

Charakterisierung des Msb2 Sensorproteins in *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Eva Maria Szafranski-Schneider
aus Stettin

Düsseldorf
2011

aus der Abteilung für Molekulare Mykologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. J. F. Ernst
Korreferent: Prof. Dr. T. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2011

2.5.6.2 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel..	25
2.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	25
2.5.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
2.5.9 Restriktion von DNA.....	25
2.5.10 Ligation.....	25
2.5.11 DNA-Größenstandard.....	25
2.5.12 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.5.12.1 Standard-PCR.....	26
2.5.12.2 Mutagenese-PCR.....	26
2.5.13 Calcofluor White Färbung.....	26
2.5.14 Mikroskopische Untersuchung.....	27
2.6 Biochemische Methoden.....	27
2.6.1 Herstellung von Proteinrohextrakten.....	27
2.6.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine.....	27
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
2.6.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.6.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry.....	28
2.6.3.3 Proteinkonzentrationabschätzung.....	28
2.6.4 Methoden zur Western Blot Analyse.....	29
2.6.4.1 Protein-Größenstandard.....	29
2.6.4.2 Antikörper.....	29
2.6.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.6.4.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	29
2.6.4.5 Silberfärbung von Proteingelen.....	29
2.6.4.6 Proteinnachweis durch Immunoblot-Analysen.....	30
2.6.5 Gelfiltrationschromatographie von Proteinen.....	30
2.6.6 Protein-Fällung.....	31
2.6.7 Deglykosylierung von Proteinen.....	31
2.6.7.1 PNGase F- Behandlung.....	31
2.6.7.2 α -Mannosidase-Behandlung.....	31
2.6.7.3 β -Eliminierung-Behandlung.....	31
2.6.7.4 Behandlung mit Trifluoromethansulfonsäure (TFMS).....	31
2.6.7.4.1 Puffer-Austausch mittels Dialyse-Kassette.....	32
2.6.8 Inhibierung von Proteinase Reaktionen.....	32
2.6.9 Analyse zur Schutzfunktion von Msb2 gegenüber antimikrobiellen Peptiden.....	33
2.6.9.1 Flüssigassay-Analyse mit Histatin 5.....	33
2.6.9.2 Flüssigassay-Analyse mit A β Peptid.....	33
2.6.9.3 Histatin 5 Assay auf Agar-Platten.....	33
2.6.9.4 A β Peptid Assay auf Agar-Platten.....	34
2.6.10 Biofilmbildung von <i>C.albicans</i>	34
2.6.11 Adhäsion von <i>C.albicans</i>	34
2.6.12 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay“)	34
2.6.13 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Flüssigassay).	34
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Epitop-Markierung des Msb2.....	36
3.1.1 Markierung der extrazellulären Domäne.....	36

