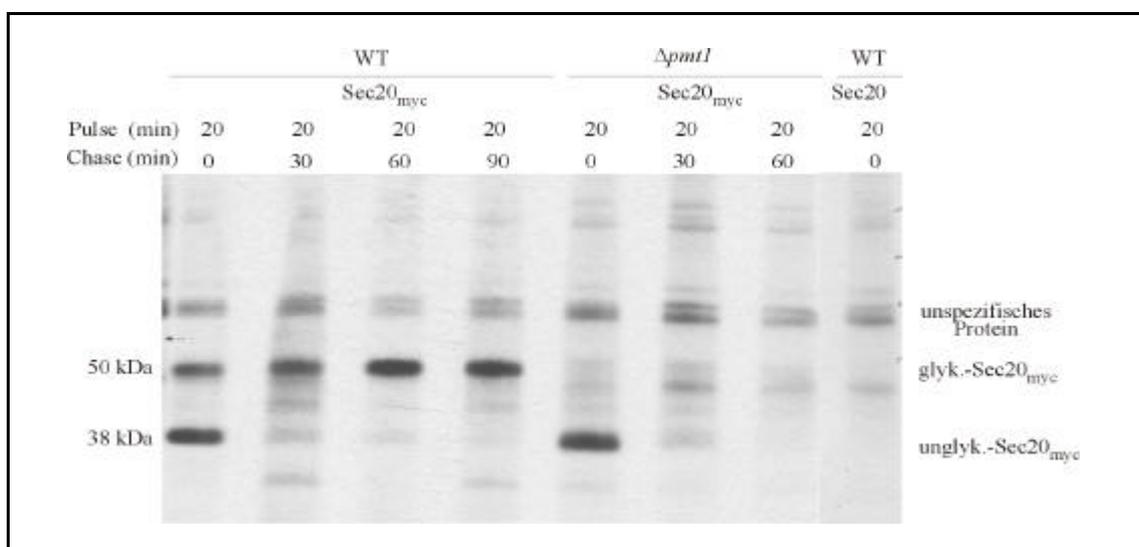


Abb. 28: Stabilität Sec20p in *pmt1*-Mutanten. Der WT Stamm CAI4 sowie der *pmt1*-Deletionsstamm wurden mit dem Plasmid, pYW69 (*PCK1p-SEC20_{c-myc}*), bzw. mit pYW7 (*PCK1p-SEC20*) transformiert. Die Halbwertszeit von Sec20p_{c-myc} wurde mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Die Zellen wurden 20 min mit [³⁵S]-Trans-Label markiert, nach Zugabe eines Überschusses von nicht markiertem Methionin/Cystein wurden in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Sec20p-Menge entnommen. Der spezifische Nachweis erfolgte durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie.

Im *C. albicans* Wildtyp-Stamm CAI4 sowie im Δ *pmt1*-Stamm wurde Sec20p_{c-myc} unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors überproduziert. Die radioaktive Markierung erfolgte über 20 Minuten. Wie in Abb. 28 deutlich zu erkennen ist, konnte in *pmt1*-Mutanten kein glykosyliertes Sec20-Protein präzipitiert werden (Spuren 5-7). Zum Zeitpunkt 0 konnte eine 38 kDa Bande detektiert werden, die in ihrer Stärke der 38 kDa Bande des Wildtyps zum Zeitpunkt 0 entspricht (Abb. 28). Allerdings ist keine 50 kDa Bande zu erkennen. Auch im Verlauf des „chase“, d. h. nach 30 oder 60 Minuten, trat keine 50 kDa Bande auf. Die 38 kDa Bande verschwindet allerdings genauso wie im Wildtyp schon nach 30 Minuten. In dem Fall der *pmt1*-Mutante findet scheinbar keine Stabilisierung durch Glykosylierung statt, sondern vielmehr ein Abbau des Proteins.

Die Abb. 28 zeigt im Wildtyp wieder die unterschiedlich großen Varianten von Sec20p (vergleiche Abb. 27). Die Glykosylierung der 38 kDa Form fand in den ersten 30 Minuten des „chase“ statt. Wie in Spur 2 deutlich zu sehen, traten unterschiedlich stark glykosylierte Formen als „Schmier“ von 38 kDa bis 50 kDa auf. Nach 60 Minuten „chase“ konnte nur noch die 50 kDa-Form detektiert werden. Es ist deutlich, daß hier die Modifikation abgeschlossen ist. Wie die Spur 4 zeigt, ist auch nach 90 Minuten „chase“ die Proteinmenge gleichgeblieben. Hier wird deutlich, daß glykosyliertes Sec20-Protein vergleichsweise stabiler als unglykosyliertes ist.

3.11.5 Mutationen in potentiellen Glykosylierungsstellen von Sec20p

Zur Untersuchung der Glykosylierung des Sec20-Proteins wurden einige potentielle Glykosylierungsstellen des Proteins mutiert. Die als *N*-Glykosylierungsstelle vorhergesagte NKS-Aminosäuresequenz im zytosolischen Teil des Proteins sowie 7 Serin/Threonin Sequenzen (möglicher Ort der *O*-Glykosylierung) im luminalen Teil des Proteins wurden im pYW69 Vektor (*PCK1p-SEC20_{c-myc}*) mutiert. Die in Abb. 29 angegebenen Aminosäuren wurden jeweils durch ein Alanin ersetzt (pYW96 S267A; pYW98 SAS271AAA; pYW94 SS278AA; pYW92 TT284AA; pYW97 TKT293AKA; pYW95 TLS299ALS; pYW93 TTSS321AAAA). Für den Immunoblot wurden die CAI4-Transformanten, die die Vektoren mit den verschiedenen Mutationen enthalten, in *PCK1*-Promotor-induzierendem Medium (SCAA) angezogen. Anschließend wurden Rohextrakte hergestellt (siehe 2.8.2).

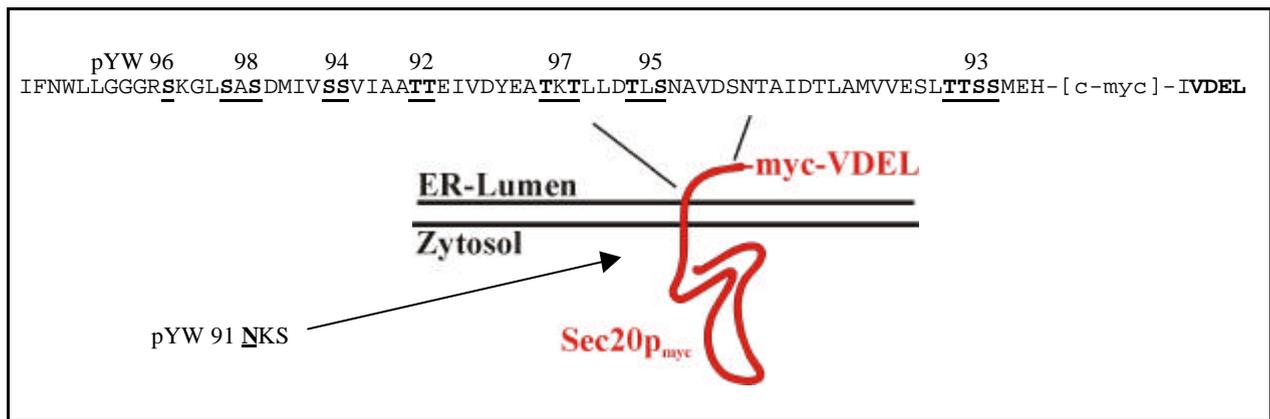


Abb. 29: Schematische Darstellung der durchgeführten Mutagenesen in Sec20p_{c-myc}. Die im ER-Lumen befindlichen potentiellen *O*-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen dargestellt. Die angegebenen Serine oder Threonine wurden durch Alanin ersetzt. Darüber ist jeweils der Name der mutagenisierten Plasmide angegeben. Die im Zytosol befindliche potentielle *N*-Glykosylierungsstelle wurde auch mutagenisiert, d. h. Asparagin wurde gegen Alanin ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid mit pYW91 bezeichnet.

Wie aus der Abb. 30 zu erkennen, variieren einige der mutierten Sec20-Proteine leicht in ihrer Größe. Allerdings zeigen das mutierte Sec20p_{c-myc} von pYW91 (potentielle *N*-Glykosylierungsstelle) das gleiche Laufverhalten im SDS-PAGE wie das Wildtyp-Protein (Abb. 30, Spur 1 und 2). Dies bestätigt das vorherige Ergebnis, daß Sec20p nicht *N*-glykosyliert ist, da diese Sequenz die einzige mögliche *N*-Glykosylierungsstelle des Proteins darstellt. Alle anderen Muteine (pYW92, 94, 95, 97 und 98, siehe Abb. 29) scheinen bis auf pYW96 etwas kleiner als das Wildtyp-Protein zu sein.

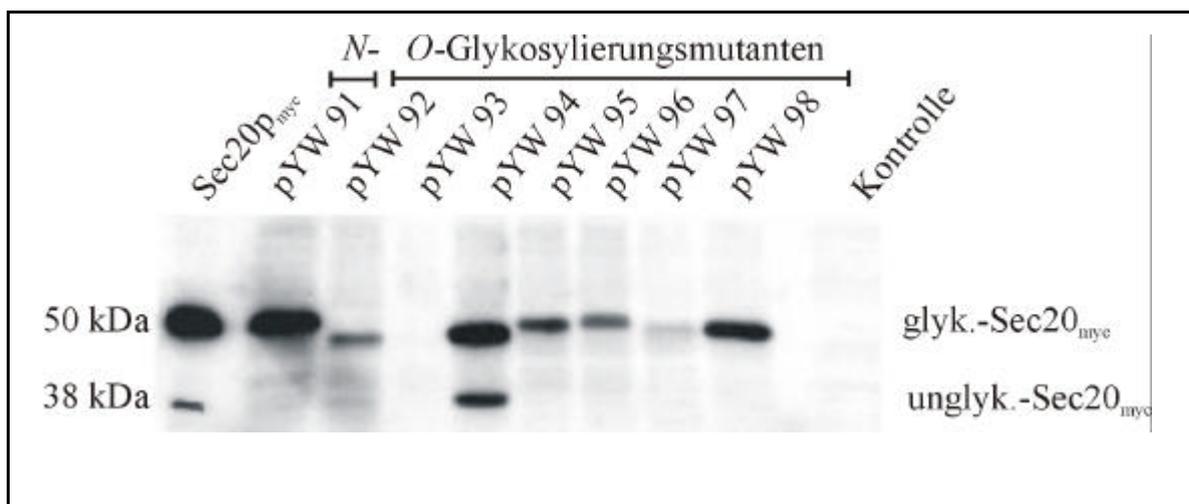


Abb. 30: Glykosylierungsmutanten des Sec20-Proteins. Nachweis des Proteins mit Maus-anti-c-myc, anti-Maus-Bc1p und mit einem Chemilumineszenz Essay. Wildtyp *C. albicans* wurde mit Plasmiden mit den unterschiedlichen Mutationen transformiert. Spur 1: CAI4-Transformante mit nicht mutiertem Sec20p_{c-myc}; Spur 2-9: CAI4-Transformanten mit Plasmiden mit den oben angegebenen Mutationen in Sec20p_{c-myc}; Kontrolle: CAI4-Transformante mit Kontrollvektor pYW7 (*SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors). Es sind jeweils 20 µg Protein aufgetragen worden.

Die Größenunterschiede der einzelnen Proteine sind allerdings gering (ca. 2 kDa) und keines der Muteine hat die Größe des unglykosylierten Sec20p_{c-myc} (Abb. 30, Spur 1). Erstaunlicher Weise konnte nur im Wildtyp Sec20p und in der pYW94-Mutation die 38 kDa-unglykosylierte Form detektiert werden. Die detektierte Sec20-Proteinmenge in der pYW97-Mutante ist im Vergleich zu den anderen Mutanten sehr gering. In Transformanten, die den pYW93 Vektor enthalten konnte ebenfalls kein Protein nachgewiesen werden, auch nicht in Untersuchungen von zehn verschiedenen Transformanten. Dies kann, ähnlich wie bei der Expression von Sec20p in *pmt*-Mutanten, durch gestörte Glykosylierung und Instabilität des Proteins erklärt werden. Allerdings könnte die Mutation auch die Expression des Proteins verhindern oder durch eine Konformationsänderung des Proteins die Detektion mit dem c-myc-Antikörpern verhindern. Wie aus Abb. 29 ersichtlich, handelt es sich bei der pYW93-Mutation um die am weitesten C-terminal, direkt vor dem c-myc-Epitop gelegene Mutation.

3.12 Lokalisation von Sec20p

Zur Überprüfung der Lokalisation des Sec20-Proteins in *C. albicans*-Zellen wurde eine indirekte Sec20p-Immunfluoreszenz durchgeführt.

In *S. cerevisiae* stellt sich das Endoplasmatische Reticulum im Fluoreszenzmikroskop als Struktur im perinukleären Bereich dar, von dem filamentöse Strukturen in das Zytoplasma auslaufen (Novick *et al.*, 1980; Rose *et al.*, 1989; Kaiser *et al.*, 1997). Durch einen Vergleich mit der Kernfärbung kann das ER in der Immunfluoreszenz leicht nachgewiesen werden.

Für die Immunfluoreszenz-Analyse der Sec20p-Lokalisation wurde das Plasmid pYW69 (*PCK1p-SEC20_{c-myc}*) eingesetzt. Es kodiert Sec20p mit einem internen c-myc-Epitop direkt N-terminal des potentiellen ER-Retentionssignals VDEL. Die *SEC20*-Expression wurde durch den vorgeschalteten *PCK1*-Promotor reguliert.

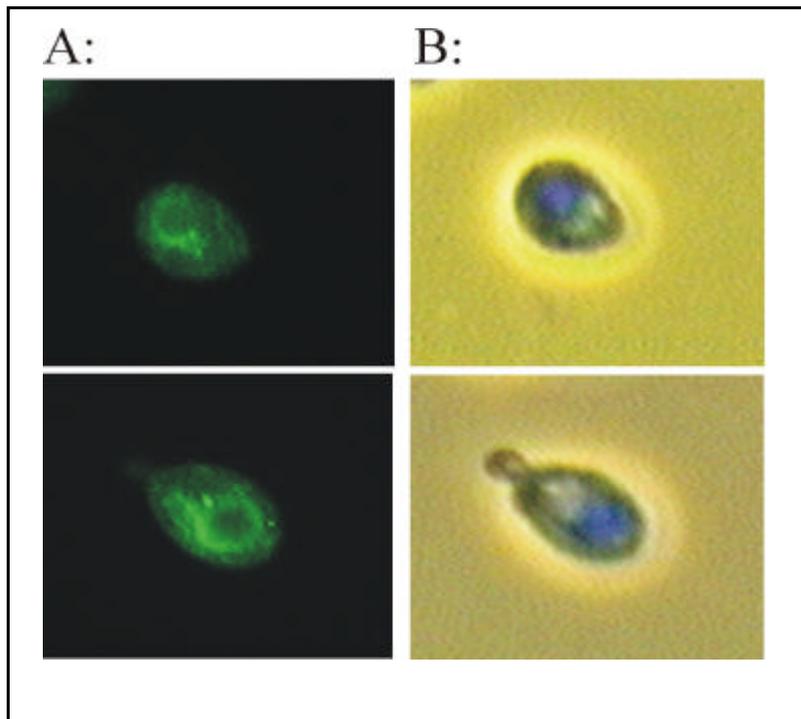


Abb. 31: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Sec20p. Der *C. albicans*-Stamm, CAI4, wurde mit dem Plasmid pYW69 (*PCK1p-SEC20_c-myc*) transformiert und über Nacht bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden für vier Stunden mit Formaldehyd fixiert und anschließend auf mit Lysin beschichteten Objektträgern immobilisiert. A: Färbung der Zellen mit einem Primärantikörper (anti-c-myc-Antikörper) und einem Sekundärantikörper (FITC-gekoppelter anti-Maus-Antikörper). B: Färbung der Zellen mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Die Zellen wurden in SCAA-Medium angezogen, in dem der *PCK1*-Promotor stark induziert wird. Die erhöhte Expressionsrate in diesem Medium erwies sich als notwendig, um ein deutliches Signal zu erhalten. Nach Fixierung der Zellen in Formaldehyd und Immobilisierung auf einem mit Lysin beschichteten Objektträger wurde ein anti-c-myc-Antikörper als Primärantikörper verwendet. Als Sekundärantikörper diente FITC-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (Abb. 31A). Die Zellen wurden zusätzlich mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) behandelt, was zur Färbung des Zellkerns führt (Abb. 31B).

Die Zellen zeigten eine deutliche perinukleäre Färbung mit Ausläufern in das Zytoplasma (Abb. 31A). Bei diesen Strukturen handelt es sich sehr wahrscheinlich um das Endoplasmatische Retikulum der Zellen.

3.13 Analyse der Löslichkeit von Sec20p

Computeranalysen ergaben, daß es sich bei CaSec20p um ein potentielles integrales Membranprotein handelt (http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_from.html). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine Behandlung mit verschiedenen Puffern und Detergenzien angewendet. *C. albicans* Zellen, die Sec20p_{c-myc} überproduzieren, wurden lysiert und die erhaltenen Sphäroplasten bei -70°C gelagert. Nach dem schnellen Auftauen wurden sie mit verschiedenen Puffern behandelt, von denen bekannt ist, daß sie zytosolische sowie periphere Membranproteine lösen, allerdings integrale Membranproteine nicht beeinflussen (Fujiki *et al.*, 1982).

Weder Lysis-Puffer, Natriumcarbonat (0,5 M, pH 11,5), Natriumchlorid (1 M) oder Harnstoff (5 M) hatten Einfluß auf die Löslichkeit von Sec20p. Durch die Zugabe von Triton-X-100 (1 %) ist es jedoch möglich, das Protein in die lösliche Fraktion zu überführen. Nach Zentrifugation (100000 g, 30 min) und Fällung der Proteine des Überstands mit 10 % TCA wurde jeweils das Pellet der Ultrazentrifugation und der Fällung des Überstands auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Nach Western-Blot und Detektion mit einem myc-Antikörper sind die Ergebnisse in Abb. 32 zu sehen. Nur durch die Behandlung mit Triton-X-100 war es möglich, das Protein aus der Membran zu lösen und dadurch die Verschiebung vom Pellet in den Überstand der Ultrazentrifugation zu erreichen. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich tatsächlich um ein integrales Membranprotein handelt.

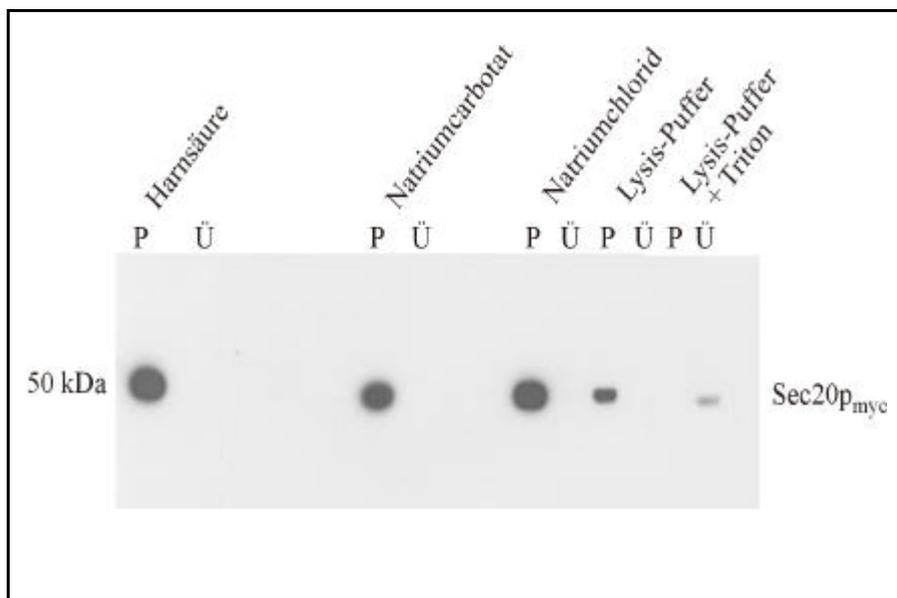


Abb. 32: Analyse der Löslichkeit von Sec20p. Zellen, die CaSec20p überproduzieren, wurden nach der Sphäroplastierung mit unterschiedlichen Puffern behandelt. Nach Zentrifugation wurden Membranfraktion und Überstand getrennt. P: Membranfraktion; Ü: gefällte Überstände der entsprechenden Membranfraktion. Nach SDS-PAGE wurde das Protein auf dem Western-Blot mit c-myc-Antikörpern detektiert.