3.1.2 Markierung der cytoplasmatischen Domäne.....	38
3.2 Funktionalitätsanalysen des markierten Msb2.....	41
3.3 Sekretion des Msb2.....	44
3.3.1 Sekretion des Msb2 in Flüssigmedium.....	44
3.3.1.1 Sekretion der extrazellulären Domäne.....	44
3.3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation der cytoplasmatischen Domäne.....	45
3.3.2 Sekretion des Msb2 auf Festmedium.....	47
3.3.3 Sekretion des Msb2 nach Hypheninduktion.....	48
3.4 Aufreinigung des Epitop-markierten Msb2-Proteins.....	49
3.4.1 Reinigung von Msb2 mittels der Gelfiltration.....	49
3.4.2 Aufreinigung des Msb2 durch Affinitätschromatographie.....	53
3.4.3 Konzentrationsbestimmung des Msb2-Proteins.....	53
3.5 Glykosylierung des Msb2.....	55
3.5.1 Enzymatische und chemische Versuche zur Entfernung der Glykosylierung.....	55
3.5.2 Untersuchungen zur <i>N</i> -Glykosylierung von Msb2.....	57
3.5.3 Glykosylierung von Msb2 in <i>pmt</i> -Mutanten.....	60
3.5.3.1 Glykosylierung des vollständigen Msb2-Proteins.....	61
3.5.3.2 Glykosylierung eines deletierten Msb2-Proteins.....	62
3.6 Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung des Msb2.....	65
3.6.1 Spaltung von Msb2 in <i>sap9</i> , <i>sap10</i> und <i>kex2</i> Mutanten.....	65
3.6.2 Proteolytische Prozessierung von Msb2 in Gegenwart von Inhibitoren...	66
3.7 Struktur-Funktionsuntersuchungen von Msb2.....	68
3.7.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für verschiedene Msb2-Varianten	68
3.7.2 Funktionalitäts- und Sekretionsanalysen der verschiedenen Msb2-Varianten.....	70
3.8 Untersuchungen zu genetischen Interaktionen von <i>MSB2</i>	73
3.8.1 Untersuchungen zur Überexpression von <i>Cdc42</i> und zur Interaktion von <i>Cdc42</i> und Msb2.....	73
3.8.2 Überexpression von <i>Pkc1</i> und <i>Mkc1</i>	74
3.9 Untersuchung zur Funktion und Wirkung des sekretierten Msb2.....	75
3.9.1 Adhäsionsuntersuchungen der <i>msb2</i> -Mutante.....	75
3.9.2 Untersuchung der Biofilmbildung der <i>msb2</i> -Mutante.....	75
3.9.3 Inaktivierung von Histatin 5 durch Msb2.....	75
4. Diskussion.....	79
4.1 Sekretion und Spaltung des CaMsb2.....	79
4.2 Glykosylierung des CaMsb2.....	80
4.3 <i>Cdc42</i> in <i>C. albicans</i>	81
4.4 Regulation durch <i>Pkc1</i> und <i>Mkc1</i>	81
4.5 Signaltransduktion des FG-Weges durch veränderte Msb2-Sensoren.....	82
4.6 Msb2 als Schutzprotein vor antimikrobiellen Peptiden.....	86
4.7 Msb2, das multitasking-fähige Protein.....	88
5. Zusammenfassung.....	90
6. Summary.....	91
7. Literatur.....	92
8. Abkürzungen.....	104

1 Einleitung

1.1 Posttranslationale Modifikation

Die einfache Vorstellung, dass ein Gen nur ein Protein kodiert, wurde schon vor mehr als 30 Jahren verworfen (Berk und Sharp, 1978). Es gibt viele Wege, wie die Zelle ihr Proteom komplexer gestalten kann. Neben der Transkription, dem Spleißen von Primärtranskripten und der Translation ist posttranslationale Modifikation für die Vielfalt von Proteinstrukturen verantwortlich. Diese Modifikation hat das Potential, die Proteinvielzahl exponentiell zu steigern. Während im Wesentlichen nur 20 Aminosäuren für die Proteinsynthese verwendet werden, können aufgrund der posttranslationalen Modifikationen mehr als 100 verschiedene Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften in Proteinen gefunden werden (Meri und Baumann, 2001). Es sind mehrere unterschiedliche posttranslationale Modifikationen bekannt, wie Acetylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierungen oder Methylierungen (Hamdan *et al.*, 2001). Doch auch komplexere Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen, sind in Proteinen häufig zu finden.

1.2 Glykosylierung

Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen in Eukaryoten und kann die Proteinfunktion stark beeinflussen. Glykosylierung kann das Protein in seiner Faltung unterstützen, oder verhilft dem Protein zur Stabilität (Helenius und Aebi, 2001). Außerdem kann sie als Schutz vor Proteolyse dienen, oder sie wird für eine korrekte Erkennung und Assoziation mit Proteinen, Enzymen oder Viren benötigt. Die Glykosylierung kann auch die Halbwertszeit der Proteine im Serum beeinflussen (Dwek, 1996).

Eine große Anzahl an Proteinen besitzt eine oder mehrere Zuckerketten. So wurde schon von Apweiler *et al.* (1999) vermutet, dass über die Hälfte aller sekretorischen Proteine glykosyliert sind. Die Zucker lassen sich vielfältig miteinander kombinieren und auch die Größe und Form der Zuckergruppen ist äußerst heterogen. Glykoproteine enthalten Zucker-Peptid Verbindungen, die in allen lebenden Organismen, von Prokaryoten bis zu höheren Eukaryoten gefunden wurden. In Eukaryoten wurde eine besonders große Anzahl glykosylierter Proteine entdeckt, die Bestandteile der Zellwand (wie bei Pilzen und Pflanzen), aber auch des Kerns oder des Cytoplasmas sind (Spiro, 2002). Glykoproteine des Menschen sind z. B. Plasmaproteine, Thyroglobuline, Hormone, Enzyme, Lectine, Immunglobuline, Zell-Oberflächenrezeptoren (Spiro, 1973) oder Mucine (Abschnitt 1.3), die vor allem von den Schleimhautzellen in großen Mengen sekretiert werden (Perez-Vilar *et al.*, 1996).