3.14 Interaktionspartner von Sec20p

Bestimmte Strukturmerkmale von CaSec20p (siehe Seite 45; Abb. 10) sind auch in *S. cerevisiae* Sec20p zu finden. Außerdem deuten die bisherigen Ergebnisse darauf hin, daß CaSec20p, da es ähnlich zu dem ScSec20p ist, mit anderen Proteinen des Sekretionsweges interagiert. Aus *S. cerevisiae* sind zwei sichere Interaktionspartner von Sec20p bekannt, dabei handelt es sich um Ufe1p (Lewis und Pelham, 1996) und Tip20p (Sweet und Pelham, 1993). Eventuell auch in *C. albicans* vorhandene Homologe könnten auf eine vergleichbare Funktion von Sec20p in den beiden Hefen hindeuten. Durch eine Computeranalyse konnten Homologe zu diesen *S. cerevisiae* Proteinen in *C. albicans*, ermittelt werden. Sie wurden daher als CaUfe1p und CaTip20p bezeichnet.

3.14.1 Isolierung und Klonierung von *UFE1*

Zur weiteren Analyse der Funktion von Sec20p im Sekretionsweg von *C. albicans* wurde eine Datenbank-Suche nach Homologen des aus *S. cerevisiae* bekannten Interaktionspartners von Sec20p, ScUfe1p, durchgeführt. Das ScUfe1p Protein ist verwandt mit der Syntaxinfamilie der t-SNAREs und ein Vergleich mit anderen *sec*-Mutanten zeigte, daß Ufe1p genauso wie Sec20p und Sec21p (γ -COP) am retrograden (Golgi-ER) und nur indirekt am anterograden Transport beteiligt ist (Lewis und Pelham, 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Ufe1p in *S. cerevisiae* mit Sec20p interagiert, und daß an dieser für die Zelle essentieller Interaktion die Transmembrandomänen der beiden Proteine beteiligt sind (Lewis *et al.*, 1997). Insbesondere gibt es eine Interaktion zwischen zwei positiv bzw. negativ geladenen Aminosäure (Abb. 33) direkt C-terminal von der Transmembrandomäne im ER-luminalen Teil beider Proteine. Durch gezielte Sequenzvergleiche war es möglich, in der Datenbank des *C. albicans* Sequenzierungsprojektes (<http://candida.stanford.edu/>) ein *C. albicans*-Homolog zu *ScUFE1* zu identifizieren. Im „*S. pombe*-Sequenzierungsprojekt“ (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe) gibt es eine Gensequenz (T41642), die für ein homologes Protein mit 22 % Identität zu dem CaTip20p kodiert. Dies läßt auf ein weiteres Tip20p-Homolog unter den Hefen schließen.

Die Identität der Aminosäuresequenz zwischen ScUfe1p und CaUfe1p beträgt 30 %. Mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide wurde *CaUFE1* aus genomischer DNA des Wildtyp-Stammes CAI4 amplifiziert und in den Vektor pUC18 kloniert. Der resultierende Vektor wurde mit pYW30 bezeichnet und von beiden Seiten ansequenziert. Da die amplifizierte Sequenz fast hundertprozentig identisch zu der Sequenz in der Datenbank war, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich um *CaUFE1* handelt. Das *CaUFE1*-Gen umfaßt 918 Nukleotide, die für 306 Aminosäuren kodieren, was einer theoretischen Molekularmasse von 34 kDa entspricht. Das CaUfe1-Protein ist wahrscheinlich ein Membranprotein mit einer Transmembrandomäne zwischen Aminosäure 286 und 302 (http://ulrec.unil.ch/software/TMPRED_from.html). Die C-terminal der TMD folgenden vier Aminosäuren sind im ER Lumen lokalisiert, der N-terminale Bereich ist zytosolisch. Wie in Abb. 33 verdeutlicht, ist auch in *C. albicans* Ufe1p und Sec20p ein positiv/negativ geladenes Aminosäurepaar direkt hinter der Transmembrandomäne vorhanden.

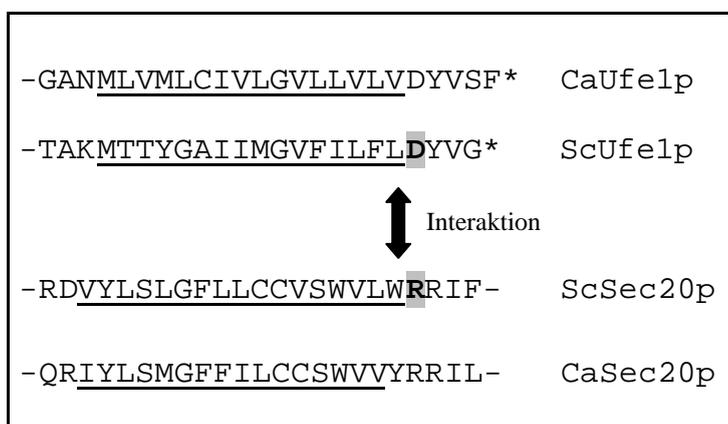


Abb. 33: Sequenzvergleiche der Interaktionspartner Sec20p und Ufe1p. Sequenzbereich um die Transmembrandomänen von ScUfe1p und ScSec20p sowie von CaUfe1p und CaSec20p sind gezeigt. Aminosäure 324-347 von ScUfe1p, Aminosäure 283-306 von CaUfe1p, Aminosäure 275-297 von ScSec20p und Aminosäure 229-251 von CaSec20p mit unterstrichenen TMD sind gezeigt. Fett gedruckt sind die aus *S. cerevisiae* bekannten, interagierenden Aminosäuren. * gibt das Ende der Proteine an.

3.14.2 Analyse der funktionellen Homologie

In Komplementationsversuchen sollte gezeigt werden, daß CaUfe1p das ScUfe1p ersetzen kann. Für Komplementationstests wurde der temperatursensitive *S. cerevisiae*-Stamm *ufe1-1* (auch als MYL101 bezeichnet, Lewis und Pelham, 1996), mit dem Hefvektor pYW33 transformiert. Dieser enthält das *CaUFE1*-Gen unter der Kontrolle des *PFK2*-Promotors (konstitutiver Promotor) auf einem *CEN*-Vektor. Als Negativkontrolle wurde der „leere“ *CEN*-Vektor (pJH461) transformiert.

Die Transformanten wurden bei 25°C in selektivem Medium angezogen und anschließend gleiche Zellzahlen in 5 ml Vollmedium (YPD) gegeben und bei 37°C inkubiert. Schon nach einem Tag Inkubation wurde deutlich, daß das *C. albicans UFE1*-Gen in der Lage ist, die temperatursensitive *S. cerevisiae* Mutante zu komplementieren (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 34 zu sehen, ist auch auf YPD-Platten eine Komplementation des *S. cerevisiae UFE1*-Gen möglich, allerdings war hier eine Inkubationszeit von mindestens fünf Tagen notwendig. Es konnte also gezeigt werden, daß CaUfe1p das *S. cerevisiae* ersetzen kann, und dadurch wurde die Hypothese einer Interaktion der Proteine auch in *C. albicans* nahegelegt.



Abb. 34: Komplementation der temperatursensitiven *S. cerevisiae ufe20-1* Mutante durch CaUfe1p. Der temperatursensitive *S. cerevisiae ufe1-1* Stamm, MLY101, wurde mit dem Vektor pYW33 (*PFK2p-CaUFE1* in einem *CEN*-Vektor, konstitutiver Promotor) transformiert. Die Transformanten wurden bei 25°C, in selektivem Medium über Nacht angezogen und anschließend gleiche Zellzahlen auf YPD-Platten plattiert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C bzw. bei 37°C.

3.14.3 Isolierung und Klonierung von *TIP20*

Aus *S. cerevisiae* ist ein weiterer Interaktionspartner von ScSec20p bekannt. Das sogenannte Tip20p (Sec Twenty Interacting Protein) ist ein von 701 Aminosäuren kodierte zyttoplasmatisches Protein, welches durch seine Interaktion mit Sec20p an die ER-Membran lokalisiert wird. Durch gezielte Sequenzvergleiche war es möglich, in *C. albicans* Datenbanken des Sequenzierungsprojektes (<http://candida.stanford.edu/>) ein Gen zu identifizieren, das ein homologes Protein zu ScTip20p kodiert. Die Identität zum ScTip20-Protein beträgt 19 %. Im „*S. pombe*-Sequenzierungsprojekt“ (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe) gibt es eine Gensequenz (pi034), die für ein homologes Protein mit 21 % Identität zu dem CaTip20p kodiert. Durch synthetische Oligonukleotide wurde *CaTIP20* aus genomischer DNA des Wildtyp-

Stammes CAI4 amplifiziert und in den Vektor pUC18 kloniert. Das resultierende Plasmid pYW80 wurde vom 3'- und 5'-Ende ansequenziert. Die erhaltene Sequenz stimmte zu fast 100 % mit der Sequenz aus der Datenbank überein. Daher konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem klonierten Fragment um *CaTIP20* handelt. Der offene Leserahmen des *TIP20*-Genes umfaßt 2352 Nukleotide, welche 784 Aminosäuren kodieren; dies entspricht einer theoretischen Molekülmasse von 87 kDa. Sequenzanalysen ergaben, daß *CaTIP20* weder eine potentielle Transmembranregion noch ein Signalpeptid aufweist, so daß CaTip20p wahrscheinlich ein zytoplasmatisches Protein ist, vergleichbar mit ScTip20p.

Der CAI (Kodon Adaptation Index) ist ein Hilfsmittel, um Aussagen über die Konzentration der mRNA und damit auch über die Proteinhäufigkeit von bestimmten Protein in der Zelle machen zu können (Coghlan und Wolfe, 2000). Der Index setzt die Häufigkeit der unterschiedlichen Kodons aus schon bekannten, stark bzw. weniger stark exprimierten Proteinen als Vergleichswerte an (Sharp und Li, 1987). Der CAI variiert zwischen 0 und 1, wobei ein CAI von 1 bedeuten würde, daß ausschließlich bevorzugte Kodons im Gen vorkommen wogegen ein CAI von 0 bedeuten würde, daß keine bevorzugten Kodons im Gen vorkommen (Sharp und Li, 1987). Der CAI für das *TIP20*-Gen beträgt 0,17 und ist dem CAI für das *SEC20*-Gen mit 0,19 sehr ähnlich (<http://alces.med.umn.edu/bin.webcuse>). Dies läßt darauf schließen, daß auch Tip20p relativ schwach exprimiert wird, wie für Sec20p schon gezeigt wurde (vergleiche 3.4.2).

3.14.4 Funktionsanalyse von CaTip20p

Durch Komplementationsversuche sollte gezeigt werden, ob CaTip20p das ScTip20p in *S. cerevisiae* ersetzen kann. Der *S. cerevisiae* Stamm PC137, mit dem temperatursensitive *tip20-5* Allel (Cosson *et al.*, 1997) wurde mit den Hefevektoren pYW103 und pYW104 transformiert. Diese Plasmide enthalten das *CaTIP20*-Gen unter der Kontrolle des *PFK2*-Promotors auf einem *CEN*-Vektor bzw. 2μ -Vektor. Die Transformanten wurden bei 25°C in selektivem Medium angezogen; anschließend wurden gleiche Zellzahlen in 5 ml Vollmedium (YPD) gegeben und bei 37°C inkubiert. Eine Komplementation der temperatursensitiven Mutante war aber nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

3.14.5 Interaktionsanalyse von CaSec20p und CaTip20p

Zur Messung von Interaktionen zwischen Proteinen *in vivo* wurde die von Fields und Song (1989) entwickelte Methode eingesetzt. Bei dem sogenannten ‚Two-Hybrid‘-System gilt die Stärke einer Transkriptionsaktivierung als Maß der Stärke der Interaktion zweier Proteine. Dieses System ist besonders dazu geeignet, schwache oder vorübergehende Wechselwirkungen nachzuweisen (Guarente, 1993). Für den Test zwischen CaTip20p und CaSec20p wurde an die Gal4p-DNA-Bindedomäne oder die Gal4p-Aktivierungsdomäne fusionierte Proteine in *S. cerevisiae* exprimiert. Sie wurden in dem Stamm PJ69-4A auf Interaktion getestet, da dieser die Reporter-Gene *lacZ*, *HIS3* und *ADE3* unter der Kontrolle von Gal4p-abhängigen Promotoren enthält. Es kommt also zu einer interaktionsabhängigen Expression der Reporter-Gene *lacZ*,

HIS3 und *ADE3*. Das Wachstum auf Adenin-freiem Medium, auf Histidin-freiem Medium mit 3-Aminotriazol (1 mM 3-AT) und die Stärke der β -Galaktosidase-Bildung (Blaufärbung) wird bei der „Two-Hybrid“-Analyse als Maß für die Stärke der Interaktion betrachtet. Nur bei Interaktion der an die BD bzw. AD fusionierten Proteine erhalten diese beiden Domänen die räumliche Nähe, die für die Aktivierung der Gal4-abhängigen Promotoren der *lacZ*, *HIS3* und *ADE3*-Gene notwendig ist. Nur bei der Aktivierung der betreffenden Promotoren kann Histidin und Adenin von den an sonsten auxotrophen Stämmen produziert werden. Auch das *lacZ*-Gen, daß die β -Galaktosidase kodiert, steht in dem verwendeten Wirt, unter der Kontrolle eines Gal4-abhängigen Promotors (James *et al.*, 1996).

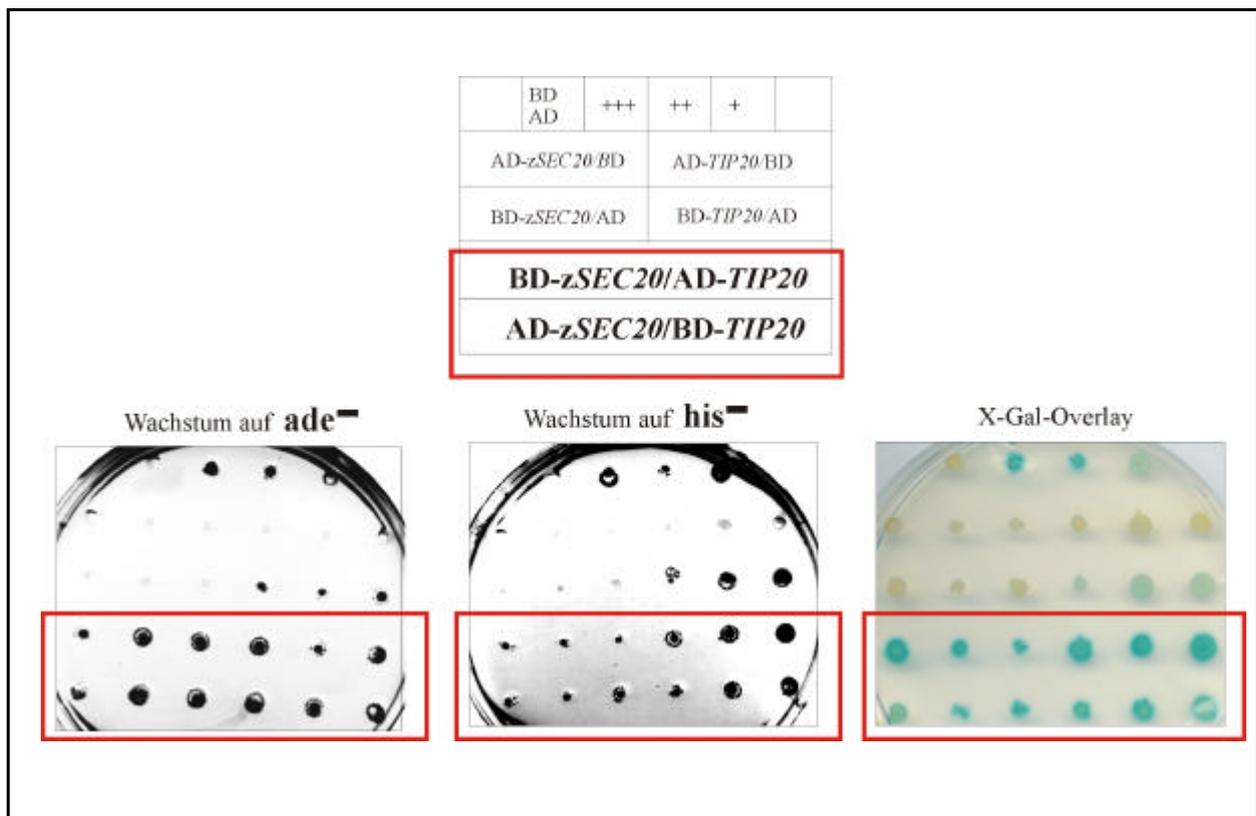


Abb. 35: Test auf Interaktion zwischen CaTip20p und dem zytoplasmatischen Teil von CaSec20p mittels ‚Two-Hybrid‘-Analyse. Der Stamm PJ69-4A wurde mit den Plasmiden pYW19 (BD-Tip20p), pYW29 (AD-Tip20p), pYW24 (BD-zyto-Sec20p) und pYW25 (AD-zyto-Sec20p) transformiert. Entsprechende Transformanten wurden über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen, dann auf $OD_{600} = 0,2$ verdünnt und auf die oben angegebenen Medien überstempelt. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert. Mit einer *leu*⁻ *trp*⁻ - Kontroll-Platte (auf der alle Transformanten wachsen) wurde anschließend der ‚Overlay-Assay‘ durchgeführt und weitere 15 min inkubiert. Der rote Kasten zeigt jeweils die Stämme mit interagierenden Proteinen. Es wurden drei unterschiedlich stark interagierende Positivkontrollen eingesetzt, sowie eine Negativkontrolle, die nur die unfusionierte Gal4p-DNA-Bindedomäne (BD) und die unfusionierte Gal4p-Aktivierungsdomäne (AD) produzieren.

Mit Hilfe dieser Methode wurden die *C. albicans* Proteine Sec20p und Tip20p auf Interaktion getestet. Das gesamte *CaTIP20*-Gen wurde an die Sequenz für die AD (Aktivierungsdomäne) bzw. die BD (Bindedomäne) des Gal4-Regulatorproteines kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pYW19 und pYW29 bezeichnet (siehe Tabelle 8). Da es sich bei Sec20p um ein ER-Membranprotein handelt, wurde zum Test auf Interaktion nur der zytoplasmatische Teil eingesetzt. Membranproteine sind für die Standard-, Two-Hybrid'-Analyse nicht geeignet, da für die Detektion der Interaktion die Kernlokalisierung der Fusionsproteine notwendig ist. Daher wurde der N-Terminus bis zur TMD, d. h. bis Aminosäure 220, für Interaktionsversuche mit Sec20p eingesetzt (zyto-Sec20p). Dieser Teil wurde an die BD bzw. AD vom Gal4-Regulatorprotein fusioniert. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pYW24 und pYW25 bezeichnet (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten 'Two-Hybrid'-Analyse von Tip20p und zyto-Sec20p gibt die Abb. 35 wieder.

Als Kontrolle wurden Stämme eingesetzt, die Plasmide mit verschiedenen stark interagierenden Hybridproteinen enthalten. Auf den Kontrollplatten, Platten die kein Leucin und Tryptophan enthielten, waren alle Transformanten in der Lage zu wachsen, d. h. sie enthielten jeweils die zwei eingebrachten Plasmide für die potentielle Interaktionspartner. Diese Plasmide enthielten die Selektionsmarker für Leucin und Tryptophan. Auf Platten ohne Adenin (*ade⁻*) oder auf Platten ohne Histidin (*his⁻*; mit 3-Aminotriazol) hingegen wuchsen nur die drei Positivkontrollen sowie Stämme, die mit Vektoren transformiert waren, die für die Fusionsproteine BD-Tip20p und AD-Sec20p (oder umgekehrt) kodieren (siehe Abb. 35, roter Kasten). Mittels eines X-Gal-Overlays, wie in 2.8.6.1 beschrieben, konnte ein weiterer Beweis für die Interaktion des zytoplasmatischen Teils von Sec20p mit dem Tip20p nachgewiesen werden. Das Maß der Blaufärbung ist ein Maß für die Interaktion, wie schon bei den drei Positivkontrollen deutlich wird. Der X-Gal-Overlay zeigte eine Blaufärbung bei Transformanten die sowohl das Tip20p als auch den zytosolischen Teil des Sec20p enthielten (siehe Abb. 35, roter Kasten). Auch hierdurch konnte die Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden.

Zur Quantifizierung wurde die von Miller (1972) beschriebene Methode zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität eingesetzt. Die Versuche wurden wie in 2.8.6.2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 36 zu sehen.