Die Glykosylierung in Eukaryoten erfolgt hauptsächlich kotranslational im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie posttranslational beim Durchqueren des Golgi-Apparats. Es gibt verschiedene seltene Typen der Glykosylierung wie Phosphoglykosylierung, C-Mannosylierung und GPI- (Glykosylphosphatidylinositol) Verankerung, jedoch sind die verbreitetsten Formen die N- und die O-Glykosylierung.

Bei der N-Glykosylierung wird im Eukaryoten ein „Kern“-Oligosaccharid, bestehend aus zwei GlcNAc-Resten, neun Mannosen und drei Glukosen (GlcNAc₂Man₉Glc₃), auf eine Amidgruppe einer Asparagin-Aminosäure übertragen. Diese „Kern“-Struktur wird von Mannosyltransferasen, die der Alg-Familie angehören, an der Membran des ER synthetisiert. Im Lumen des ER erfolgt anschließend der kotranslationale Transfer dieser Zuckerstruktur

auf einen Asparaginrest in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X= jede beliebige Aminosäure, außer Prolin) des Zielproteins. Die nachfolgende *N*-Glykosylierung findet im Golgi-Apparat statt, verläuft jedoch in Hefen und Säugern unterschiedlich.

Bei der *O*-Glykosylierung ist im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung keine Konsensussequenz bekannt. *O*-Glykosylierung bezieht sich in der Regel auf die Verknüpfung von GalNAc an Ser/Thr bei höheren Eukaryoten. Der erste Schritt der *O*-Glykosylierung in Pilzen, wie beispielsweise bei der Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae* oder dem wichtigsten humanpathogenen Pilz *Candida albicans* erfolgt dagegen durch Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) kotranslational bereits im ER-Lumen, welche hierbei einen Mannose-Rest mit der Hydroxygruppe von Serin oder Threonin des Akzeptorproteins verknüpfen. Eine Kettenverlängerung erfolgt im Golgi-Apparat, wobei weitere Mannosyltransferasen (Lussier *et al.*, 1995) bis zu fünf Mannose-Reste in *S. cerevisiae* und bis zu 7 in *C. albicans* anhängen können. In *S. cerevisiae* sind 7 Pmt-Isoformen (Pmt1, Pmt2, Pmt3, Pmt4, Pmt5, Pmt6 und Pmt7) (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993 und 1999) und in *C. albicans* 5 Pmt-Isoformen (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5, und Pmt6) (Prill *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008) vorhanden.

1.3 Mucine

Mucine sind stark glykosylierte Proteine (Kermit *et al.*, 2002). Im menschlichen Genom wurden insgesamt 18 Mucin-Gene identifiziert (Rose und Voynow, 2006). Mucin-Proteine beinhalten Tandem-Repeat- (Wiederholungssequenzen) Domänen, die aus identischen oder hoch ähnlichen Sequenzen bestehen, welche reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin sind (Gendler *et al.*, 1987; Gupta *et al.*, 1989). Mucin Tandem Repeats beinhalten typischerweise 5 bis 100 potentielle Glykosylierungsstellen pro Repeat, wobei das Kern-Protein der Mucine sogar 5 bis 500 solcher Repeats enthält (Hollingsworth und Swanson, 2004). Die Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin machen somit mindestens 20 % des Gesamt-Aminosäuregehalts aus, was zu einer starken *O*-Glykosylierung führt. Dadurch weisen Mucine eine typische „Flaschenbürstenstruktur“ auf. Der Glykan-Anteil der Mucine kann je nach Lokalisation sehr variabel sein. Somit kann er z. B. bei dem Mucin im Darm des Menschen zwischen 40 und 80 % am Gesamtmolekül variieren und daher sehr das Molekulargewicht des Proteins beeinflussen. Diese starke *O*-Glykosylierung konnte auch in dem mucinähnlichen Protein Msb2 der Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* nachgewiesen werden, welches in den folgenden Abschnitten näher beschrieben wird.