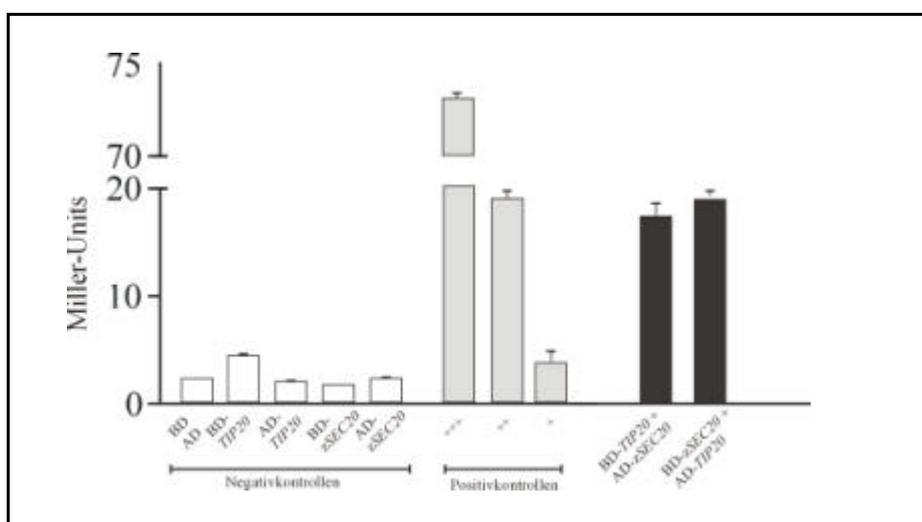


Abb. 36: Quantitative „Two-Hybrid“-Analyse nach Miller (1972). Stämme wurden wie in Abb. 35 beschrieben eingesetzt. Entsprechende Transformanten wurden über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen. Nach der OD₆₀₀-Bestimmung wurden je 1 ml für den Test eingesetzt. Nach Lyse der Zellen und Zugabe von ONPG wurde eine Gelbfärbung bei 30°C beobachtet. Diese Färbung wurde bei einer OD₄₂₀ bestimmt und nach der in 2.8.6.2 angegebenen Formel in Miller-Units umgerechnet. Es wurden jeweils sechs unabhängige Transformanten für eine Doppelbestimmung eingesetzt. Es wurden drei unterschiedlich stark interagierende Positivkontrollen eingesetzt sowie eine Negativkontrolle, die nur die unfusionierte Gal4p-DNA-Bindedomäne (BD) und die unfusionierte Gal4p-Aktivierungsdomäne (AD) produzieren (siehe 2.8.5).

Eine signifikante Erhöhung der β -Galaktosidase Aktivität ist in Stämmen mit Sec20p und Tip20p Proteinen zu erkennen. Es konnte also gezeigt werden, daß der zytoplasmatische Teil von CaSec20p mit dem CaTip20p interagiert.

3.14.6 Homodimerbildung von CaTip20p

Wie oben beschrieben ist Tip20p zur Interaktion mit einem anderen Protein befähigt. Es hat genauso wie Sec20p eine „coiled coil“ Region. Daher könnten beide Proteine potentiell neben ihrer Heterodimerbildung auch eine Homodimerbildung eingehen. Dies sollte sowohl für Sec20p als auch für Tip20p untersucht werden. Hierzu wurde wiederum die ‚Two-Hybrid‘ Analyse eingesetzt. Der Stamm PJ69-4A wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, d. h. es wurde AD-Tip20p und BD-Tip20p sowie AD-zyto-Sec20p und BD-zyto-Sec20p in einen Stamm gebracht. Die Transformanten wurden auf Platten ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und anschließend wurden Einzelkolonien über Nacht angezogen. Gleiche Zellzahlen dieser Stämme wurden auf die verschiedenen Testplatten gegeben. Alle Stämme wuchsen wie erwartet auf Platten ohne Leucin und Tryptophan. Im Gegensatz dazu wuchsen auf Platten ohne Adenin (ade⁻) oder auf Platten ohne Histidin (his⁻; mit 3-Aminotriazol) nur wenige Kolonien. Wachstum war bereits bei Stämmen mit ausschließliche dem BD-Tip20p-Fusionsprotein zu beobachten (Abb. 37, roter Pfeil). Dies spricht für eine unspezifische Aktivierung des Gal4p-abhängigen Promotors.

Stämme, die das BD-Tip20p und gleichzeitig auch das AD-Tip20p enthielten, waren daher ebenfalls in der Lage auf diesen Platten zu wachsen (Abb. 37, roter Kasten). Somit konnte aufgrund des Wachstums auf Adenin- bzw. Histidin-freiem Medium nicht auf eine Homodimerbildung von Tip20p geschlossen werden.

Auch mittels eines X-Gal-Overlays konnte kein eindeutiger Hinweis für die Interaktion der Tip20-Proteine gefunden werden (Abb. 37, roter Kasten). Auch hier ist schon eine Blaufärbung beim Stämmen zu beobachten, die nur das BD-Tip20p-Fusionsprotein beinhalten.

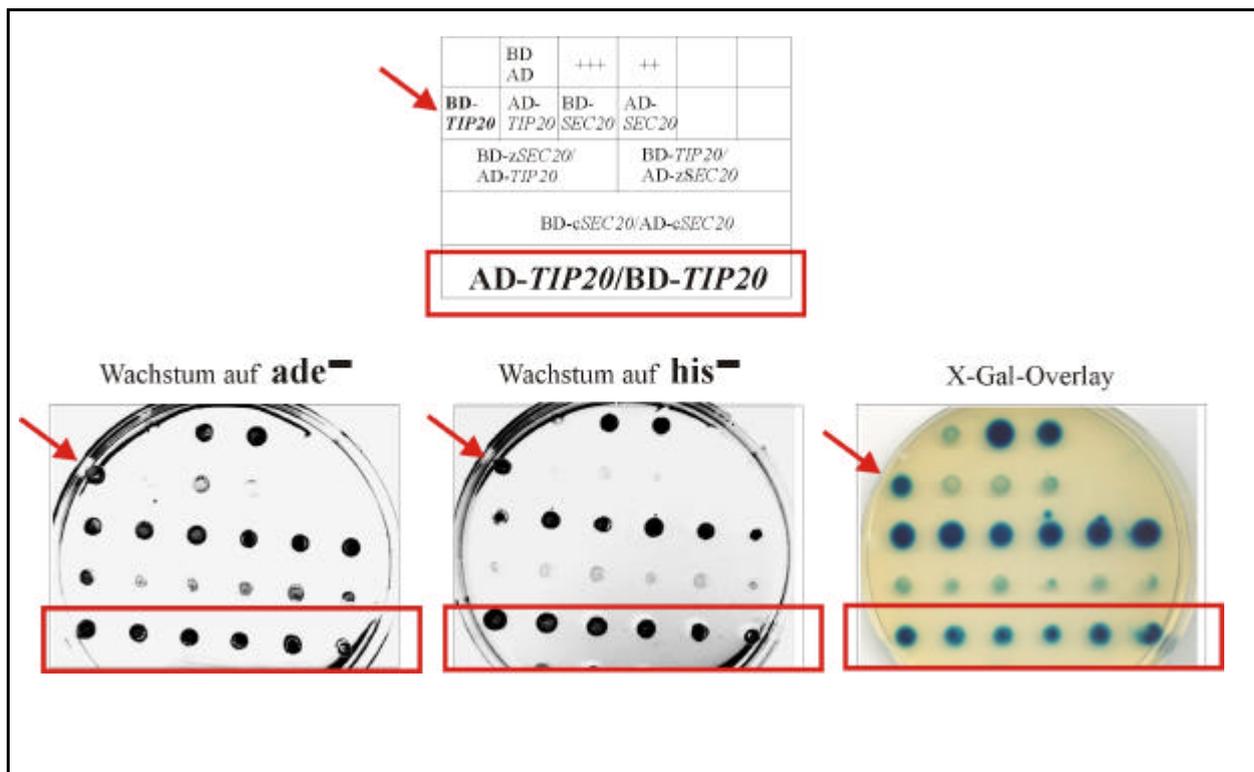


Abb. 37: Test auf Homodimerbildung des CaTip20-Proteins und dem zytoplasmatischen Teil des CaSec20-Proteins mittels ‚Two-Hybrid‘-Analyse. Entsprechende Transformanten wurden über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen. Nach Verdünnung auf $OD_{600}=0,2$ erfolgte das Beimpfen der oben angegebenen Medien. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert. Mit der *leu⁻ trp⁻*-Platte wurde anschließend der ‚Overlay-Assay‘ durchgeführt und weitere 15 min inkubiert. Es wurden zwei unterschiedlich stark interagierende Positivkontrollen eingesetzt sowie eine Negativkontrolle, die nur die unfusionierte Gal4p-DNA-Bindedomäne (BD) und die unfusionierte Gal4p-Aktivierungsdomäne (AD) produzieren (siehe 2.8.5).

Zwar löste schon das Einbringen eines BD-Tip20-Fusionsproteins in dem *S. cerevisiae* Stamm PJ69-4A eine Aktivierung des Gal-Promotors aus (Abb. 37). Um diese unspezifische Aktivierung von der spezifischen Aktivierung der Homodimerbildung des CaTip20-Proteins unterscheiden zu können, erfolgte die Quantifizierung der Interaktion mittels β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 38 zu sehen. Eine signifikante Erhöhung der β -Galaktosidase Aktivität konnte man nur in Stämmen beobachten, die das Tip20-Protein fusioniert an die Bindedomäne als auch fusioniert an die Aktivierungsdomäne enthielten. Die Homodimerbildung verursachte eine signifikante Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität in diesen Stämmen im Vergleich zu Stämmen, die das Tip20-Protein alleine an der Bindedomäne enthielten. Mit derselben Methode konnte keine Homodimerbildung der zytoplasmatischen Domäne von CaSec20p festgestellt werden (Abb. 38).

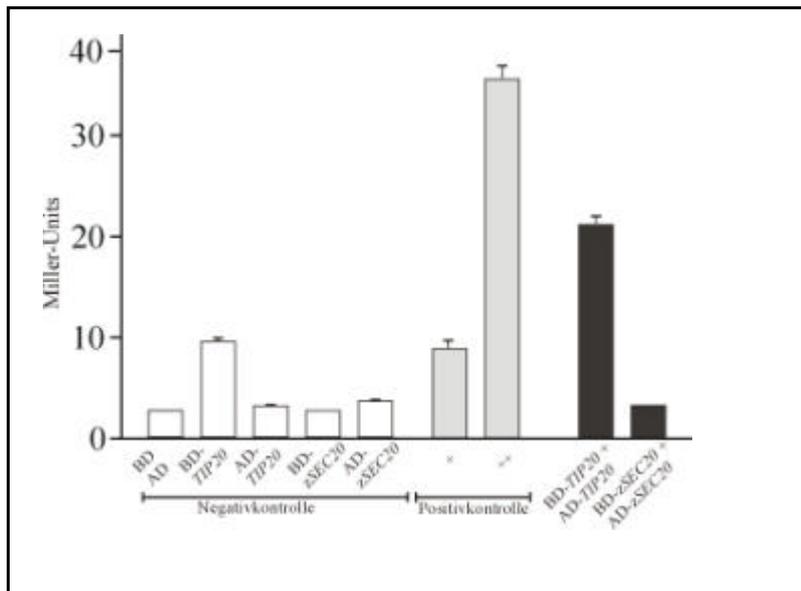


Abb. 38: Quantitative „Two-Hybrid“-Analyse nach Miller (1992). Entsprechende Transformanten wurden über Nacht in 5 ml Selektivmedium angezogen und anschließend nach OD₆₀₀ Bestimmung mit je 1 ml für den folgenden Test eingesetzt. Nach Lyse der Zellen und Zugabe von ONPG wurde eine Gelbfärbung bei 30°C beobachtet. Diese Färbung wurde bei einer OD₄₂₀ gemessen und nach der in 2.8.6.2 angegebenen Formel in Miller-Units umgerechnet. Es wurden jeweils 6 unabhängige Transformanten für eine Doppelbestimmung eingesetzt. Es wurden zwei unterschiedlich stark interagierende Positivkontrollen eingesetzt sowie eine Negativkontrolle, die nur die unfusionierte Gal4p-DNA-Bindedomäne (BD) und die unfusionierte Gal4p-Aktivierungsdomäne (AD) produzieren (siehe 2.8.5).

3.14.7 Analyse der Tip20p/Sec20p Interaktion in *C. albicans*

3.14.7.1 Interaktion *in vitro*

Die Koimmunopräzipitation ist ein biochemisches Verfahren zum Nachweis von Proteininteraktionen. Es wurde auf Tip20p und Sec20p angewendet. Diese Methode bietet im Gegensatz zu der „Two-Hybrid“-Analyse den Vorteil, daß im natürlichen System, in diesem Fall *C. albicans*, gearbeitet werden kann. Es ist kein Import der interagierenden Proteine in den Zellkern notwendig, so daß nicht nur mit zytoplasmatischen Proteinen gearbeitet werden kann. Es konnte daher hierfür das gesamte CaSec20p eingesetzt werden und nicht nur der zytoplasmatische Anteil.

Es erfolgte die Klonierung eines Fusionsgens für eine C-terminal Epitop-makierten Variante des CaTip20-Proteins. Mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden wurde eine Region für 3xflag-Tag an SEC20 angehängt und die Produktion das resultierende Tip20p_{3xflag} wurde unter die Kontrolle des *PCK1*-Promotors gestellt. Dieses als pYW101 bezeichnete Plasmid wurde in den *C. albicans* Stamm CAI4 transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden in *PCK1*-Promotor-induzierendem Na-Lactat-Medium angezogen und aus 20 ml Kultur wurden Rohextrakte isoliert. 10 µl der 500 µl Rohextraktlösung wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt.

Nach anschließendem Western-Blot konnte Tip20p_{3xflag} mit einer Größe von 89 kDa nachgewiesen werden (Abb. 39, Spur 1 und 2). Dies entspricht der errechneten Molekülmasse für das Tip20_{3xflag}-Protein. Auch etwas oberhalb, bei ca. 100 kDa, war eine spezifische Bande zu erkennen. Hierbei könnte es sich entweder um ein modifiziertes Tip20p handeln oder das 89 kDa-Protein ist ein Abbauprodukt des Tip20-Proteins. In *S. cerevisiae* ist weder eine Modifikation von Tip20p noch eine spezifische Abbaubande gezeigt worden (Sweet und Pelham, 1993). Unter Promotor-reprimierenden Bedingungen konnte, wie erwartet, kein CaTip20p detektiert werden (Abb. 39, Spur 3).

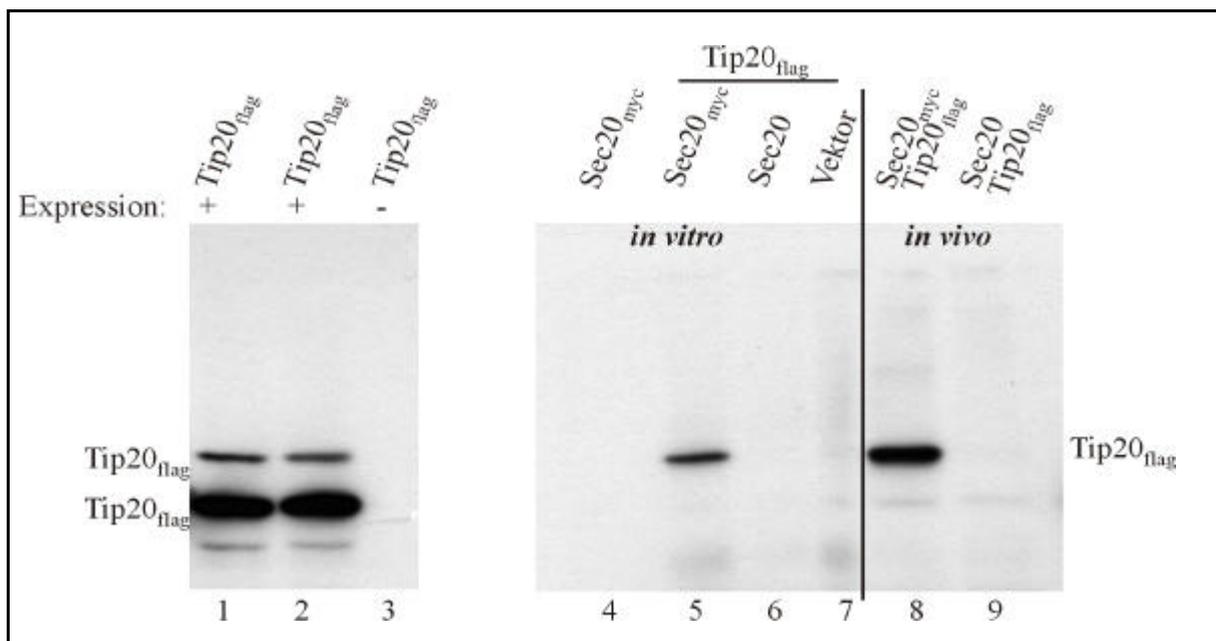


Abb. 39: Koimmunpräzipitation von Sec20p_{myc} und Tip20p_{flag}. Spur 1 und 2: Zwei unabhängige Transformanten des *C. albicans* Stammes CAI4 mit pYW101 (*CaTIP20_{flag}* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors) wurden in Na-Laktat-Medium angezogen. Es wurden 10 µl Rohextrakt aufgetragen. Spur 3: wie Spur 1, allerdings erfolgte die Anzucht in *PCK1*-Promotor-reprimierendem SD-Medium. Es wurden 10 µl Rohextrakt aufgetragen. Spur 4, 5, 6 und 7: Koimmunpräzipitation unterschiedlicher Rohextraktmischungen. Es wurden je 100 µl Rohextrakt Tip20p_{flag} (außer Spur 4) gemischt mit 100 µl des angegebenen Rohextrakts. 50 % des Präzipitats wurde aufgetragen. Spur 4: CAI4 mit pYW69 (*PCK1p-CaSEC20_{myc}*); Spur 5: CAI4 mit pYW69 und CAI4 mit pYW101 (*PCK1p-CaTIP20_{flag}*); Spur 6: CAI4 mit pYW7 (*PCK1p-CaSEC20*) und CAI4 mit pYW101; Spur 7: CAI4 mit „leerem“ Vektor und CAI4 mit pYW101. Spur 8 und 9: Koimmunpräzipitationen von in der gleichen Zelle exprimierten Proteinen. Es wurden 100 µl Rohextrakt zur Präzipitation eingesetzt und davon 50 % aufgetragen. Spur 8: CAI8 mit pYW102 (*PCK1p-CaTIP20_{flag}*) und pYW69; Spur 9: CAI8 mit pYW102 und pYW7. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten flag-Antikörper.

Für eine Koimmunpräzipitation wurden das mit dem c-myc-Epitop fusionierte Sec20p und Tip20p_{3xflag} verwendet. Es wurde der *C. albicans*-Stamm CAI4, transformiert mit den Plasmiden pYW69 (*PCK1p-CaSEC20_{myc}*) oder pYW101 (*PCK1p-CaTIP20_{flag}*), eingesetzt. Nach Anzucht in 40 ml *PCK1*-Promotor-induzierendem Medium wurden Rohextrakte beider Transformanten in einem Volumen von 500 µl hergestellt. 100 µl der einzelnen Rohextrakte (entspricht 200 µg Gesamtproteinmenge) wurden gemischt und anschließend wurde Sec20p über Protein-A-Sepharose bzw. anti-myc-Antikörper aufgereinigt (siehe 2.15.1). Der Protein-A-Sepharose-Niederschlag wurde mit 80 µl Laemmli-Puffer aufgekocht; 40 µl davon wurden nach SDS-

PAGE im Western-Blot mit Anti-flag-Antikörpern analysiert. Im Falle einer Interaktion des myc-markierten Sec20p mit dem flag-markierten Tip20p sollte es also möglich sein, dieses im Western-Blot nachzuweisen.

Wie in Abb. 39, Spur 5 zu sehen, ist eine Koimmunpräzipitation von Tip20p_{flag} durch Sec20p_{myc} möglich. Als Kontrollen dienten in diesem Versuch verschiedene andere Rohextraktmischungen. Dabei handelt es sich zum einen um Sec20p, (Spur 6), das nicht Epitep markiert war und zum anderen um einen „leeren“ Vektor (Spur 7). Daß es sich in Spur 5 um eine spezifische Tip20p Bande handelt, wird durch Spur 4 deutlich, da hier ausschließlich Sec20p_{myc} eingesetzt wurde. Es wird deutlich, daß es sich bei dem kopräzipitierten Protein um die größere (100 kDa) Fraktion von Tip20p handelt. Die kleinere Bande konnte hier nicht durch Sec20p kopräzipitiert werden.

3.14.7.2 Interaktion *in vivo*

Um eine Interaktion der Proteine *in vivo* zu ermöglichen, wurden die zwei zu untersuchenden Proteine in der selben Zelle überexprimiert. Der *C. albicans* Stamm CAI8, der zwei Selektionsmarker hat, wurde mit den Plasmiden pYW69 (*PCK1p-CaSEC20_{myc}, URA3*) und pYW102 (*PCK1p-CaTIP20_{flag}, ADE2*) transformiert. Das Plasmid pYW69 ist ein *URA3*-enthaltendes Plasmid mit *SEC20_{myc}* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors. Das Plasmid pYW102 ist ein *ADE2*-enthaltendes Plasmid mit *TIP20_{flag}* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors. Die erhaltenen Transformanten exprimieren daher Sec20p und Tip20p in *PCK1*-Promotor-induzierendem Medium. Nach anschließender Herstellung von Rohextrakten wurde Sec20p mit Hilfe des myc-Antikörpers immunpräzipitiert. Es folgte eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot. Das an das präzipitierte Sec20p_{myc} gebundene Tip20p_{3xflag} wurde mit einem POD-gekoppelten flag-Antikörper nachgewiesen.

Als Kontrolle diente hier ein CAI8 Stamm, der mit pYW102 transformiert war, sowie Sec20p ohne myc-Epitep. Durch das fehlende Epitep war, wie erwartet, keine Kopräzipitation möglich (Abb. 39, Spur 9).

Wie in Abb. 39, Spur 8, zu sehen, ist es möglich, Tip20p in dem Sec20p-Präzipitat nachzuweisen. Auch hier wird, wie bei der Mischung aus zwei unterschiedlichen Rohextrakten, die größere Variante von Tip20p kopräzipitiert. Eine spezifische Interaktion der Proteine in der Zelle konnte somit auch *in vivo* nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Bedeutung von *C. albicans* als Erreger humaner Mykosen ist in den letzten Jahren stetig angestiegen (Pfaller, 1994; Fridkin und Jarvis, 1996). Zwar ist *C. albicans* gewöhnlich ein harmloser Kommensale der Darmschleimhaut, der gelegentlich lokale Infektionen auslöst; Immundefekte ermöglichen aber die Ausbildung einer systemischen Candidose (Greenspan, 1994). Man geht davon aus, daß viele unterschiedliche Faktoren auf Erreger- und Wirtsseite die Ausbildung von *Candida*-Infektionen beeinflussen (Cutler, 1991).

Da nur ein begrenztes Spektrum an Antimykotika zur Verfügung steht, ist es notwendig, die Virulenzfaktoren von *C. albicans* auf molekularer Ebene zu verstehen um neue Angriffspunkte zu identifizieren. Um neue antimykotische Substanzklassen zu entwickeln, müssen neue „targets“ identifiziert werden, die möglichst nicht im menschlichen Organismus existieren. Dieses ist von entscheidender Bedeutung, da es bei einer antimykotischen Therapie ansonsten auch zu Nebenwirkungen bei dem behandelten Patienten kommt.

Neben anderen Faktoren ist die Sekretion hydrolytischer Enzyme sowie der Proteintransport von Membranproteinen von entscheidender Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* (Hube *et al.*, 1994). So ist z. B. bekannt, daß Resistenzen unter anderem durch Änderungen in der Membranstruktur und durch aktive Ausschleusungsmechanismen mittels sogenannter „Multi Drug Transporter“ verursacht werden (Sanglard *et al.*, 1997; StGeorgiev, 2000).

Obwohl Komponenten des Sekretionsweges im allgemeinen universell in Eukaryoten vorhanden sind, gibt es Ausnahmen, wie das hier untersuchte Sec20-Protein. Das kodierende *CaSEC20*-Gen wurde isoliert, sequenziert und eingehend charakterisiert. Es stellte sich heraus, daß die Protein-Glykosylierung für die Stabilität des Sec20-Proteins von großer Bedeutung ist. Mit der Klonierung von *CaUFE1* und *CaTIP20* konnten Gene identifiziert werden, die für mögliche Interaktionspartner, von Sec20p kodieren.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand in der Klonierung eines bisher in *C. albicans* nicht charakterisierten Gens, dessen Produkt am Proteintransport innerhalb der Zelle beteiligt sein könnte. Mit Hilfe des zur Verfügung gestellten *CaSEC20* cDNA-Klones (Swoboda *et al.*, 1993) war es möglich, aus einer Fosmid-Bibliothek des *C. albicans*-Stamms 1161 (Chibana *et al.*, 1998) das geeignete Fosmid (7B11) zu identifizieren und ein 4,2 kb großes *HindIII*-Fragment daraus zu isolieren. Das im Fragment enthaltene gesamte *CaSEC20*-Gen wurde doppelsträngig sequenziert (Abb. 9). Auffallend war ein schon 138 bp stromaufwärts des *CaSEC20*-Gens liegender, vom komplementären Strang kodierter ORF. Dieser 519 Aminosäuren umfassende ORF zeigt 39 % bzw. 34 % Identität zu den *S. cerevisiae* Genen YMR285 bzw. YML118W, mit bisher unbekannter Funktion. Durch Computeranalyse konnte ein Transkriptionsstartpunkt für diesen Promotor in beide Richtungen vorhergesagt werden (Abb. 9; <http://www-hgc.lbl.gov/cgi-bin/promoter.pl>). Obwohl es sich bei den 138 bp im 5'-untranslatierten Bereich von *SEC20* offenbar um einen in beide Richtungen funktionsfähigen Promotor handelt, hatte die Disruption dieses Promotors zumindest bei einer heterozygoten Disruption keinen Einfluß auf das

Wachstum der Zellen (Abb. 13). Bei *SEC20* handelt es sich um ein sehr schwach exprimiertes Gen (siehe unten), was die Computeranalyse des Promotorbereiches bestätigte. Auch *YMR285* scheint ein sehr schwach exprimiertes Gen zu sein, da es durch Northernblot-Analyse nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß es sich um ein nicht exprimiertes Gen handelt, oder daß er nur unter speziellen Bedingungen aktiviert wird.

4.1 CaSec20p ist gegenüber ScSec20p N-terminal verkürzt

Das isolierte *CaSEC20*-Gen kodiert für ein Protein von 332 Aminosäuren mit einer putativen Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich sowie einer ausgedehnten „coiled coil“-Region auf seiner N-terminalen Seite. Auch die zu 27 % identische Aminosäuresequenz des homologen Proteins in *S. cerevisiae* besitzt eine Transmembrandomäne sowie eine „coiled coil“-Region (Sweet und Pelham, 1992). Das 383 Aminosäure große ScSec20p ist allerdings in seinem N-Terminus wesentlich länger (95 Aminosäuren) als CaSec20p (Abb. 10). ScSec20p ist ein TypII-integrales ER-Membranprotein (Sweet und Pelham, 1992), d. h. der N-Terminus des Proteins befindet sich im Zytoplasma, wohingegen der C-Terminus im ER-Lumen lokalisiert ist. Nach Computeranalyse gilt dies auch für das CaSec20p. Diese Struktureigenschaften lassen auf ein SNARE-Protein schließen, allerdings bestehen weder für *S. cerevisiae* (Sweet und Pelham, 1992) noch für *C. albicans* Sequenzähnlichkeiten mit bekannten SNARE-Proteinen. Zu dem *C. albicans*-Sec20p ist kein homologes Protein aus Säugern bekannt, wie die BLAST-Analyse bestätigte. Da es außerdem essentiell ist (siehe unten) ist Sec20p ein potentielles Target in der Bekämpfung von Candidosen. Auch in *S. pombe* ist dieses, offenbar pilzspezifische Sec20p zu finden. Im *S. pombe* Sequenzierungsprojekt zeigt ein noch nicht charakterisiertes Protein (EMBL SPAC23A1.15c) 21 % Identität zu dem *S. cerevisiae* Sec20p.

Um zu überprüfen, ob *CaSEC20* auch in *S. cerevisiae* funktionell ist, wurde dieses Gen auf einem Plasmid in einen *S. cerevisiae*-Stamm mit einem temperatursensitiven Allel von *SEC20* (*sec20-1*) eingebracht. Dieser Ansatz wurde mit einem 2 μ - sowie einem *CEN*-Vektor durchgeführt, die *CaSEC20* unter der Kontrolle eines konstitutiven *S. cerevisiae*-Promotors enthalten (*PFK2*-Promotor, Raben *et al.*, 1995). Es zeigte sich, daß keine der erhaltenen Transformanten in der Lage war, das *Scsec20-1* Allel zu ersetzen (Abb. 16). Mögliche Gründe dafür könnten der unterschiedliche Kodongebrauch der beiden Hefen sein (Leuker und Ernst, 1994; Santos und Tuite, 1995; White *et al.*, 1995) und die damit verbundenen Austausch von Serin in Leucin in *S. cerevisiae* (Abb. 9). Allerdings ist es viel wahrscheinlicher, daß die N-terminale Verkürzung von CaSec20p gegenüber ScSec20p keine Komplementation von *sec20-1* zuläßt. Durch Disruption mit anschließender Tetradenanalyse konnte gezeigt werden, daß ein Teil dieses Bereichs essentiell für ScSec20p ist. Die Verkleinerung von ScSec20p im N-Terminus um den Teil, der in CaSec20p fehlt (95 Aminosäuren; vergleiche Abb. 10), ist in *S. cerevisiae* letal. Die Funktion dieses Bereiches in ScSec20p ist allerdings noch nicht geklärt. Sowohl die „coiled coil“-Region, die als notwendig für die Interaktion mit ScTip20p angesehen

wird (siehe unten), als auch die Mutationen, die die Temperatursensitivität bedingen, liegen außerhalb dieser Region (Sweet und Pelham, 1992; Sweet und Pelham, 1993).

Ein Merkmal von CaSec20p ist eine sehr Serin/Threonin-reiche Region, die C-terminal der TMD, im luminalen Teil des Proteins zu finden ist. CaSec20p weist ein putatives ER-Retentionssignal, VDEL, an seinem im ER-Lumen gelegenen C-Terminus auf, welches dem aus *S. cerevisiae* bekannten HDEL- und dem aus Säugern bekannten KDEL-Motiv sehr ähnlich ist (Semenza *et al.*, 1990; Townsley *et al.*, 1993). Normalerweise besitzen lösliche ER-Proteine die eben beschriebenen Retentionssignale (Northwehr und Stevens, 1994). Im Fall von Sec20p wird dieses Motiv aber von einem Membranprotein verwendet. Die Lokalisation von Membranproteinen mit Hilfe dieser Sequenz ist bei *S. cerevisiae* neben Sec20p auch für Sed4p (suppressor of the *erd2* deletion) beschrieben worden (Sweet und Pelham, 1992; Hardwick *et al.*, 1992). In *S. cerevisiae* wurde die Funktionalität dieses Signals bei Sec20p durch eine beschleunigte Degradation des Proteins bei einer Mutation zu DDEL gezeigt (Sweet und Pelham, 1992). Dabei handelt es sich nicht um ein essentielles Signal in ScSec20p, da bekannt ist, daß Hefen auch ohne den Erd2p-Rezeptor, der die Retention aufgrund des HDEL-Signales vermittelt, vital sind (Hardwick *et al.*, 1990).

Eine Computeranalyse ergab, daß das *C. albicans* homologe Protein zu ScSec12p ein KDEL-Motiv als potentielles Retentionssignal aufweist, das dem KDEL-Motiv aus Säugern entspricht. Aus *S. cerevisiae* ist die ER-Lokalisation des TypII-integralen Membranproteins Sec12p bekannt. Auch ein retrograder Transport vom Golgi zum ER konnte für Sec12p nachgewiesen werden (Boehm *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu *C. albicans* enthält Sec12p in *S. cerevisiae* keines der bekannten Retentionssignale, sondern wird wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem Rer1-Protein, abhängig von der Länge seiner TMD, lokalisiert (Sato *et al.*, 2001). Spezies-spezifische Unterschiede in den ER-Retentionssignalen sind nicht ungewöhnlich. So unterscheiden sich selbst zwischen den Hefen die Retentionssignale und die entsprechenden Rezeptoren. Aus *Kluyveromyces lactis* ist das DDEL-Signal bekannt, welches durch einen dem Erd2p-Rezeptor vergleichbaren, spezifischen KI-Erd2p-Rezeptor erkannt wird (Lewis *et al.* 1990). Vom diesem KI-Erd2p-Rezeptor ist bekannt, daß er sowohl das HDEL- als auch das DDEL-Signal gleichermaßen erkennt, obwohl in *K. lactis* bisher nur das DDEL-Signal beschrieben wurde (Semenza und Pelham, 1992).

4.2 CaSec20p ist ein integrales Membranprotein des ERs

Um die Lokalisation von CaSec20p in der *C. albicans* Zelle zu untersuchen, wurde das Gen für Epitop-markiertes Sec20-Protein im Wildtyp CAI4-Stamm unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors exprimiert. Die Zellen wurden in induzierendem Medium angezogen und anschließend auf einem Objektträger fixiert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß Sec20p im perinukleären Bereich des ERs lokalisiert ist (Abb. 31A).

Es ist bekannt, daß eine Reihe von Puffern lösliche Proteine sowie periphere Membranproteine lösen, wohingegen integrale Membranproteine nicht beeinflusst werden (Fujiki *et al.*, 1982). Da CaSec20p durch Triton-X100 gelöst wird, durch andere Puffer allerdings nicht beeinflusst wird,

konnte gezeigt werden, daß Sec20p ein integrales Membranprotein ist (Abb. 32) Es läßt sich also vermuten, daß Sec20p, vergleichbar mit einem SNARE-Protein, am retrograden Transport beteiligt sein könnte. Obwohl keinerlei Homolog zu anderen SNARE-Proteinen besteht, sind die strukturellen Voraussetzungen erfüllt. Es kann weiterhin geschlossen werden, daß Sec20p keine Komponente eines klassischen „transport protein particle“-Komplexes (TRAPP) an der ER-Membran darstellt. Ein TRAPP-Komplex ist in Hefe an der Golgi-Membran identifiziert worden (Sacher *et al.*, 2000). Von diesem aus zehn Untereinheiten bestehenden Komplex wird angenommen, daß er für die spezifische Interaktion und damit für die Identifizierung von Vesikel und Zielmembran verantwortlich ist (Pfeffer, 1999; Yang *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, daß TRAPP-Proteine des Golgis nicht durch die Behandlung mit Triton-X-100 von der Membran gelöst werden können und daß kein Recycling der Proteine stattfindet (Sacher *et al.*, 2000).

Auch das *S. cerevisiae* Sec20-Protein konnte im ER lokalisiert werden (Sweet und Pelham, 1993). Hieraus wurde geschlossen, daß entweder die Funktion des Proteins im ER liegen muß, oder daß seine hauptsächlichliche Lokalisation nicht mit dem Ort der Funktion übereinstimmt. Das funktionelle HDEL-Signal des ScSec20-Proteins spricht für ein Recycling zwischen Golgi und ER. Die Lokalisation des Proteins im Zytosol konnte gezeigt werden, wenn nur der N-terminale Bereich vor der TMD von ScSec20p produziert wurde (Sweet und Pelham, 1993). Es ist also davon auszugehen, daß die TMD zur Verankerung des Proteins im ER führt.

4.3 *CaSEC20* ist essentiell für das Wachstum

Eine Disruption von *CaSEC20* war im *C. albicans*-Stamm CAI4 (Wildtyp) nicht möglich. Obwohl Konstrukte eingesetzt wurden, die eine Beeinträchtigung des oben beschriebenen kurzen Promotors verhindern, konnten keine Transformanten mit zwei disruptierten Allelen von *SEC20* erhalten werden. Man kann daher davon ausgehen, daß es sich bei *SEC20* um ein essentielles Gen handelt. Durch die Konstruktion der konditionalen Mutanten, *CAr2d110* und *CAr10a3* in denen ein *SEC20*-Allel unter der Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors steht (*sec20Δ/PCK1p-SEC20*), konnte der Einfluß der *SEC20* Expression auf das Wachstum von *C. albicans* untersucht werden. Die Generationszeit wurde durch eine verminderte *SEC20*-Expression signifikant von 90 auf 130 Minuten erhöht. Allerdings waren diese Stämme auch unter Promotor-reprimierenden Bedingungen vital (Abb. 13). Mit Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, daß auch unter *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingungen ein *SEC20*-Transkript vorhanden ist (Abb. 14). Daher steht die Vitalität der Zellen unter Promotor-reprimierenden Bedingungen nicht im Gegensatz zu der Annahme, daß *SEC20* essentiell ist. Man kann also sagen, daß auch unter *PCK1p*-reprimierenden Bedingung eine *SEC20*-Expression erfolgt und diese ausreichend für das Wachstum der Zellen ist. Auch aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß die Expressionsrate von *SEC20* sehr gering ist (Sweet und Pelham, 1992). Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Minimierung der *SEC20*-Expression durch einen unvollständig reprimierten Promotor nicht ausreicht, um das Wachstum der Zellen zu verhindern.

Die konditionalen Mutanten CA2d1m, CA2d2m und CA2d6m in denen das zweite *SEC20*-Allel unter der Kontrolle des stark reprimierbaren *MET3*-Promotors steht (*sec20Δ/MET3p-SEC20*), zeigen, daß es sich bei *SEC20* tatsächlich um ein essentielles Gen handelt. Der *C. albicans* *MET3*-Promotor kann durch die Zugabe von Methionin und Cystein ins Medium reprimiert werden (Caro *et al.*, 1999). Diese konditionalen Mutanten wuchsen nicht mehr auf reprimierendem Medium mit Methionin und Cystein (Abb. 15). Dies bedeutet, daß für das Wachstum von *C. albicans* ein Minimum an *SEC20*-Expression notwendig ist.

Hierbei handelt es sich allerdings um einen Wachstumsarrest, die Lebensfähigkeit der Zellen ist nicht gestört. Nach verlängerter Inkubation in reprimierendem Medium waren die Zellen wieder in der Lage zu wachsen. Durch genetische Analyse wurde gezeigt, daß der Genotyp (*sec20Δ:hisG/MET3p-SEC20*) nicht verändert war. Die adaptierten Zellen behielten ihren neuen Phänotyp auch nach Inkubation in nicht-reprimierendem Medium bei. Anschließend konnte keine Repression in Anwesenheit von Methionin und Cystein mehr festgestellt werden. Es kann angenommen werden, daß es sich bei diesem Phänomen um eine permanente Adaption handelt.

4.4 Eine verringerte Expression von *SEC20* führt zur Supersensitivität gegen verschiedene Substanzen

Die verschiedenen *C. albicans*-Stämme, d. h. die Halbdisruptanten sowie die konditionalen Mutanten mit *SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors, wurden auf ihre Fähigkeit getestet, in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren zu wachsen. Unter *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingungen, d. h. bei reduzierter *SEC20*-Expression, war ein deutlicher Wachstumsdefekt auf Platten mit Aminoglykosidantibiotika zu beobachten. Als Kontrolle wurde gezeigt, daß der Wildtyp sowie die Halbdisruptante ebenso wie die konditionale Mutante auf induzierendem Medium in Anwesenheit von Aminoglykosidantibiotika vergleichbar gut wachsen konnten. Vermindertes Wachstum aufgrund geringerer *SEC20*-Expression war auf Hygromycin B-, Neomycin- und G418-enthaltenden Platten zu beobachten (Abb. 19). Supersensitivität gegenüber Aminoglykosidantibiotika ist auch aus verschiedenen anderen Hefe-Mutanten bekannt. So wurde z. B. eine erhöhte Sensitivität gegenüber Neomycin und Geneticin in *N*-Glykosylierungsmutanten von *S. cerevisiae* beobachtet (Shimma *et al.*, 1997). Dabei wurde von einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellwand oder einem vermehrten Import von Antibiotika aufgrund der fehlenden Glykosylierung von Membran- oder Zellwandproteinen ausgegangen. Es konnte gezeigt werden, daß *S. cerevisiae* Wildtyp-Zellen auch in Anwesenheit von Tunicamycin, einem *N*-Glykosylierungsinhibitor, erhöhte Sensitivität gegenüber Neomycin zeigen. Bei einer Suche nach Neomycin-supersensitiven Mutanten wurde in *S. cerevisiae* das *NES10*-Gen isoliert, das sich als Homolog zu *SEC20* herausstellte (Shimma *et al.*, 1997). *N*-Glykosylierungsmutanten von *S. cerevisiae* zeigen neben einer erhöhten Sensitivität gegenüber Neomycin allerdings eine erhöhte Resistenz gegenüber Na-Orthovanadat (Ballou *et al.*, 1991; Albright and Robbins, 1990; Wickert, 1998). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mutanten konnte zwar eine Supersensitivität gegenüber Neomycin festgestellt werden, aber keine erhöhte Resistenz

gegenüber Na-Orthovanadat. Na-Orthovanadat hatte keinen Einfluß auf des Wachstum der konditionalen *SEC20*-Mutante (Daten nicht gezeigt).

Eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Aminoglykosid-Antibiotika, wie z. B. Neomycin, G418 und Hygromycin B, deutet sowohl bei *S. cerevisiae*- als auch bei *C. albicans*-Stämmen außerdem auf Defekte in der *O*-Glykosylierung hin (Dean, 1995; Timpel *et al.*, 1998 und 2000). Obwohl die genauen Gründe für diese erhöhte Sensitivität nicht bekannt sind, nimmt man an, daß die Unterglykosylierung bestimmter Zellwand- oder Membranproteine eine größere Permeabilität der Zellwand hervorruft. Durch die vergleichbaren Phänotypen in der Sekretionsmutante könnte man jedoch auch eine beeinträchtigte Sekretion als Ursache vermuten. So könnte z. B. eine defekte Glykosylierung von Komponenten des Sekretionsweges die Supersensitivitäten durch Transportdefekte hervorrufen. Es könnte sich dabei um einen direkten Effekt von Sec20p handeln, da Sec20p ein *O*-glykosyliertes Protein ist (siehe unten). In *S. cerevisiae* wurde für Sec20p kürzlich gezeigt, daß es, unabhängig von seiner Funktion in der Sekretion, auch möglicherweise direkt sowohl an der *N*- als auch der *O*-Glykosylierung beteiligt ist (Schleip *et al.*, 2001).