Mucine des Menschen werden von allen Arten von Epithelzellen an der apikalen Zelloberfläche (z. B. im Gastrointestinaltrakt) synthetisiert. Sie sind in zwei Variationen vorhanden. So treten sie zum einen in Membran-verankerter und zum anderen in sekretierter Form auf. Durch die stark hydrophile und negativ geladene *O*-Glykosylierung der Mucine bildet sich eine viskose, elastische Schicht über den sezernierenden Epithelzellen aus. Diese Schicht aus sekretierten Mucinen hat die Hauptfunktion einer schützenden Barriere.

Transmembrane Mucine wurden erst kürzlich entdeckt und zunächst als Komponenten von Karzinom-Zelloberflächen identifiziert (Gendler und Spicer, 1995). Veränderungen in der Expression der Mucin-Gene oder der Glykosylierung können daher die Krebsentwicklung fördern. Mucine werden, da sie verstärkt von Krebszellen, insbesondere im Adenokarzinom, gebildet werden (Lev, 1965, Hukill und Vidone, 1965), als Diagnose-Marker verwendet. Eine erhöhte Konzentration Mucin-typischer Glykoproteine im Serum korreliert mit erhöhter Tumorbelastung. Die Krebszellen „tarnen“ sich mit Mucinen während der Invasion, der Metastase und dem Wachstum. Erst später wurde die Rolle der Mucine in gesunden Zellen entdeckt. Hier dienen sie dem Schutz der Epithelzellen (Gendler und Spicer, 1995), indem sie eine sterische Barriere bilden, die den Eintritt anderer Zellen oder Moleküle limitiert (Carraway *et al.*, 2001; Komatsu *et al.*, 1999; Price-Schiavi *et al.*, 2002).

Wie das Msb2-Protein der Knospungshefe *S. cerevisiae* und des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* sind membrangebundene Mucine Typ I-Membranproteine. Sie besitzen eine hydrophobe Transmembrandomäne, mit der sie an der Zelloberfläche gebunden sind, eine hochglykosylierte extrazelluläre N-terminale und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne, deren Länge variiert (Singh und Hollingsworth, 2006). Diese membrangebundenen Mucine können auch in löslicher Form vorkommen, wobei die Transmembrandomäne entweder durch Proteolyse (Boshell *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1996) oder alternatives Spleißen (Williams *et al.*, 1990; Moniaux *et al.*, 2000) entfernt werden kann. Dadurch kann die extrazelluläre Domäne des Mucins nach außen sekretiert werden. Auch die intrazelluläre Domäne wird im Inneren der Zelle von der Plasmamembran losgelöst. Diese spezifische proteolytische Spaltung findet während der intrazellulären posttranslationalen Prozessierung nahe der Membran statt (Parry *et al.*, 2001). Bei einigen der membranassoziierten Mucine, wie z. B. Muc1, erfolgt die Spaltung in der SEA-Domäne (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin; Bork und Patthy, 1995; Wreschner *et al.*, 2002) durch eine noch unbekannte intrazelluläre Protease. Die SEA-Region bildet bei einigen Zelloberflächenassoziierten Glykoproteinen eine über die Evolution hinweg konservierte Domäne.

Neben der Barrierefunktion haben membrangebundene Mucine außerdem eine sensorische und signalvermittelnde Funktion, wie es auch für Msb2 der Hefen vermutet wird. So übertragen transmembrane Mucine die Umgebungsinformation über Signaltransduktion an die Epithelzellen (Allen und Carroll, 1985; Carlstedt *et al.*, 1995; Gendler und Spicer, 1995). Mucine sind demnach Zelloberflächenrezeptoren und Sensoren, welche Signale als Antwort auf externe Stimuli (Veränderung der Mukusschicht oder der lokalen Umgebung) senden und so eine zelluläre Antwort auslösen. Die zelluläre Antwort äußert sich dann in Form von Proliferation, Differenzierung, Apoptose oder der Sekretion spezieller zellulärer Produkte. Mucine können bestimmte Liganden wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren und Entzündungsmediatoren binden. Durch bestimmten Ligandenstatus, Interaktion mit Rezeptoren wie Tyrosin Kinase Rezeptoren (z. B. EGFR) oder Konformationsänderungen der extrazellulären Domäne, werden Signale über verschiedene Signaltransduktionskaskaden weitergeleitet (Hollingsworth und Swanson, 2004).