Neben der Sensitivität gegen Aminoglykoside findet man in konditionalen *SEC20* Mutanten mit reprimierter *SEC20*-Expression auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Calcofluor White (Abb. 20). Die Substanz ist ein negativ geladener, fluoreszierender Farbstoff, der an wachsende Chitinketten über Wasserstoffbrücken und Dipol-Interaktionen bindet und dadurch die Ausbildung eines Kristallgitters und die Formation von Mikrofibrillen verhindert (Elorza *et al.*, 1983; Ram *et al.*, 1994). In Anwesenheit von Calcofluor White kommt es zur Sekretion von Mannoproteinen, wahrscheinlich durch eine Veränderung in der Bindung dieser Proteine an anderer Zellwandbestandteile (Murui *et al.*, 1985). Auch hier ist wieder, wie bei den Aminoglykosiden, ein ähnlicher Effekt in der *O*-Glykosylierungsmutante *pmt1* von *C. albicans* zu finden (Timpel *et al.*, 1998). Neben dem Zellwand angreifenden Agens Calcofluor White konnte in den konditionalen *SEC20* Mutanten auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Congo Red festgestellt werden. Da Congo Red ein an das Glukannetzwerk der Zellwand bindender Farbstoff ist und die Ausbildung von Mikrofibrillen verhindert (Kopecka und Gabriel, 1992), konnte man dieses Ergebnis erwarten.

C. albicans-Stämme mit reduzierter Sec20-Proteinmenge zeigen eine hohe Sensitivität gegen niedrige SDS-Konzentrationen im Medium. Dieses Verhalten hängt vermutlich mit Veränderungen in der Zellwand dieser Stämme zusammen und ist auch schon von *C. albicans pmt1*-Mutanten, sowie aus *S. cerevisiae*-Pkc-Mutanten bekannt (Timpel *et al.* 1998, Jacoby *et al.*, 1997). Auch in Sekretionsmutanten könnte dieser Effekt auf Defekte in der Zellwand zurückgeführt werden. Ob es sich um indirekte Effekte aufgrund von Transportdefekten oder direkte Effekte aufgrund von Glykosylierungsdefekten handelt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.5 *CaSEC20* hat Einfluß auf die ultrastrukturelle Zellmorphologie

Um die Funktion von Sec20p näher zu charakterisieren, wurde die ultrastrukturelle Zellmorphologie in *C. albicans*-Zellen mit normaler bzw. reduzierter *SEC20*-Expression untersucht. *C. albicans*-Zellen mit reduzierter *SEC20*-Expression zeigen eine veränderte intrazelluläre Membranstruktur. Eine extensive Anreicherung von Membranen konnte beobachtet werden (Abb. 21). Es handelt sich dabei um Membranstapel im Zytoplasma, die meist in drei Lagen übereinander auftraten. Worum es sich bei diesen Membranen handelt ist noch unklar. Auch in *S. cerevisiae* konnte bei verminderter *SEC20*-Expression eine Membrananreicherung beobachtet werden (Sweet und Pelham, 1992). Es wird spekuliert, daß sie mit dem Golgi fusionierte Vesikel darstellen, die aufgrund des Sec20p Mangels nicht mehr mit dem ER verschmelzen können (Lewis *et al.*, 1997). Allerdings könnte auch angenommen werden, daß es zu einer ER-Anreicherung kommt, die durch den indirekten Block des anterograden Transports bewirkt wird (Sweet und Pelham, 1992).

Der Prozess des ER-Golgi-Transports in *S. cerevisiae* kann im Elektronenmikroskop durch die Beobachtung von 50 nm Transportvesikel, die diesen Schritt ausführen, verfolgt werden (Kaiser und Schekman, 1990). Es werden zwei Gruppen von Sekretionsmutanten des ER-Golgi-Transports unterschieden. In *sec17* (SNAP-Protein), *sec18* (NSF) oder auch *sec22*-Mutanten (SNARE-Protein), die die Fusion der Vesikel blockieren, wurde eine Anreicherung dieser Vesikel beobachtet. In der anderen Gruppe von Mutanten, in denen der Schritt der Vesikelformation defekt ist, können keine Vesikel beobachtet werden, allerdings eine Anreicherung von ER-Membranen (Kaiser und Schekman, 1990; Shim *et al.*, 1991). Die Mutanten mit reduzierter *SEC20*-Expression, d. h. extensiver Membrananreicherung aber auch sichtbaren Vesikeln, können also weder der Vesikelformation noch der Vesikelfusion direkt zugeordnet werden.

Dieser Phänotyp, der ähnlich auch bei *S. cerevisiae* *tip20*- und *ufe1*-Mutanten (siehe 4.9) zu finden ist, ist eindeutig von einem Defekt im Vorwärtstransports, wie er z. B. in *sec18* Mutanten auftritt, zu unterscheiden. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß *sec18/sec20* Doppelmutanten und *ufe1/sec18*-Doppelmutanten Vesikel akkumulieren (Novick *et al.*, 1981, Lewis und Pelham, 1996). Eine *sec20*-Mutation stört also nicht die Vesikel-Bildung. Allerdings ist auch die Fusion möglich, da keine Vesikel akkumuliert werden. Es könnte daher eine Ziel-Richtungs-Funktion angenommen werden, d. h. es werden Vesikel gebildet, und sie können auch fusionieren, allerdings ist die gerichtete Fusion gestört. Wenn Sec20p am retrograden Golgi-ER-Transport beteiligt ist, könnte es sich bei den auf die Sekretion deutenden Phänotypen um indirekte Effekte handeln. Durch eine Störung des Recyclings verschiedener Proteine ist indirekt auch der anterograde Transport gestört. Ähnliches wurde auch bei *S. cerevisiae* in *tip20*- und *ufe1*-Mutanten diskutiert (Sweet und Pelham, 1993; Lewis und Pelham, 1996). Auch die Funktion dieser Proteine liegt im retrograden Transport. Es wird außerdem vermutet, daß es zu einem „uncoating“ der Vesikel kommt, wobei die folgende Fusion mit dem ER gestört ist. Dies würde den beobachteten Phänotyp erklären, da die nicht mehr ummantelten Vesikel instabil sind und wieder mit dem Golgi verschmelzen (Lewis *et al.*, 1997).

4.6 Einfluß von CaSec20p auf sekretierte „Indikator-Proteine“

Um zu untersuchen, ob CaSec20p einen Einfluß auf die Sekretion verschiedener Proteine hat, wurde die Sekretion der sauren Aspartatproteasen (Sap2p) sowie der Chitinase als „Indikator-Proteine“ untersucht. Die Überstände verschiedener *C. albicans*-Stämme, in denen *SEC20* unter der Kontrolle eines konditionalen Promotors exprimiert wurde, wurden untersucht. Durch die Anwesenheit von BSA im Medium wurde die Sap-Sekretion induziert und anschließend der BSA-Abbau sowie die Sap-Sekretion beobachtet. Es konnte festgestellt werden, daß das BSA im Überstand der Wildtyp-Zellen sowie im Überstand des Stammes CA2d2m (*sec20/MET3p-SEC20*) auch unter *MET3*-Promotor-reprimierenden Bedingungen nach 12 Stunden vollständig abgebaut war (Abb. 22). Mit Sap2-Antikörpern behandelte Western-Blots zeigten keinen Unterschied zwischen den Wildtyp-Zellen und der konditionalen Mutante in ihrer Sap2-Sekretion unter reprimierenden Bedingungen. Allerdings ist es wichtig zu betonen, daß die Repression der *SEC20*-Expression erst mit der Überführung in BSA Medium induziert wurde. Ein Wachstum der Mutanten (*sec20/MET3p-SEC20*) in Methionin/Cystein-haltigem Medium ist nicht möglich. Daher wurden die Zellen ohne Repression angezogen und erst zum Zeitpunkt 0 in reprimierendes Medium überimpft. Es könnte also durchaus sein, daß die bis dahin gebildete Sec20p-Menge ausreichend für die Sap-Sekretion ist und erst zu einem späteren Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden könnte. Diese Untersuchung ist allerdings nicht möglich, da zu einem späteren Zeitpunkt die Mutanten nicht mehr wachsen, was einen Vergleich der Stämme unmöglich macht. In Anwesenheit von Methionin und Cystein, unabhängig vom Stamm, ist der BSA-Abbau sowie die Sap2-Sekretion beschleunigt. Dies deutet auf eine Induktion der Sap-Sekretion durch die Aminosäuren hin.

Auch Versuche mit konditionalen Mutanten mit *SEC20*-Expression unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors zeigten eine unter allen Wachstumsbedingungen gleichbleibende Sap-Sekretion. Allerdings ist von anderen Sekretionsmutanten in *C. albicans* eine Veränderung der Sap-Sekretion bekannt. So konnte gezeigt werden, daß die dominant-negativen Allele von *CaSEC4(S28N)* und *CaYPT1(N121I)* bei Überexpression den BSA-Abbau verhindern. Bei den Proteinen handelt es sich um essentielle Ras-ähnliche GTPasen, die an der Fusion von Vesikeln mit dem Golgi (CaYpt1p) bzw. mit der Plasmamembran (CaSec4p) beteiligt sind (Lee *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 1999). Es handelt sich um Proteine, die am anterograden Transport beteiligt sind. Man kann also vermuten, daß das am retrograden Transport beteiligte Sec20p keinen Einfluß auf die Sekretion von Sap2p hat. Allerdings wäre doch ein indirekter Effekt zu vermuten gewesen, da aus *S. cerevisiae sec20*-Mutanten verschiedene Sekretionsphänotypen bekannt sind. So konnte z. B. gezeigt werden, daß es in *sec20-1*-Mutanten bei restriktiver Temperatur zu einem Transportblock der Carboxypeptidase Y (CPY) kommt (Cosson *et al.*, 1997). Dies ist bei permissiver Temperatur allerdings nicht der Fall. Im Gegensatz dazu wurde von Schleip (2001) gezeigt, daß es schon bei permissiver Temperatur in *sec20-2*-Mutanten zu einer Anreicherung der p1-Form der CPY kommt. Es wurde außerdem gezeigt, daß *sec20-2*-Mutanten einen Defekt in der Chitinase-Glykosylierung aufweisen (Schleip *et al.*, 2001). Chitinase, ein O-glykosyliertes Protein, das sowohl an der Zelloberfläche als auch im Kulturüberstand von *C. albicans*-Kulturen

zu finden ist (McCreath *et al.*, 1995), wurde als zweites „Indikator-Protein“ für die Untersuchung des Sekretionsweges eingesetzt. Aus *C. albicans* ist bekannt, daß in homozygot *pmt1*-disruptierten Stämmen eine im Vergleich zum Wildtyp höhere Chitinase-Aktivität im Medium zu finden ist, während die Chitinase-Aktivität an der Zelloberfläche vermindert ist. Hier geht man davon aus, daß eine Unterglykosylierung von Zellwandproteinen oder von der Chitinase selber die vermehrte Sekretion der Chitinase ins Medium bedingt (Timpel *et al.*, 1998). Wie oben beschrieben, konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, daß auch eine Mutation im *SEC20*-Gen zu einer Unterglykosylierung der Chitinase führt (Schleip *et al.*, 2001). Daher wurde angenommen, daß es bei einer Verminderung der *SEC20*-Expression in *C. albicans* zu einer Unterglykosylierung der Chitinase und damit verstärkter Sekretion kommen würde. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Es war keine Veränderung sowohl in der Chitinase-Aktivität im Kulturüberstand als auch an der Zelloberfläche zu erkennen (Abb. 23). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Repression der *SEC20*-Expression zwar ausreichend ist, um einige Supersensitivitätsphenotypen hervorzubringen, hingegen nicht ausreicht, um die Glykosylierung der Chitinase oder deren Sekretion zu verändern. Es wäre nun interessant, den Glykosylierungszustand der Chitinase durch Western-Blot zu analysieren. Da allerdings kein Antikörper gegen *C. albicans*-Chitinase zur Verfügung steht, ist diese Untersuchung zur Zeit nicht möglich.

4.7 Das CaSec20-Protein wird O-glykosyliert

Um das CaSec20-Protein näher untersuchen zu können, wurde ein C-terminales c-myc-Epitop eingeführt. Dieses Epitop wurde direkt N-terminal vor das vermutliche Retentionssignal (VDEL) gesetzt, da in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, daß eine Veränderung des HDEL-Signals in Sec20p zu einer verminderten Proteinmenge in der Zelle führte (Sweet und Pelham, 1992). Die Expression von *SEC20* wurde unter die Kontrolle des glukoseregulierten *PCK1*-Promotors gestellt. Die Epitop-markierte Version des Sec20-Proteins konnte im Western-Blot nachgewiesen werden. Drei unterschiedlich große Varianten des Proteins wurden detektiert (Abb. 24). Hauptsächlich wurde eine 50 kDa-Form gefunden und daneben zwei viel geringer produzierte Varianten mit einem Molekulargewicht von 38 kDa und 110 kDa. 38 kDa entsprechen dem theoretischen Molekulargewicht des 332 Aminosäuren umfassenden Sec20-Proteins ohne Modifikationen, aber mit seinem zusätzlichen c-myc-Epitop. Viele Proteine werden posttranslational modifiziert und erhalten dadurch ein von ihrer errechneten Größe abweichendes Molekulargewicht. Eine häufig auftretende Modifikation ist die Glykosylierung eines Proteins. Fast alle Glykoproteine der Hefe binden an das Lektin Concanavalin A (ConA). Mit Hilfe von ConA-Sepharose konnte gezeigt werden, daß es sich bei den größeren Formen von Sec20p um glykosylierte Formen des Proteins handelt. Im Gegensatz dazu ist die 38 kDa-Form die unglykosylierte Form von Sec20p (Abb. 25). Auch in *S. cerevisiae* konnten zwei Formen von ScSec20p mit unterschiedlicher Mobilität detektiert werden (Sweet und Pelham, 1992). Hier handelt es sich bei der Form mit geringerer Mobilität um ein glykosyliertes ScSec20p und bei der kleineren Form mit der höheren Mobilität um eine unglykosylierte Variante. Die Größenunterschiede scheinen geringer zu sein als bei

C. albicans. Absolute Werte sind allerdings nicht bekannt (Sweet und Pelham, 1992). Computeranalysen deuten sowohl auf potentielle *N*- als auch auf *O*-Glykosylierungsstellen im CaSec20p. Da durch die Behandlung mit PNGase F keine Änderung im Laufverhalten des Proteins erreicht werden konnte, ist davon auszugehen, daß es sich nicht um eine Modifikation durch *N*-Glykosylierung handelt. Dieses Ergebnis steht im Gleichklang mit der Annahme, daß es sich bei CaSec20p um ein Typ II-integrales Membranprotein handelt. Die vorhergesagten potentiellen *O*-Glykosylierungsstellen befinden sich im ER-Lumen, wohingegen die putative *N*-Glykosylierungsstelle im Zytoplasma lokalisiert ist. Es zeigte sich also, daß Sec20p *O*-glykosyliert ist, und außerdem wurde dadurch die Vermutung der Orientierung des Proteins im ER bestätigt. Durch die gezeigte *O*-Glykosylierung kann geschlossen werden, daß Sec20p vom ER zunächst in den Golgi (zur Modifikation) transportiert wird. Die *O*-Glykosylierung in *C. albicans* beginnt im ER und wird im Golgi fortgesetzt (Ernst und Prill, 2001). Es ist daher anzunehmen, daß Sec20p erst nach Modifikation im Golgi seine eigentliche Lokalisation in der ER-Membran findet (siehe unten). Das verdeutlicht die potentielle Bedeutung des VDEL-Retentionssignals.

Allerdings konnte nicht geklärt werden, wie es zu dieser sehr großen Veränderung des Molekulargewichts des Sec20p kommt. Durch Modifikation des Proteins wird es um 12 kDa vergrößert (38 kDa unmodifiziert zu 50 kDa modifiziertem Protein). Es ist bekannt, daß die Addition einer Mannose eine Molekulargewichtsveränderung von 162 Da bedingt (<http://www.abrf.org/ABRF/ResearchCommittees/deltamas/deltamass.html>). In *C. albicans* Sec20p gibt es 19 Serin-/Threonin-Reste im C-terminalen Bereich (Abb. 9). Wenn man nun davon ausginge, daß jeweils eine Kette aus fünf Mannosen bei der *O*-Glykosylierung angehängt werden, müßten 15 Serin-/Threonin-Reste glykosyliert werden, um diese Molekulargewichtsveränderung auszulösen. Kürzlich wurde allerdings gezeigt, daß lineare *O*-Mannoseketten an der zweiten Mannose Manno-phosphoryliert werden können (Nakayama *et al.*, 1998). Dieses könnte zu einem Ansatzpunkt für eine zweite Mannosekette, und damit zu einer größeren Molekulargewichtsveränderung pro Serin/Threonin, führen (Jigami und Odani, 1999).

Bisher ist noch keine Konsensussequenz für die *O*-Glykosylierung von Proteinen gefunden worden (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Um Glykosylierungsstellen im Sec20-Protein näher einzuengen, wurden verschiedene Mutationen eingeführt (Abb. 29). Die auszutauschenden Aminosäuren wurden durch einen Sequenzvergleich mit dem *S. cerevisiae* Sec20-Protein ausgewählt. Da auch ScSec20p *O*-glykosyliert ist (Sweet und Pelham, 1992), wurde angenommen, daß die Glykosylierungsstellen möglicherweise konserviert sind. Sieben besonders konservierte Serin/Threonin-enthaltende Stellen des Proteins wurden ausgewählt und gegen Alanin ausgetauscht. Diese Aminosäuren befinden sich alle im luminalen, C-terminalen Bereich des Proteins (Abb. 29). Zusätzlich wurde die einzige potentielle *N*-Glykosylierungsstelle, die im zytosolischen Teil des Proteins liegt, mutagenisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutagenese einiger der potentiellen *O*-Glykosylierungsstellen die Laufgeschwindigkeit des Proteins im Gel leicht erhöhen, wohingegen die Veränderung der *N*-Glykosylierungsstelle keinen Einfluß auf das Laufverhalten des Proteins im Gel hat (Abb. 30). Es wird deutlich, daß zumindest ein Teil der Glykosylierung an Aminosäuren in der

Serin/Threonin-reichen Region des Proteins erfolgt. Es konnten vier potentielle O-Glykosylierungsstellen identifiziert werden bei deren Mutation das Laufverhalten des Proteins im Gel verändert wurde (TT284AA; SS278AA; TLS299ALS; SAS271AAA; Abb. 30). Auch bei der Mutation TKT293AKA wurde ein leicht erhöhtes Laufverhalten des Proteins detektiert. Hier war allerdings sehr auffällig, daß die detektierte Proteinmenge im Vergleich zu den anderen Mutanten viel geringer war. Ein Zusammenhang mit der von Threonin eingerahmten Aminosäure Lysin könnte vermutet werden. Über Lysin wird an Substratproteine Ubiquitin, ein hochkonserviertes Polypeptid mit einer Größe von 76 Aminosäuren, kovalent verknüpft. Die Ubiquitin-Modifikation spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Abbauprozessen in der Zelle (Hochstrasser, 1996; Jentsch und Schlenker, 1995). Es könnte also angenommen werden, daß durch Mutation in der direkten Umgebung dieses Lysins ein beschleunigter Abbau stattfindet.

Eine Modifikation in der besonders Serin/Threonin-reichen Aminosäuresequenz, TTSS321AAAA, die auch in *S. cerevisiae* zu finden ist, verhinderte völlig die Detektion des Proteins. Dieses der Expression in *pmt*-Mutanten ähnliche Ergebnis könnte hier durch einen Stabilitätsverlust des Proteins ohne diese spezielle Glykosylierung erklärt werden. Es scheint also sicher zu sein, daß die „TTSS“-Sequenz am C-terminalen Ende des Proteins glykosyliert wird und diese Glykosylierung essentiell für die Stabilität des Proteins in der Zelle ist.

4.8 Sec20p wird durch O-Glykosylierung stabilisiert

An der O-Glykosylierung ist in *C. albicans* die *PMT*-Genfamilie beteiligt. Diese besteht fünf homologen Genen, von denen bisher drei disruptiert wurden (Timpel *et al.*, 1998, 1999, Stephan Prill, persönliche Mitteilung). Um die O-Glykosylierung von CaSec20p näher zu untersuchen, wurde die Epitop-markierte Variante des Proteins in den unterschiedlichen *pmt*-Mutanten (*pmt1*, *pmt4* und *pmt6*-Mutanten) exprimiert. Eine Detektion des Sec20p war nur in der *pmt6*-Mutante möglich, in *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten konnte unter denselben Versuchsbedingungen kein Protein detektiert werden (Abb. 26).

Die Glykosylierung scheint also mit der Expression oder der Stabilität des Proteins in Verbindung zu stehen. Mit Hilfe der durchgeführten Pulse-Chase-Experimente konnte gezeigt werden, daß zunächst unglykosyliertes Sec20p (38 kDa Form) gebildet wird, welches in ca. 30 Minuten zur 50 kDa Form glykosyliert wird. Die Produktion von Sec20p ist in den *pmt1*-Mutanten nicht beeinträchtigt. Dieses wird dadurch deutlich, daß eine vergleichbare Menge unglykosyliertes Protein auch in diesen Mutanten gebildet wird (Abb. 28). Allerdings kommt es hier nach der Synthese des unglykosylierten Proteins nicht zu einer Glykosylierung. Nach einem „chase“ von 30 Minuten ist die 38 kDa-Form nicht mehr zu detektieren. Dieses läßt die Annahme zu, daß Sec20p abgebaut wurde. Man kann also davon ausgehen, daß Sec20p ohne Stabilisierung des Proteins durch Glykosylierung nicht stabil ist. Es könnte allerdings auch postuliert werden, daß die Glykosylierung nicht direkt für die Stabilität, sondern für die Lokalisation des Proteins wichtig ist. Wenn man annimmt, daß die Glykosylierung für die Retention des Proteins im ER notwendig ist, könnte es in *pmt1*-Mutanten zur Sekretion oder dem

Export des Proteins aus dem ER ins Proteasom kommen, wo es abgebaut wird. Die Bedeutung der *O*-Glykosylierung für die Retention von Proteinen im ER ist von Harty (2001) beschrieben worden. Es wurde gezeigt, daß ein mutierter Alpha-Faktor in Hefe, der auf Grund seiner Mutation nicht mehr *N*-, sondern *O*-glykosyliert wird, im ER-Lumen angereichert wird. Diese *O*-Glykosylierung wird von ScPmt2p durchgeführt und bedingt die Retention des Proteins im ER. Bei einer Deletion von Pmt2p wurde die *O*-Glykosylierung verhindert und dadurch der Abbau des Proteins beschleunigt (Harty *et al.*, 2001). Der Transport von falsch gefalteten Proteinen vom ER ins Zytosol findet, genau wie der Import ins ER, mit Hilfe der Sec61p-Translokationspore statt (Römisch, 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, daß andere Bereiche der Pore für diesen Export von Proteinen als für den Import von Proteinen benötigt werden (Zhou und Schekman, 1999). Für den Export von Protein ist eine Interaktion des Proteins mit der Transmembrandomäne oder dem luminalen Teil der Pore notwendig (Zhou und Schekman, 1999). Daß *O*-Glykosylierung den Export aus sterischen Gründen verhindert, ist allerdings kaum anzunehmen, da gezeigt wurde, daß falschgefaltete Proteine mit vielen N-Glykan-Seitenketten auch durch die Translokationspore ins Zytosol gebracht werden (Plempner *et al.*, 1997). Es ist viel mehr wahrscheinlich, daß eine durch die *O*-Glykosylierung ausgelöste Konformationsänderung den Export verhindert und es zu einer ER-Anreicherung kommt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die *O*-Glykosylierung des CaSec20p nicht essentiell für seine Funktion ist, da *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten lebensfähig sind. Es kann angenommen werden, daß die Glykosylierung zwar den Proteinabbau verlangsamt, daß aber auch ohne diese Stabilisierung noch ausreichend funktionsfähiges Sec20p in der Zelle für den Erhalt der Lebensfähigkeit vorliegt.

4.9 Interaktionspartner von CaSec20p

Um mögliche Interaktionspartner von CaSec20p zu finden, wurde zunächst eine Computeranalyse durchgeführt. Über den Vergleich mit bekannten Interaktionspartnern von ScSec20p wurden Gene für zwei mögliche Kandidaten im *C. albicans*-Genom gefunden. Die *C. albicans*-Homologen zu den *S. cerevisiae*-Genen *ScUFE1* (Lewis und Pelham, 1996) und *ScTIP20* (Sweet und Pelham, 1993) wurden kloniert.

4.9.1 CaUfe1p

Nach der Klonierung von *C. albicans UFE1* sollte überprüft werden, ob *CaUFE1* auch in *S. cerevisiae* funktionell ist. In *S. cerevisiae* ist ScUfe1p mit der Syntaxin-Familie der t-SNARE's, vor allem mit dem im cis-Golgi lokalisierten ScSed5p verwandt (Lewis und Pelham, 1996). Da es weder für die Vesikelformation noch für die Vesikelfusion notwendig ist, geht man auch hier wie bei Sec20p und Tip20p davon aus, daß es am retrograden Transport als t-SNARE im ER beteiligt ist. Ein weiteres Indiz dafür ist, daß ScUfe1p-Mutanten sowohl einen Defekt im Golgi-ER-Rücktransport von Emp47p (ein Protein mit einem Dilysinmotiv) als auch von Erd2p (ein Protein mit einem HDEL-Motiv) zeigten (Lewis und Pelham, 1996).

Es konnte hier nachgewiesen werden, daß *CaUFE1* einen Defekt von *ScUFE1* komplementieren kann. Die Identität der Aminosäuresequenz von 30 % ist offenbar ausreichend, um diese Komplementation zu ermöglichen. Besonders wichtig erscheint dabei, daß die schon aus *ScUfe1p* bekannte Aminosäure (Asparaginsäure) zur Interaktion mit einem Arginin in *ScSec20p* auch in *CaUfe1p* zu finden ist. Diese interagierenden Aminosäuren sind in allen vier Proteinen (*CaSec20p*, *CaUfe1p* und *ScSec20p*, *ScUfe1p*) direkt hinter der TMD des Proteins im luminalen Teil lokalisiert (Abb. 33) und ermöglichen eine Proteinassoziation durch die Interaktion zwischen einer positiv- und einer negativ-geladenen Aminosäure. Die Mutation dieser Aminosäure in *ScUfe1p* ist letal, wenn nicht gleichzeitig in *ScSec20p* eine Mutation zur Rekonstitution des interagierenden Paares durchgeführt wird (Lewis *et al.*, 1997). Der Komplementationsversuch zeigt, daß das *CaUfe1p* in *S. cerevisiae* funktionell ist. Dies bedeutet, daß die Interaktion mit *ScSec20p* rekonstituiert werden kann. *CaSec20p* konnte allerdings *ScSec20p* nicht komplementieren. Wie hier gezeigt wurde, liegt die Ursache nicht in einer fehlenden Interaktion mit *Ufe1p*, sondern ist auf andere Faktoren zurückzuführen.

Aus den oben beschriebenen Komplementationsversuchen kann man schließen, daß *CaUFE1* nicht nur eine Sequenzhomologie zu *ScUFE1* zeigt, sondern auch funktionell nahe mit diesem t-SNARE verwandt ist. In *S. cerevisiae* konnte außerdem eine Interaktion von *ScUfe1p* mit *ScSec22p* gezeigt werden (Lewis *et al.*, 1997). Die tatsächliche Funktion von *Sec22p* im vesikulären Transport ist noch nicht geklärt. Momentan wird neben seiner Funktion als t-SNARE des Golgi (Parlati *et al.*, 2000) auch seine Funktion als v-SNARE auf COPI-Vesikeln im retrograden Transport angenommen (Lewis *et al.*, 1997). Auch in *C. albicans* konnte durch Computeranalyse ein Homolog zu *ScSec22p* identifiziert werden. Es ist also durchaus möglich, daß auch in *C. albicans* *Ufe1p* als t-SNARE mit dem v-SNARE *Sec22p* der COPI-Vesikel an der ER-Membran interagiert (Abb. 40).

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß das t-SNARE *ScUfe1p* neben seiner Funktion im retrograden vesikulären Transport auch an der homotypischen Membranfusion von ER-Membranen beteiligt ist (Latterich *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1998). Homotypische Membranfusion bedeutet, daß die fusionierenden Membranen einen gleichen Ursprung haben. Hierbei bedingt eine t-/t-SNARE Interaktion in Anwesenheit der NSF-verwandten ATPase *Cdc48p* eine Fusion von ER-Membranen (Patel *et al.*, 1998). Durch die gezeigte Komplementation der *ufe1-1* Mutante ist davon auszugehen, daß auch diese Aufgabe von *CaUfe1p* übernommen werden kann. Es wurde gezeigt, daß die temperatursensitive Mutante *ufe1-1* beide Fusionsdefekte aufweist, daher auch beide komplementiert werden müssen. Dies läßt vermuten, daß auch *C. albicans* *Ufe1p* eine mögliche Rolle in der homotypischen Membranfusion im Verlauf der Zellteilung spielt.

4.9.2 CaTip20p

Nach der Klonierung von *C. albicans* *TIP20* sollten Komplementationsversuche zeigen, ob CaTip20p auch in *S. cerevisiae* funktionell ist. Nach Einbringen des Gens auf einem Plasmid in einen temperatursensitiven *S. cerevisiae* *tip20-5*-Stamm konnte gezeigt werden, daß *CaTIP20* das *S. cerevisiae*-Homolog nicht komplementieren kann. Die Identität in der Aminosäuresequenz dieser beiden Homologe beträgt 19 %. Von *S. cerevisiae* ist bekannt, daß ScTip20p ein zytoplasmatisches Protein ist, das mit dem zytoplasmatischen Teil von ScSec20p interagiert (Frigerio, 1998). In diesem Teil ist die Homologie der Sec20-Proteine geringer als im TMD-Bereich oder im luminalen Teil. Zusätzlich fehlen dem CaSec20p in diesem Bereich 95 Aminosäuren (Abb. 10). Man kann vermuten, daß diese Abweichungen eine Interaktion von CaTip20p mit ScSec20p verhindern. Dies steht in Gleichklang mit den Ergebnissen der Disruptionsversuche in *S. cerevisiae*. Da eine N-terminale Verkürzung des *S. cerevisiae* Sec20p für die Zelle letal war, könnte man vermuten, daß die ScTip20p/ScSec20p-Interaktion in *S. cerevisiae* außerhalb des zu CaSec20p homologen Bereiches liegt. Andererseits könnte natürlich auch eine Identität von 19% der beiden Tip20p für eine Komplementation nicht ausreichen.

Trotzdem vermuteten wir weiterhin, daß es sich bei dem klonierten *CaTIP20*-Gen um das Gen handelt, das ein zu ScTip20p homologes Protein kodiert, welches mit CaSec20p interagiert. Die beiden *C. albicans* Proteine weisen einen ähnlichen CAI (Kodon Adaptation Index) auf. Dieser beträgt für *CaTIP20*-Gen 0,17 und für *CaSEC20*-Gen 0,19 (<http://alces.med.umn.edu/bin.webcuse>). Der CAI gibt einen theoretischen Wert für die Häufigkeit eines Proteins in der Zelle an (Sharp und Li, 1987). Bei Interaktionspartnern mit einem vergleichbaren CAI geht man davon aus, daß die Proteine eine 1:1-Interaktion eingehen (Coghlan und Wolfe, 2000). Ähnliche Schlußfolgerungen wurden auch schon bei *S. cerevisiae* gezogen (Sweet und Pelham, 1993). Hier beträgt der CAI für *ScSEC20* 0,09 (Sweet und Pelham, 1992), was genau dem Wert für *ScTIP20* entspricht (Sweet und Pelham, 1993).

Da dieser Wert nur einen indirekten Hinweis auf eine Interaktion gibt, wurden „Two-Hybrid“-Analysen mit CaTip20p und CaSec20p zunächst in *S. cerevisiae* durchgeführt. Abgeleitet von den Verhältnissen in *S. cerevisiae* wurde davon ausgegangen, daß der zytoplasmatische Teil von Sec20p für die Interaktion mit Tip20p notwendig ist, da es sich bei Tip20p um ein zytoplasmatisches Protein ohne Signalsequenz oder TMD handelt. Es konnte tatsächlich eine Interaktion des zytoplasmatischen Teils von CaSec20p mit CaTip20p in der „Two-Hybrid“-Analyse nachgewiesen werden. Dabei wurde kein Unterschied gefunden, ob Tip20p an die Gal4-Binde- oder Aktivierungsdomäne fusioniert war (Abb. 35).

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß die Überexpression des zytosolischen Teils von ScSec20p toxisch ist. Erst die gleichzeitige Überexpression von ScTip20p machte die Zellen wieder lebensfähig. Der zytosolische Teil von ScSec20p interagiert mit ScTip20p, wodurch die essentielle Interaktion des intakten ScSec20p mit ScTip20p verhindert wird (Sweet und Pelham, 1993). Auch in *C. albicans* scheint die Überproduktion des zytosolischen Teils von Sec20p nicht möglich zu sein. Bei Transformation mit dem entsprechenden Plasmid wurden zwar

Transformanten erhalten, allerdings konnte das Protein nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann man davon ausgehen, daß entweder schon die Expression des verkürzten Proteins verhindert wird oder der sofortige Abbau stattfindet.

Im Verlauf der „Two-Hybrid“-Analyse wurde zusätzlich gezeigt, daß Tip20p in der Lage ist, Homodimere zu bilden (Abb. 37). Bei gleichzeitiger Expression von zwei CaTip20-Fusionsproteinen, fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne und Gal4-Bindedomäne, konnte eine Tip20p-Tip20p-Interaktion und die Aktivierung des *GAL*-Promotors beobachtet werden. Diese Experimente wurden durch die hohe Hintergrundaktivität der BD-Tip20p-Fusion erschwert; die quantitative Auswertung der β -Galaktosidase-Aktivität ergab aber eindeutig erhöhte Werte in den Doppeltransformanten. Es kann daher angenommen werden, daß CaTip20p in der Zelle als Homodimer vorliegt. Neben zwei „Leucin-Zipper“-Motiven enthält CaTip20p auch eine „coiled-coil“-Region, die es zu einer Dimerbildung befähigt (http://hits.isb-sibch/cgi-bin/PFSCAN_parser). Leucin-Zipper-Motive können neben einer DNA-Bindung auch zur Dimerbildung dienen (O’Shea *et al.*, 1989). In *S. cerevisiae* ergaben kürzlich durchgeführte Two-Hybrid-Screens, daß Tip20p mit einem weiteren Protein, Dsl1p, interagiert (Ito *et al.*, 2001). Auch Dsl1p enthält wie Tip20p ein Leucin-Zipper-Motiv (Sen-Gupta *et al.*, 1997). In ScDsl1p-Mutanten (dependent on **SLY1**) ist das sonst nicht essentielle Sec22p essentiell (Andag *et al.*, 2001). All dies spricht dafür, daß Dsl1p (Gen-*YNL258C*) in *S. cerevisiae* eine Funktion auch im retrograden Proteintransport hat. In *C. albicans* konnte allerdings durch Computeranalyse kein Homolog gefunden werden. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die in *S. cerevisiae* stattfindende ScTip20p/ScDsl1p-Interaktion im Zytoplasma in *C. albicans* durch eine Homodimerbildung von CaTip20p ersetzt wird.

Neben der „Two-Hybrid“-Analyse wurde die Interaktion zwischen CaSec20p und CaTip20p durch Koimmunpräzipitation hier biochemisch nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Methode ist eine gesicherte Aussage über die Interaktion der Proteine *in vivo* möglich. Zunächst wurde ein Gen für ein C-terminal Epitop-markiertes CaTip20-Protein konstruiert und in Wildtyp-*C. albicans* exprimiert. Es wurden zwei unterschiedlich große Tip20-Proteine im SDS-PAGE detektiert, und zwar sowohl ein 87 kDa großes Protein, das dem errechneten Molekulargewicht von Tip20p entspricht, als auch ein 100 kDa Protein (Abb. 39). Wodurch dieser Größenunterschied zustande kommt, oder ob es sich bei dem kleineren Protein um ein Abbauprodukt handelt, wurde nicht näher untersucht. Mit Hilfe von CaSec20p konnte CaTip20p präzipitiert werden. Dies war sowohl *in vitro*, d. h. mit Rohextrakten aus verschiedenen Zellen möglich als auch *in vivo*, d. h. mit Rohextrakten von Zellen, die sowohl CaSec20p als auch CaTip20p produzieren. Die durchgeführten Kopräzipitationsversuche ergaben allerdings, daß nur das 100 kDa-Protein mit Sec20p interagiert, so daß man möglicherweise bei dem 87 kDa-Protein von einem Abbauprodukt von Tip20p ausgehen kann.

4.10 Modell zum retrograden Proteintransport in *C. albicans*

Aus den hier erhobenen Daten ergibt sich folgendes Modell:

Es läßt sich vermuten, daß ein Wechsel zwischen CaTip20p als Homodimer im Zytosol oder als Heterodimer mit Sec20p an der ER-Membran vorliegt (Abb. 40). Wodurch dieser Wechsel ausgelöst wird, und was er bewirkt, ist nicht bekannt. Die Interaktion von CaTip20p mit dem zytosolischen Anteil von CaSec20p könnte mit der Funktion von ScSly1p in *S. cerevisiae* verglichen werden. Auch hier interagiert ein zytosolisches Protein (Sly1p) mit einem freien t-SNARE (Sed5p) (Cao *et al.*, 1998). Sobald das t-SNARE allerdings mit einem v-SNARE interagiert, diffundiert das zytosolische Protein wieder ab (Pevsner *et al.*, 1994). Im Fall von CaTip20p könnte es dann zu einer Homodimerbildung kommen. Allerdings ist für Tip20p in *S. cerevisiae* bekannt, daß es auch im Komplex mit Sec20p assoziiert bleibt. So konnte ein Komplex aus Sec20p, Ufe1p, Tip20p und Sec22p isoliert werden (Lewis *et al.*, 1997).

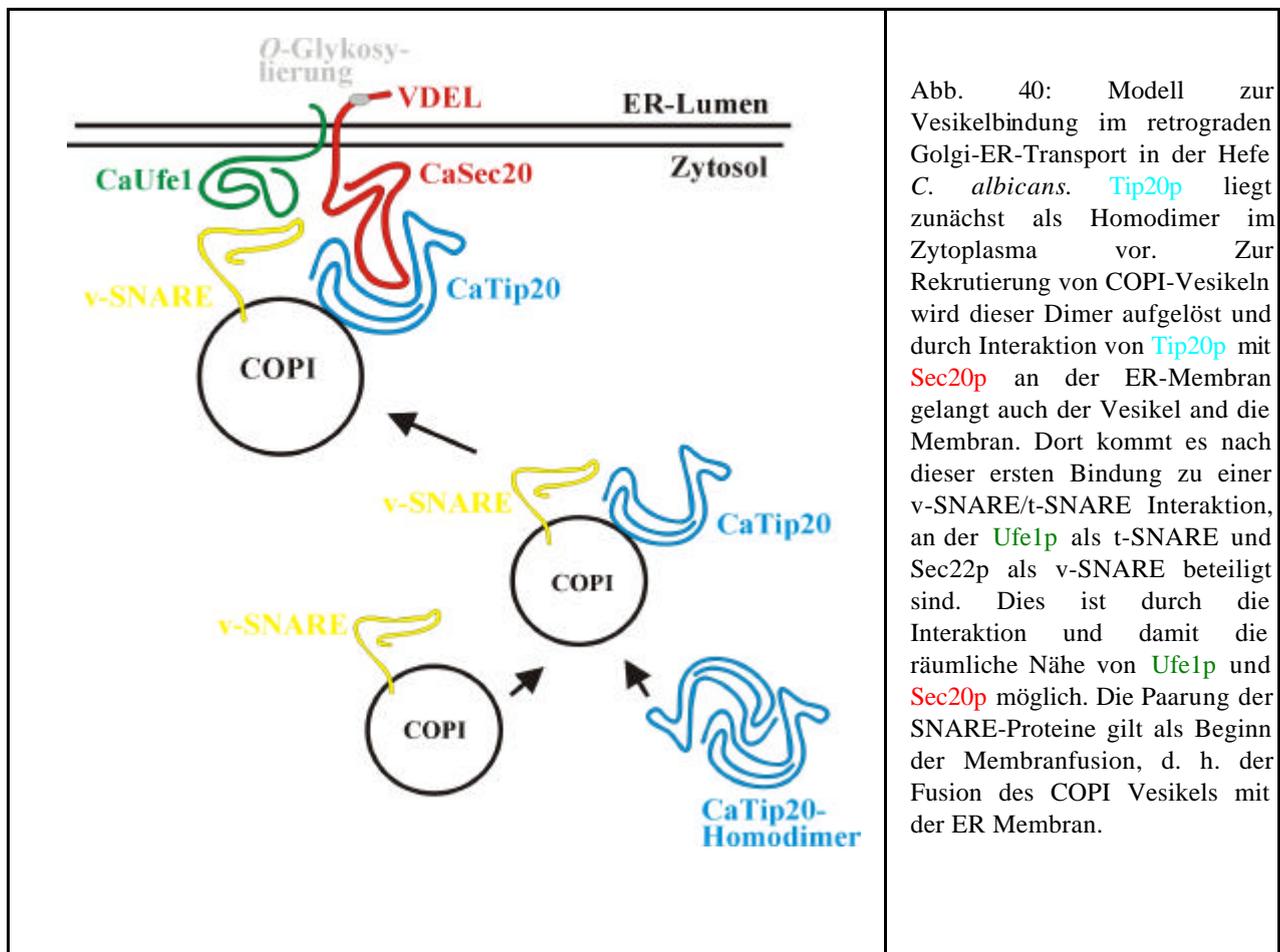


Abb. 40: Modell zur Vesikelbindung im retrograden Golgi-ER-Transport in der Hefe *C. albicans*. Tip20p liegt zunächst als Homodimer im Zytoplasma vor. Zur Rekrutierung von COPI-Vesikeln wird dieser Dimer aufgelöst und durch Interaktion von Tip20p mit Sec20p an der ER-Membran gelangt auch der Vesikel an die Membran. Dort kommt es nach dieser ersten Bindung zu einer v-SNARE/t-SNARE Interaktion, an der Ufe1p als t-SNARE und Sec22p als v-SNARE beteiligt sind. Dies ist durch die Interaktion und damit die räumliche Nähe von Ufe1p und Sec20p möglich. Die Paarung der SNARE-Proteine gilt als Beginn der Membranfusion, d. h. der Fusion des COPI Vesikels mit der ER Membran.