Das am besten untersuchte Mucin des Menschen ist Muc1, das in mehrere Signaltransduktionswege involviert ist. Die cytoplasmatische Domäne von Muc1 kann Komplexe mit Transkriptionsfaktoren bilden und in den Nukleus wandern, wo es anschließend die Transkription seiner Zielgene beeinflusst (Singh und Hollingsworth, 2006). Der Mechanismus, der Translokation in den Kern ist jedoch bis heute unbekannt. Die Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden erfolgt durch Phosphorylierung bestimmter

Aminosäurereste, bevorzugt von Tyrosin-Aminosäuren in der cytoplasmatischen Region des Muc1. Die cytoplasmatische Domäne des Muc1 besteht aus 72 Aminosäuren und beinhaltet zahlreiche Phosphorylierungstellen (Singh und Hollingsworth, 2006).

1.4 Msb2 in Hefen

1.4.1 Aufbau des Msb2 in *S. cerevisiae*

MSB2 in *S. cerevisiae* kodiert für ein 1306 Aminosäuren-langes, mucinähnliches Protein, das in dem HOG- (high osmolarity glycerol) und dem FG- (filamentous growth) Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Msb2 weist eine Transmembrandomäne auf (Aminosäuren 1186-1208), mit der es in der Plasmamembran verankert ist, und es enthält eine große extrazelluläre N-terminalen Region (1184 Aminosäuren) (Abb.1.1). Zusätzlich besitzt Msb2 eine 97 Aminosäuren-lange cytoplasmatische Domäne am Carboxyende (Abb. 1.3).

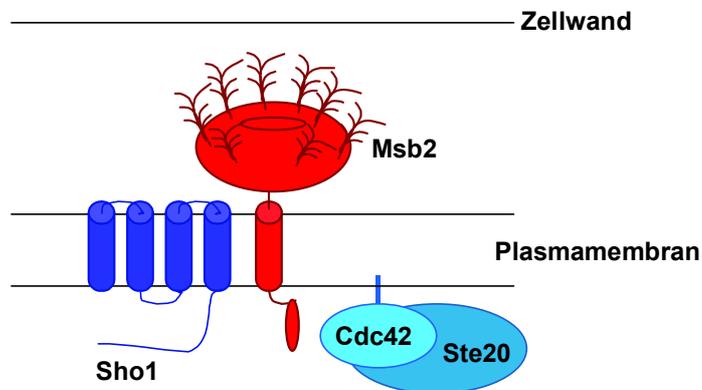


Abb.1.1: Modell von Msb2 in *S. cerevisiae*

Msb2 (rot) interagiert mit Sho1 und Cdc42 und induziert den MAPK Signaltransduktionsweg. PM: Plasmamembran. (Aus Cullen *et al.*, 2002).

Außerdem konnte in Msb2 eine Domäne identifiziert werden, die eine große Ähnlichkeit mit einem weiteren möglichen Mucin, dem Protein Hkr1, aufweist. Hkr1 ist ein 1802 Aminosäuren großes Protein, welches den selben Aufbau und Organisation wie Msb2 aufweist. Die beiden Proteine Hkr1 und Msb2 sind zu 30.3 % homolog und zu 18.5 % identisch. Diese Hkr1-Msb2 homologe (HMH) Domäne (Aminosäuren 961-1117 von Msb2 Abb. 1.3) ist essentiell für die Aktivierung der oben erwähnten MAPK-Wege. Es wurde außerdem eine weitere Serin-, Threonin-reiche Domäne (STR) entdeckt (Aminosäuren 51-950 von Msb2, Abb. 1.3), die zu 49 % aus diesen beiden Aminosäuren besteht. Innerhalb dieser Region enthält Msb2 Tandem Repeats (Wiederholungen) an Ser/Thr/Pro, was darauf hinweist, dass es hier stark glykosyliert sein kann. Diese Annahme stimmt mit der tatsächlichen molekularen Masse des Msb2 in *S. cerevisiae* überein, denn diese ist viel größer als die Vorhergesagte von ca. 150 kDa (Yang *et al.*, 2009). Yang *et al.* (2009) konnten außerdem nachweisen, dass Msb2 von den Proteinmannosyltransferasen Pmt1, Pmt2 und Pmt4 glykosyliert wird, da in Mutanten dieser Pmt-Proteine Msb2 eine deutlich geringere molekulare Masse als in dem Wildtyp Stamm hatte.