In *S. cerevisiae* wird bei der Bindung von COPII Vesikeln an die Golgi-Membran das Protein Uso1p benötigt (Sapperstein *et al.*, 1996). Dieses als Homodimer zunächst im Zytosol vorliegende Protein wird Ypt1p-abhängig an die Golgimembran gebracht (Jones *et al.*, 2000). Der Homodimer wird als der Bindefaktor der vom ER kommenden Vesikel angesehen. Durch die Bindung von Uso1p an den TRAPP-Komplex des Golgi kommt es zur ersten Bindung der Vesikel, der die Interaktion der t- und v-SNARE Proteine folgt (Barrowmann *et al.*, 2000). Ein ähnliches Szenario könnte auch für CaTip20p angenommen werden (Abb. 40). Tip20p rekrutiert möglicherweise die COPI-Vesikel an die ER-Membran durch seine Bindung mit Sec20p. Dadurch ist eine Interaktion des v-SNARE auf dem COPI-Vesikel mit dem t-SNARE Ufe1p möglich. Sec20p dient also nicht als klassisches SNARE-Protein, das mit einem SNARE des Vesikels interagiert, sondern als Rekrutierungshilfe, vergleichbar mit dem TRAPP-Komplex des Golgi. Für die ER-Membran sind noch keine TRAPP-Proteine isoliert worden.

5 Zusammenfassung

Im klassischen Sekretionsweg der Eukaryoten vermitteln intrazelluläre Vesikel den Proteintransport zwischen den Zellkompartimenten. Neben dem anterograden Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi ist auch der umgekehrte retrograde Weg von Bedeutung, um Sekretionskomponenten in das Ausgangskompartiment zurückzuholen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Sec20p und assoziierten Proteinen spezifische Komponenten des retrograden Vesikeltransports in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* charakterisiert.

Sequenzanalysen ergaben, daß CaSec20p ein 332 Aminosäuren-großes Protein mit 27 % Identität zu seinem *Saccharomyces cerevisiae*-Homologen ScSec20p ist. CaSec20p ist ein Typ II-integrales Membranprotein mit einer großen zytoplasmatischen Domäne, die allerdings im Vergleich zu ScSec20p um 95 Aminosäuren verkürzt ist. Eine kurze C-terminale Domäne des CaSec20p befindet sich im ER-Lumen und weist ein potentielles Retentionssignal (VDEL) auf. Durch Epitop-Markierung des Proteins konnte seine Lokalisation im perinukleären Bereich des ER festgestellt werden. Mutanten, in denen *SEC20* unter der Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotor exprimiert wurde, konnten unter Promotor-reprimierenden Bedingungen nicht wachsen. Hiermit wurde gezeigt, daß *SEC20* ein essentielles Gen ist. Stämme mit verminderter *SEC20*-Expression (*SEC20* unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors) waren supersensitiv gegen die Antimykotika Hygromycin B, G418, Neomycin, Nystatin sowie gegen SDS, Calcofluor White und Congo Red. Außerdem kam es zu einer extensiven, intrazellulären Membrananreicherung in diesen Stämmen, wobei meistens Stapel mit drei übereinanderliegenden Membranen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar waren.

Sec20p weist mehrere *O*-Glykosylierungsstellen im luminalen C-Terminus auf, deren Modifikation zum Teil essentiell für die Stabilität des Proteins ist. In *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten, die Defekte in bestimmten Proteinmannosyltransferase-Isoformen aufweisen, wird Sec20p nicht *O*-glykosyliert und dadurch instabil. Es kann vermutet werden, daß *O*-Glykosylierung die Dislokation des Proteins aus dem ER und damit seinen Abbau an zytoplasmatischen Proteasomen verhindert.

Mit CaUfe1p und CaTip20p wurden zwei weitere am vesikulären Transport beteiligte Proteine identifiziert. CaUfe1p ist dem aus *S. cerevisiae* bekannten t-SNARE des ER homolog und kann dieses in *S. cerevisiae*-Mutanten ersetzen. Mit genetischen und biochemischen Methoden wurde eine Interaktion zwischen CaSec20p und CaTip20p gezeigt. Sec20p weist zwar die Strukturmerkmale eines t-SNAREs auf, hat aber keinerlei Sequenzhomologie zu bekannten SNAREs und könnte über Tip20p die Bindung von COP I-Vesikeln vermitteln.

Mit der Klonierung und Charakterisierung von drei bisher nicht beschriebenen Genen konnten dem Sekretionsweg in *C. albicans* neue Komponenten hinzugeführt werden. Die Bedeutung dieser Komponenten für die Lebensfähigkeit und Virulenz sowie ihre Pilzspezifität könnten die Basis für die Entwicklung neuartiger Antimykotika sein.

6 Literaturverzeichnis

- Albright C.F. und P.W. Robbins (1990) The sequence and transcript heterogeneity of the yeast gene *ALG1*, an essential Monnosyltransferase involved in *N*-glycosylation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7042-49
- Andag, U., Neumann, T. und H.D. Schmitt (2001) The coatomer interaction protein Dsl1p is required for Golgi-to-ER retrieval in yeast. *J. Biol. Chem.* (in press)
- Backen, A.C. (2000) Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. *Yeast*, **16**, 1121-1129
- Baggett, J.J. und B. Wendland (2001) Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic*, **2**, 297-302
- Ballou, L., Hitzeman, R.A., Lewis, M.S. und C.E. Ballou (1991) Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3209-12
- Barlowe, C. (2000) Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic*, **1**, 371-77
- Barlowe, C. und R. Schekman (1993) *SEC12* encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, **365**, 347-9
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und R. Schekman (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **17**, 895-907
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und R. Schekman (1994) COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **77**, 895-907
- Barrowman, J., Sacher, M. und S. Ferro-Novick (2000) TRPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *EMBO J.*, **19**, 862-9
- Bause, W. und L. Lehle (1979) Enzymatic *N*-glycosylation and *O*-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **101**, 531-40
- Beckerman, J., Chibana, H., Turner, J. und P.T. Magee (2001) Single-copy *IMH3* allele is sufficient to confer resistance to mycophenolic acid in *Candida albicans* and to mediate transformation of clinical *Candida* species. *Infect. Immun.*, **69**, 108-114
- Bednarek, S.Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdet, M., Perrelet, A., Schekman, R. und L. Orci (1995) COPI und COPII bud vesicles directly from the ER. *Cell*, **83**, 1183-96
- Bedwell, D.M., Strobel, S.A., Yun, K., Jongeward, G.D. und S.D. Emr (1989) Sequence and structural requirements of a mitochondrial protein import signal defined by saturation cassette mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1014-25
- Bennett, J.E. (1996) Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Goodman and Gilman's "The pharmacological basis of therapeutics" pp. 1165-1181. Pergamon Press. Elmsford, NY
- Bennykh, S.I., Nishimura, N. und W.E. Balch (1998) Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol.*, **8**, 21-5
- Block M.R., Glick B.S., Wilcox C.A., Wieland F.T. und J.E. Rothman (1988) Purification of an *N*-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7852-6
- Bock, J.B. und R.H. Scheller (1999) SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12227-9
- Bodey, G.P. (1993) What's new in fungal infection in leukemic patients. *Leuk. Lymphoma*, **11**, 127-35
- Boehm, J., Letourneur, F., Ballensiefen, W., Ossipov, D., Demolliere, C. und H.D. Schmitt (1997) Sec12p requires Rer1p for sorting to coatomer (COPI)-coated vesicles and retrieval to the ER. *J. Cell Sci.*, **110**, 991-1003
- Bouchara, J.P., Tronchin, G., Annaix, V., Robert, R. und J.M. Senet (1990) Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.*, **58**, 48-54

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54
- Brassart, D., Woltz, A., Golliard, M. und Neeser, J.R. (1991) *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha1-2Gal beta bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.*, **59**, 1605-1613
- Bretscher, M.S. und S. Munro (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, **261**, 1280-81
- Brown, Jr.D.H., Siobodkin, I.V. und C.A. Kumamoto (1996) Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 75-80
- Bruckmann, S., Kunkel, W., Hartl, H., Wetzker, R. und R. Eck (2000) A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence. *Microbiology*, **146**, 2755-64
- Buffo, J., Herman, M.A. und Soll, D.R. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, **85**, 21-30
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und J.M. Short (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-78
- Buurman, E.T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A.J.P., Odds, F.C. und N.A.R. Gow (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7670-5
- Calderone, R.A. und P.C. Braun (1991) Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **55**, 1-20
- Cameron B.J., und L.J. Douglas (1996) Blood group glycolipids as epithelial cells receptors for *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **64**, 891-896
- Campbell, J.L. und R.S. Schekman (1997) Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum-derived COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 837-42
- Cannon, R.D., Jenkinson, H.F. und M.G. Shepherd (1992) Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinases genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 452-57
- Cao, X., Ballew, N. und C. Barlowe (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.*, **17**, 2156-65
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M. und P.E. Sudbery (1999) The *Met3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.*, **34**, 792-98
- Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Basch, A., Sentandreu, R. und J.P. Martinez (1992) Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **69**, 4221-29
- Cassone, A., Sullivan, P.A. und Shepherd, M.G. (1985) N-Acetyl-D-glucosamine-induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiologica*, **8**, 85-99
- Celenza J.L. und M. Carlson (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5034-44
- Chapman, R.E. und S. Munro (1994) Teh functioning of the yeast Golgi apparatus requires an ER protein encoded by ANP1, a member of a new family of genes affecting the secretory pathway. *EMBO J.*, **13**, 4896-907
- Chen, M.W., Anne, J., Volckaert, G., Huysmans, E., Vandenbergh, A. und R. De Wachter (1984) The nucleotide sequences of the 5S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4881-92
- Cherest, H., Thao, N.N. und Y. Surdin-Kerjan (1985) Transcriptional regulation of the *MET3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **34**, 269-81
- Chibana, H., Magee, B.B., Grindle, S., Ran, Y., Sherer, S. und P.T. Magee (1998) A physical map of chromosome 7 of *Candida albicans*. *Genetics*, **149**, 1739-1752

- Clary D.O., Griff I.C. und J.E. Rothman (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell*, **18**, 709-21
- Clement, M., Hournier, H., de Repentigny, L. und P. Belhumeur (1998) Isolation and characterization of the *Candida albicans* SEC4 gen. *Yeast*, **14**, 675-80
- Coghlan, A. und K.H. Wolfe (2000) Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**, 1131-45
- Connolly T. und R. Gilmore (1993) GTP hydrolysis by complexes of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.*, **123**, 799-807
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S. und A.J. Brown (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 303-11
- Cosson P. und F. Letourneur (1994) Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-31
- Cosson, P. und F. Leutourneur (1997) Coatomer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 484-7
- Csank, C. und Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 115-120
- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. und Whiteway, M. (1998) Roles of the *Candida albicans* Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, Cek1p, in Hyphal Development and Systemic Candidiasis. *Infect. Immun.*, **66**, 2713-2721
- Cutler, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 187-218
- Cyr D.M., Langer T. und M.G. Douglas (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 176-81
- Dean, N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1287-91
- Dingwall, C. und R.A. Laskey (1991) Nuclear targeting sequences – a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 478-81
- Dogic, D., Dubois, A., de Chassey, B., Lafkir, Y. und F. Letourneur (2001) ERGIC-53 KKAA signal mediates endoplasmic reticulum retrieval in yeast. *Eur. J. Cell Biol.*, **80**, 151-5
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Höner, C.B. und C.P. Hollenberg (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, **7**, 691-92
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. und K. Tanaka (1992) Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2243-51
- Douglas, L.J. (1995) Adhesion-receptor interaction in the attachment of *Candida albicans* to epithelial cells. *Can. J. Bot.*, **73**, S1147-S1153
- Dower, W.J., Miller, J.F. und C.W. Ragsdal (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145
- Downing, T.A. und R.K. Storms (1996) Molecular analysis of UFE1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for spore formation and vegetative growth. *Curr. Genet.*, **30**, 396-403
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. und R.P. Wenzel (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.*, **29**, 239-44
- Elorza, M.V., Rico, H. und R. Sentandreu (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 1577-82
- Enloe, B., Diamond, A. und A.P. Mitchell (2000) A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**, 5730-36
- Ernst, J.F. (1988) Codon usage and gene expression. *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 196-99
- Ernst, J.F. (2000) Regulation of dimorphism in *Candida albicans*, in: Contributions to Microbiology, vol. 5, *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* 98-111. Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger

- Ernst, J.F. und S. K-H. Prill (2001) O-Glycosylation. *Medical Mycology*, **1**, 1-9
- Feinberg, A.P. und B. Vogelstein (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13
- Fields, S. und O. Song (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-46
- Finke K., Plath K., Panzner S., Prehn S., Rapoport T.A., Hartmann E. und T. Sommer (1996) A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.*, **1**, 1482-94
- Fonzi, W.A. und M.Y. Irwin (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, **134**, 717-28
- Fridkin, S.K. und W.R. Jarvis (1996) Epidemiology of nosokomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**, 499-511
- Frigerio, G. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* early secretion mutant *tip20* is synthetic lethal with mutants in yeast coatmer and the SNARE proteins Sec22p and Ufe1p. *Yeast*, **14**, 633-646
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Fonz, W., Zhou, X., Ramos, C.F. und M.A. Ghannoum (1997) Cloning and characterization of a gen (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 331-40
- Fujiki, Y. Hubbard, A.L., Fowler, S. und P.B. Lazarow (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **93**, 97-102
- Fukuda, R., McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J.E. und T.H. Söllner (2000) Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature*, **407**, 198-202
- Gaynor, E.C., Te Heesen, S., Graham, T.R., Aebi, M. und S.D. Emr (1994) Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.*, **127**, 653-65
- Gentzsch, M. und W. Tanner (1996) The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.*, **15**, 5752-59
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 122-143
- Gietz, R.D. und A. Sugino (1988) New *Yeast-Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-34
- Gietz, R.D., St.Jean, A., Woods, R.A. und R.H. Schiestl (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. und G.R. Fink (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation of starvation and RAS. *Cell*, **68**, 1077-90
- Glick B.S. und V. Malhotra (1998) The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*, **95**, 883-9
- Glick, B.S. (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 450-6
- Glick, B.S., Beasley, E.M. und G. Schatz (1992) Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 453-59
- Golemis, E.A. und X. Khazak (1994) Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating. *Methods in Molecular Biology*, Chapter 60
- Gopal, P. Sullivan, P.A. und M.G. Shepherd (1982) Enzymes of N-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2319-26
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. und S. Subramani (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.*, **108**, 1657-64
- Gow, N.A.R. (1997) Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr. Top. Med. Mycol.*, **8**, 43-55
- Gow, N.A.R., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T. und O.S. Kinsman (1994) A hyphal-specific chitin synthase gene (*CHS2*) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6216-20
- Greenspan, D. (1994) Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**, 51-55

- Groll, A.H., De Lucca, A.J. und T.J. Walsh (1998) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.*, **6**, 117-24
- Guarente, L. (1993) Strategies for the identification of interaction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1639-41
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580
- Hanein D., Matlack K.E., Jungnickel B., Plath K., Kalies K.U., Miller K.R., Rapoport T.A. und C.W. Akey (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **15**, 721-32
- Hardwick, D.G., Lewis, M.J., Semenza, J., Dean, N. und H.R. Pelham (1990) ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. *EMBO J.*, **9**, 623-30
- Hardwick, K.G., Boothroyd, J.C., Rudner, A.D. und H.R. Pelham (1992) Genes that allow yeast cells to grow in the absence of the HDEL receptor. *EMBO J.*, **11**, 4187-95
- Harty, C., Strahl, S. und K. Römisch (2001) O-Mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1093-1101
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C. und H. Niemann (1994) Synaptic vesicle membrane-fusion complex-action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.*, **13**, 5051-61
- Hendriks, L., Goris, A., Van de Peer, Y., Neefs, J.-M., Vancanneyt, M., Kersters, K., Hennebert, G.L. und R. de Wachter (1991) Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1223-30
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-39
- Hodgson, C.P. und R.Z. Fisk (1987) Hybridization probe size control: optimized "oligolabeling". *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6995
- Hoppe-Tichy, T. (1997) Systematische Pilzkrankungen: Klinik und antimykotische Therapie. *PZ*, **26**, 2161-2168
- 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
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J.P. und N.A.R. Gow (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, **14**, 87-99
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A.J.P. und N.A.R. Gow (1997) Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *C. albicans albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.*, **65**, 3529-38
- Hull, C. M. und Johnson, A. D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-1275
- Hull, C. M., Raisner, R. M. und Johnson, A. D. (2000) Evidence for mating of the 'asexual' yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **189**, 307-310
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E. jr., Nozawa, Y. und M.A. Ghannoum (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **63**, 1993-98
- Igual, J.C., Johnson, A.L. und L.H. Johnston (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.*, **15**, 5001-13
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Y. Sakaki (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4569-74
- J. R. Perfect (1996) Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1577-1583
- Jacoby, J.J., Schmitz, H.P. und J.J. Heinisch (1997) Mutants affected in the putative diacylglycerol binding site of yeast protein kinase C. *FEBS Lett.*, **417**, 219-22
- James, P., Halladay, J. und E.A. Craig (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-Hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36

- Janbon, G., Sherman, F. und E. Rutschenko (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5150-55
- Jentsch, S. und S. Schlenker (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, **82**, 881-4
- Jigami Y. und T. Odani (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 335-45
- Jones, S., Newman, C., Liu, F. und N. Segev (2000) The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4403-11
- Kaiser, C.A. und R. Schekman (1990) Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*, **61**, 723-33
- Kaiser, C.A., Gimeno, R.E. und D.A. Shaywitz (1997) Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis. In: Pringle, J.R., Broach, J.R. und E.W. Jones (Eds). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Vol.3: Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 91
- Kapecka, M., und M. Gabriel (1992) The influence of Congo red on the cell wall and (1,3)- β -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **158**, 115-26
- Kelly, R., Miller, S.M. und Kurtz, M.B. (1988) One-step gene disruption by cotransformation to isolate double auxotrophs in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 24 - 31
- Kelly, R., Miller, S.M., Kurtz, M.B. und D.R. Kirsch (1987) Directed mutagenesis in *Candida albicans*: One-step gene disruption to isolate *ura3*-mutants. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 199 - 207
- Kirchhausen, T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 187-98
- Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. und M.G. Douglas (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, **25**, 333-41
- Klotz, S.A. (1990) Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol. Lett.*, **68**, 249-54
- Klotz, S.A. und R.L. Smith (1991) A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J. Infect. Dis.*, **163**, 604-10
- Knight, J.S., Madueno, F. und J.C. Gray (1993) Import and sorting of protein by chloroplasts. *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 31-36
- Kobayashi, S.D. und Cutler, J.E. (1998) *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol.*, **6**, 92-94
- Köhler, J.R. und G.R. Fink (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutation in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13223-8
- Kuehn, J.M., Hermann, J.M. und R. Schekman (1998) COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*, **391**, 187-190
- Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M. und Kirsch, D.R. (1987) Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 209-217
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-85
- Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. und Friedman, L. (1975) Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: Relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect. Immun.*, **11**, 1014-1023
- Latterich, M. und R. Schekman (1994) The karyogamy gene DAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. *Cell*, **78**, 87-98
- Latterich, M., Fröhlich, K.U. und R. Schekman (1995) Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell*, **82**, 885-93
- Lee, S.A., Mao, Y., Zhang, Z. und B. Wong (2001) Overexpression of a dominant-negative allele of *YPT1* inhibits growth and aspartyl protease secretion in *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**, 1961-70

- Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. und M.A. Ghannoum (1998) Cloning and disruption of *caPLB1*, a Phospholipase B Gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26078-86
- Leuker, C.E. und J.F. Ernst (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 212-17
- Leuker, C.E., Hahn, A.M. und J.F. Ernst (1992) β -Galactosidase of *Kluyveromyces lactis* (Lac4p) as a reporter of gene expression in *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 212-217
- Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbrück, S. und J.F. Ernst (1997) Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolcarboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene*, **192**, 235-40
- Lewis, M.J. und H.R.B. Pelham (1996) SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **85**, 205-15
- Lewis, M.J., Rayner, J.C. und H.R.B. Pelham (1997) A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **16**, 3017-24
- Lewis, M.J., Sweet, D.J. und H.R.B. Pelham (1990) The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell*, **61**, 1359-63
- Li, B. und S. Fields (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.*, **7**, 957-63
- Lian, J.P. und S. Ferro-Novick (1993) Bos1p, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell*, **73**, 735-45
- Liu, H., Köhler, J. und Fink, G.R. (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation a *STE12* homolog. *Science*, **266**, 1723-1725
- Lo, H.-S., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. und G.R. Fink (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-49
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarine, D.J. Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und J.R. Pringle (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-gated gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-61
- Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Sepulveda, P., Casanova, M., Martinz, J.P. und W.L. Chaffin (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 J.F. Ernst (1989) Sequence and transcript analysis of the *C. albicans* gene (*URA3*) encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr. Genet.*, **16**, 153-57
- Lowe, M. (2000) Membrane transport: Tethers and TRAPPs. *Curr. Biol.*, **10**, R407-9
- Luft, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 409-14
- Lupashin, V.V. und M.G. Waters (1997) t-SNARE activation via transient physical association with a rab-like GTPase. *Science*, **276**, 1255-8
- Lutcke H. (1995) Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.*, **15**, 531-50
- Magee, B. B. und Magee, P. T. (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by the constructon of *MTLa* and *MTLa* strains. *Science* **289**, 310-313
- Magee, B.B., Hube, B., Wright, R.J., Sullivan, P.J. und P.T. Magee (1993) The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect. Immun.*, **61**, 3240-43
- Majoul, Ir, Straub, M, Hell, S.W., Duden, R. und H-D. Söling (2001) KDEL-Cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cell using FRET. *Dev. Cell*, **1**, 139-153
- Malhotra V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J.C. und J.E. Rothman (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, **28**, 329-36
- Mao, Y., Kalb, F.V. und B. Wong (1999) Overexpression of a dominant-negative allele of *SEC4* inhibits growth and protein secretion in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**, 7235-7242

- Mao, Y., Kalb, V.F. und B. Wong (1999) Overexpression of a dominant-negative allele of *SEC4* inhibits growth and protein secretion in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**, 7235-42
- Marichal, P., Wanden Bossche, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warncock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S. und P. Mose-Larsen (1997) *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2229-37
- Marzluf, G.A. (1997) Molecular genetics of sulphur metabolism in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, **51**, 73-96
- Matthews, R.C. (1994) Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiology*, **140**, 1505-11
- Mayer, A., Wickner, W. und A. Haas (1996) Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell*, **85**, 83-94
- McCreath, K.J., Specht, C.A. und P.W. Robbins (1995) Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2544-2548
- McCullough, M.J., Ross, B.C. und P.C. Reade (1996) *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiologic, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **25**, 136-44
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T.H. und J.E. Rothman (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, **407**, 153-9
- Mellman I. und G. Warren (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, **100**, 99-112
- Miller J.D., Wilhelm H., Gierasch L., Gilmore R. und P. Walter (1993) GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature*, **25**; 351-4
- Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1, 1-11
- Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. und M.G. Shepherd (1994) Purification and characterization of two forms of N-Acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outerchain glycosylation. *Microbiology*, **140**, 1543-53
- Monteoliva, L., Sanchez, M., Pla, J., Gil, C. und C. Nombela (1996) Cloning of *Candida albicans SEC14* homologue coding for a putative essential function. *Yeast*, **11**, 1097-105
- Morrow, B., Srikantha, T. und D.R. Soll (1992) Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2997-3005
- Morschhäuser, J., Blum-Oehler, G. und J. Jacker (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. *Med. Welt*, **48**, 352-57
- Morschhäuser, J., Michel, S. und P. Staib (1999) Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol. Microbiol.*, **32**, 547-556
- Mountain, H.A., Bystrom, A., Larsen, J.T. und C. Korch (1991) Four major transcriptional responses in the methionine threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 781-803
- Müller, H., Ziegler, B. und B. Schweizer (1993) UV/VIS-Spektroskopie in der Nucleinsäureanalytik. *BioTec*, **4**, 25-29
- Mullis, K.B. und F.A. Fallona (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-50
- Munro, S. (1995) An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.*, **14**, 4695-704
- Munske, G.R., Magnuson, J.A. und H. Krakauer (1978) A conformational change in concanavalin A detected by a calorimetric study of the binding of methyl alpha-D-mannopyranoside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 684-90
- Murgui, A., Elorza, M.V. und R. Sentandreu (1985) Effect of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 215-22

- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. und Y. Aoki (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **68**, 6712-9
- Nakayama, K., Feng, A., Tanaka, A. und Y. Jigami (1998) The involvement of *mnn4* and *mnn6* mutations in mannosyl phosphorylation of *O*-linked oligosaccharide in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 255-62
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. und J. Pla (2001) Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 245-68
- Negre, E., Vogel, T., Levanon, A., Guy, R., Walsch, T.J. und D.D. Roberts (1994) The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J. Cell Biol.*, **269**, 22039-45
- Ng, D.T., Brown J.D. und P. Walter (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.*, **134**, 269-78
- Nichols B.J. und H.R.B. Pelham (1998) SNAREs and membrane fusion in the golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* , **1404**, 9-31
- Nichols, B.J., Ungermann, C., Pelham, H.R., Wickner, W.T. und A. Haas (1997) Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature*, **387**, 199-202
- Nieto, A., Sanz, P., Sentandreu, R. und L. Del Castillo (1993) Cloning and characterization of the *SEC18* gene from *Candida albicans*. *Yeast*, **8**, 875-87
- Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M.H. und G. Warren (1993) Kin recognition – a model for retention of Golgi enzymes. *FEBS Lett.*, **330**, 1-4
- Nishimura, N. und W.E. Balch (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*, **277**, 556-8
- Nothwehr, S.F. und T.H. Stevens (1994) Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10185-8
- Novick, P., Ferro, S. und R. Schekman (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **25**, 461-9
- Novick, P., Fiel, C. und R. Schekman (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21**, 205-37
- Nultsch W. (1991) Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag Stuttgart. S 511
- O'Shea, E., Rutkowski, R. und P.S. Kim (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, **243**, 538-42
- 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
- Ogg S.C. und P. Walter (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell*, **30**;1075-84
- Orci, L., Glick, B.S. und J.E. Rothmann (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: it s possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, **46**, 171-84
- Orci, L., Montesano, R., Meda, P., Lagae, F.M., Brown, D., Perretlet, A. und P. Vassalli (1981) Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 293-7
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-58
- Panzner S., Dreier L., Hartmann E., Kostka S. und T.A. Rapoport (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **19**, 561-70
- Parlati, F., McNew, J.A., Jukuda, R., Miller R., Söllner, T.H. und J.E. Rothman (2000) Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature*, **407**, 194-8
- Patel, S.K., Indig, F.E., Olivieri, N., Levine, N.D. und M. Latterich (1998) Organelle membrane fusion: A novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell*, **92**, 611-20
- Pearse, B.M. und M.S. Robinson (1990) Clathrin, adaptors and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 151-71
- Pelham, H.R.B. (1989) Control of exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **5**, 1-23

- Pelham, H.R.B. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 483-486
- Pelham, H.R.B. (1995) Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 530-5
- Pelham, H.R.B. (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct. Func.*, **21**, 413-9
- Pelham H.R.B. (1999) SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp. Cell Res.*, **247**, 1-8
- Pelham, H.R.B. (2001) SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.*, **11**, 99-101
- Pendrak, M.L. und S.A. Klotz (1995) Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 103-114
- Perara E., Rothman R.E. und V.R. Lingappa (1986) Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. *Science*, **18**, 348-52
- Petersen, R.F., Marinoni, G., Nielsen, M.L. und J. Piskur (2000) Molecular Approaches for Analyzing Diversity and Phylogeny among Yeast Species., in: Contributions to Microbiology, vol. 5, *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* 15-35. Hrsg. J.F. Ernst und A. Schmidt, Basel: Karger
- Pevsner, J., Hsu, S., Braun, J.E.A., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.D. und R.H. Scheller (1994) Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron*, **13**, 353-61
- Pfaller, M.A. (1994) Epidemiology and control of fungal infections. *Clin. Infect. Dis.*, **19**, 8-13
- Pfaller, M.A. (1996) Nosocomial candidiasis : emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.*, **22**, S89-94
- Pfeffer, S.R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature Cell Biol.*, **1**, E17-22
- Pishvaei, B. und G.S. Payne (1998) Clathrin coats-threads laid bare. *Cell*, **95**, 443-6
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M. und C. Nombela (1996) Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast*, **12**, 1677-1702
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. und D.H. Wolf (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, **388**, 891-5
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, E.A.M., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. und E.W. Jones (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.*, **31**, 357-434
- Raben, N., Exelbert, R., Spiegle, R., Sherman, J.B., Nakajima, H., Plotz, P. und J. Heinisch (1995) Functional expression of human mutant phosphofructokinase in yeast: genetic defects in French Canadian and Swiss patients with phosphofructokinase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 131-41
- Ram, A.F.J., Wolters, A., ten Hoopen, R. und F.M. Klis (1994) A new approach for isolation of cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*, **10**, 1019-30
- Ramanan, N. und Y. Wang (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science*, **288**, 1062-64
- Rayner, J.C. und H.R. Pelham (1997) Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.*, **16**, 1831-41
- Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R. und Kumamoto, C. (1999) Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect. Immun.*, **67**, 3649-3652
- Riggle, P.J., Slobodkin, I.V., Brown, D.H., Hanson, M.P., Volkert, T.L. und C.A. Kumamoto (1997) Two transcripts, differing at their 3' ends, are produced from the *Candida albicans* *SEC14* gene. *Microbiology*, **143**, 3527-35
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M. und S.D. Emr (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4936-48
- Roise D. und G. Schatz (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4509-11
- Römisch, K. (1999) Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J. Cell Sci.*, **112**, 4185-91

- Rose, M.D., Misra, L.M., und J.P. Vogel (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, **57**, 1211-21
- Rothman, J.E. (1987) Protein sorting by selective retention in the endoplasmic reticulum and Golgi stack. *Cell*, **50**, 521-2
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55-63
- Rothman, J.E. und F.T. Wieland (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**, 227-234
- Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.*, **101**, 202-11
- Russell, D.W., Jensen, R., Zoller, M.J., Burke, J., Errede, B., Smith, M., und I. Herskowitz (1986) Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4281-94
- Rutschenko-Bulgac, E.P., Howard, D. und F. Sherman (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J. Bacteriol.* **176**, 3231-41
- Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates, I. und J.R. Ferro-Novick (2000) Identification of five new subunits of TRAPP. *Eur. J. Cell Biol.*, **79**, 2494-503
- Sacher, M., Stone, S. und S. Ferro-Novick (1997) The synaptobrevin-related domains of Bos1p and Sec22p bind to the syntaxin-like region of Sed5p. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17134-8
- Salama, N.R. und R.W. Schekman (1995) The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 536-43
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und T. Maniatis (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press NY.
- Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F.C. und N.A.R. Gow (1997) Deletion of the secretory aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.*, **65**, 3539-46
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. und J. Bille (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents; characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology*, **143**, 405-16
- Santos, M.A.S. und M.F. Tuite (1995) The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1481-86
- Sapperstein, S.K., Lupashin, V.V., Schmitt, H.D. und M.G. Waters (1996) Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Usa1p. *J. Cell Biol.*, **132**, 755-67
- Sato, K., Sato, M. und A. Nakano (2001) Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the golgi apparatus by coatamer. *J. Cell Biol.*, **152**, 935-44
- Schaller, M., Schäfer, W., Korting, H.C. und B. Hube (1998) Differential expression secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol. Microbiol.*, **29**, 605-615
- Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B. und H.C. Korting (2001) Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *J. Med. Microbiol.*, **50**, 743-7
- Schaller, M., Schackert, C., Korting, H.C., Januschke, E. und B. Hube (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 712-717
- Schatz G. und B. Dobberstein (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **15**; 1519-26
- Scherer, S. und P.T. Magee (1990) Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.*, **54**, 226-41
- Schim J., Newman, A.P. und S. Ferro-Novick (1991) The BOS1 gene encodes an essential 27-kD putative membrane protein that is required for vesicular transport from the ER to the Golgi complex in yeast. *J. Cell Biol.*, **113**, 55-64

- Schlenstedt G., Gudmundsson G.H., Boman H.G. und R. Zimmermann (1990) A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.*, **15**, 13960-8
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 511-48
- Schmitt, E.M., Brown, T.A. und B.L. Trumpower (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3091
- Schwientek, T., Lorenz, C. und J.F. Ernst (1995) Golgi localization in yeast is mediated by the membrane anchor region of rat liver sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5483-89
- Semenza, J.C. und H.R.B. Pelham (1992) Changing the specificity of the sorting receptor for luminal endoplasmic reticulum proteins. *J. Mol. Biol.*, **5**, 1-5
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Ean, N und H.R.B. Pelham (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*, **61**, 1349-57
- Sen-Gupta, M., Guldener, U., Beinhauer, J., Fiedler, T. und J.H. Hegemann (1997) Sequence analysis of the 33 kb long region between ORC5 and SUI1 from the left arm of chromosome XIV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 849-60
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. und J.E. Rothman (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, **67**, 239-53
- Sharp, P.M und W.H. Li (1987) The Codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1281-95
- Sherman, F., Fink, G.R. und J.B. Hicks (1986) Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sherwood, J., Gow, N.A., Gooday, G.W., Gregory, D.W. und D. Marshall (1992) Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**, 461-9
- Shimma Y., Nishikawa A., bin Kassim B., Eto, A. und Y. Jigant (1997) A defect in GTP synthesis affects mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 469-80
- Shulewitz, M.J., Inouye, C.J. und J. Thorner (1999) Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7123-37
- Sklerl, K.G., Calderone, R.A., Segal, E., Sreevalsan, T. und W.M. Scheld (1984) *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 221-27
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. und D.R. Soll (1987) „White-opaque transition“: a second high frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **169**, 189-197
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J.E. und T. Söllner (1994) A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell*, **78**, 937-48
- Soll, D.R. (1997) Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**, 279-88
- Soll, D.R., Morrow, B. und T. Srikantha (1993) High-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Trends Genet.*, **9**, 61-65
- Söllner, T., Bennett, M.D., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. und J.E. Rothman (1993) A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, **75**, 409-18
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und J.E. Rothman (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**, 318-24
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517

- Srikantha, T., Morrow, B., Schroppel, K. und D.R. Soll (1995) The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol. Gen. Genet.*, **246**, 342-52
- StGeorgiev, V. (2000) Membrane transporters and antifungal drug resistance. *Curr. Drug Targets*, **1**, 261-84
- Stirling C.J., Rothblatt J., Hosobuchi M., Deshaies R. und R. Schekman (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 129-42
- Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. und J.F. Ernst (1997) Efg1, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulation morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.*, **16**, 1982-91
- Strahl-Bolsinger, S. und W. Tanner (1991) Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the dolichyl-phosphate-D-mannose-protein O-D-mannosyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, **26**, 185-90
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und W. Tanner (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 297-307
- Subramani, S. (1993) Targeting of proteins into the peroxisomal matrix. *J. Memb. Biol.*, **125**, 99-106
- Suckow M. und C.P. Hollenberg (1998) The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p *in vivo* can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **276**, 887-902
- Suzuki, T., Rogers, A.L. und P.T. Magee (1986) Inter- and intra-species crosses between *Candida albicans* and *Candida guilliermondii*. *Yeast*, **2**, 53-8
- Sweet, D.J. und H.R.B. Pelham (1992) The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J.*, **11**, 423-32
- Sweet, D.J. und H.R.B. Pelham (1993) The *TIP1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an 80 kDa cytoplasmic protein that interacts with the cytoplasmic domain of Sec20p. *EMBO J.*, **12**, 2831-40
- Sweet, S.P. und L.J. Douglas (1991) Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 859-66
- Swoboda, R.K., Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D. und J.S. Greenspan (1993) Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect. Immun.*, **61**, 4263-71
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M. und T.H. Jr. Plummer (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by paptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, **13**, 4665-71
- Teasdale, R.C. und M.R. Jackson (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 27-54
- Thomas, D. und Y. Surdin-Kerjan (1997) Metabolism of Sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503-32
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. und J.F. Ernst (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20837-46
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schröppel, K. und J.F. Ernst (2000) Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **182**, 3063-71
- Todorow, Z., Spang, A., Ermack, E., Yates, J. und R. Schekmann (2000) Active recycling of yeast Golgi mannosyltransferase complexes through the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13643-8
- Towbin, H., Staehelin, T. und J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-54
- Townsley F.M. und H.R. Pelham (1994) The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.*, **64**, 211-6
- Townsley, F.M, Wilson D.W. und H.R.B. Pelham (1993) Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for folgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.*, **12**, 2821-9
- Tsui, M.M., Tai, W.C. und D.K. Banfield (2001) Selective formation of Sed5p-containing SNARE complexes is mediated by combinatorial binding interactions. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 521-38

- Tuite, M.F. (1992) Antifungal drug development; the identification of new targets. *Trends Biotechnol.*, **10**, 235-39
- Tzung, K. W. *et al.* (2001) Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **13**, 3249-3253
- Uhl, M.A. und A.D. Johnson (2001) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology*, **147**, 1189-95
- Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R. und W. Wickner (1998) A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form *in vivo* and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J. Cell Biol.*, **140**, 61-7
- van den Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. und D. Sanglard (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, **36**, 119-28
- van den Bossche, H., Marichal, P. und F.C. Odds (1994) Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.*, **2**, 393-400
- Vazquez-Torres, A. und E. Balish (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 170-192
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences: the limits of variation. *J. Mol. Biol.*, **184**, 99-105
- Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 259-265
- Walter P. und A.E. Johnson (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 87-119
- Waters, M.G., Serafini, T. und J.E. Rothman (1991) „Coatomer“: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, **349**, 248-51
- Watts, H.J., Cheah, F.S.H., Hube, B., Sanglard, D. und N.A.R. Gow (1998) Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **159**, 129-35
- Weber, T. Parlati, F., McNew, J.A., Johnston, R.J., Westermann, B., Sollner T.H. und J.E. Rothman (2000) SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF an α SNAP. *J. Cell Biol.*, **149**, 1063-72
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. und J.E. Rothman (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**, 759-72
- Weide, M.R. und J.F. Ernst (1999) Caco-2 monolayer as a model for transepithelial migration of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mycoses*, **42**, 61-67
- Weisz, O.A., Swift, A.M. und C.E. Machamer (1993) Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.*, **122**, 1185-96
- Whelan W.L. und D.R. Soll (1982) Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 477-85
- Whelan, W.L. und P.T. Magee (1981) Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **145**, 896-903
- White, T.C., Andrews, L.E., Malthy, C. und N. Agabian (1995) The “universal” leucine codon CTG in the secreted aspartyl proteinase 1 (*SAP1*) gene of *Candida albicans* encodes a serine *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **177**, 2953-55
- White, T.C., Marr, K.A. und R.A. Bowden (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 382-402
- Wickert, S (1998) *DOM34*- und *AGS1*- Genprodukte als Komponenten der Proteinglykosylierung von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf
- Wickes, B.L., Mayorga, M.E., Edman, U. und Edman, J.C. (1996) Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α -mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7327-7331
- Wieland, F.T., Gleason, M.L., Serafini, T.A. und J.E. Rothman (1987) The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*, **50**, 289-300
- Wilson, R.B., Davis, D. und A.P. Mitchell (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.*, **181**, 1868-74

- Wirth, R., Friesenegger, A. und S. Fiedler (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.*, **216**, 175-177
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-78
- Yang, B., Gonzalez, L., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J. und R.H. Scheller (1999) SNARE interactions are not selective. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5649-53
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. und J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-19
- Zhou, M. und R. Schekman (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol. Cell*, **4**, 925-34
- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, **31**, 71-86

Herzlichen Dank

sage ich allen, die mir bei dieser Arbeit Hilfe geleistet haben:

Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchführen zu können.

Für die freundliche Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Freudl, Institut für Biotechnologie1, Forschungszentrum Jülich GmbH.

Herrn Dr. U. Santore danke ich ganz herzlich für die Einweisung in die Kunst der Elektronenmikroskopie und die faszinierenden Aufnahmen.

Allen Mitarbeitern des Instituts sei an dieser Stelle für alle kleinen und größeren Hilfen sowie das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima gedankt.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken für die ständige Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit, besonders natürlich Bernd Tebarth für die Durchsicht des Manuskriptes. Ihm und Dirk Bockmühl gilt mein Dank für die vielen angenehmen Mittagsrunden.

Claudia Timpel möchte ich danken für die geduldige Einweihung in die Geheimnisse vieler Hefe-Techniken und für die Unterstützung bei allen kleineren und größeren Problemen im Labor. Ich danke für ihre Freundschaft und ihren Zuspruch sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Anna Nagy möchte ich danken für das ständige Beschaffen von Glaswaren aller Art und ihre unübertroffene Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderes Dankeschön an meine Familie; meinen Eltern, die mir durch ihre unermüdliche Unterstützung ermöglicht haben, das Studium auf diese Weise abzuschließen. Andeas möchte ich vor allem für seine seelische Unterstützung danken und für die Überwachung der Tücken des Computers.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Sie wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, November 2001

(Yvonne Weber)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Yvonne Weber, Uwe J. Santore, Joachim F. Ernst und Rolf K. Swoboda (2001)

Divergence of eukaryotic secretory components: the *Candida albicans* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Sec20 protein is N terminally truncated, and its levels determine antifungal drug resistance and growth. *Journal of Bacteriology*, **183**: 46-54