Neben O-Glykosylierungen kann Msb2 auch N-Glykosylierung enthalten, da es 7 potentielle N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne besitzt (N30, N859, N885, N945,

N1049, N1088 und N1175). Muc1 wird in dem konservierten Motiv GSYYY der SEA-Domäne gespalten (Macao et al., 2006; Levitin et al., 2005). Vadaie et al. (2008) konnten zeigen, dass auch Msb2 gespalten wird, da die stark glykosylierte extrazelluläre Domäne außerhalb der Zelle detektiert wurde. Das zeigt, dass Msb2 wie die Mucine der Säuger durch Spaltung modifiziert wird. Msb2 besitzt jedoch laut Vorhersage der Programme PROF und NORS keine charakteristische Sekundärstruktur der SEA-Domäne (Cullen, 2007; Rost et al., 2004) und hat keine Ähnlichkeiten zur Aminosäuresequenz der SEA-Domäne des humanen Muc1 (Wreschner et al., 2002). Vadaie und Cullen (2008) entdeckten, dass das Yapsin Yps1, welches der Familie der Aspartyl-Proteasen angehört, Msb2 an der Spaltungdomäne, die als „cleavage domain“ (CD; Aminosäure 1045-1145, Abb. 1.3) bezeichnet wird, prozessiert (Krysan et al., 2005). Yps1 ist ein GPI-verankertes Membranprotein, das Proteine an monobasischen Reste spaltet. Es ist nicht bekannt, ob Msb2 an der Zell-Oberfläche oder im ER gespalten wird, da die Yapsine an beiden Standorten wirken.

Da Msb2 durch Yapsine gespalten wird, wurde eine daran abhängende Regulation des Proteins in Betracht gezogen. Es wurde angenommen, dass die Spaltung der Mucin-Domäne die Aktivierung von Msb2 zur Folge hat (Cullen et al., 2004) (Abschnitt 1.4.2.2.2).

1.4.2 Signaltransduktionswege in *S. cerevisiae*

Die Antworten auf verschiedenartige Stressfaktoren werden durch Signalwege vermittelt, welche generell aus den 3 funktionellen Modulen Empfangsmodul, Transduktionsmodul und Antwortmodul zusammengesetzt sind (Bahn et al., 2007; Singh et al., 2008). Signalwege wirken in zusammenhängenden Netzwerken, in denen mehrere Reize in eine global Antwort übersetzt werden (Bhattacharyya et al., 2006).

Die Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Wege in *S. cerevisiae* teilen sich u.a. Komponenten, um verschiedene Aspekte der zellulären Antwort zu koordinieren (Bardwell, 2006). So reagieren die Proteine, wie z. B. Cdc42, Ste20 und MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) Ste11, die sogar an 3 verschiedenen MAPK-Wegen beteiligt sind (Abb. 1.2), auf spezifische Stimuli (Errede et al., 1995), wodurch es zu einer Aktivierung spezifischer Zielgene und meist zu morphologischen Antworten kommt (Roberts et al., 2000; McClean et al., 2007). So wird bei Anwesenheit eines Paarungspheromons die MAPK Fus1, bei Nährstoffmangel die MAPK Kss1 und bei Osmostress die MAPK Hog1 aktiviert (Bardwell, 2004; Schwartz und Madhani, 2004; Dohlman und Slessareva, 2006; Elion, 2000; Dohlman und Thorner, 2001; Gimeno et al., 1992; Liu et al., 1993; Roberts und Fink, 1994; Cullen und Sprague, 2000; Raitt et al., 2000; Reiser et al., 2000; Tatebayashi et al., 2007) (Abb. 1.2).

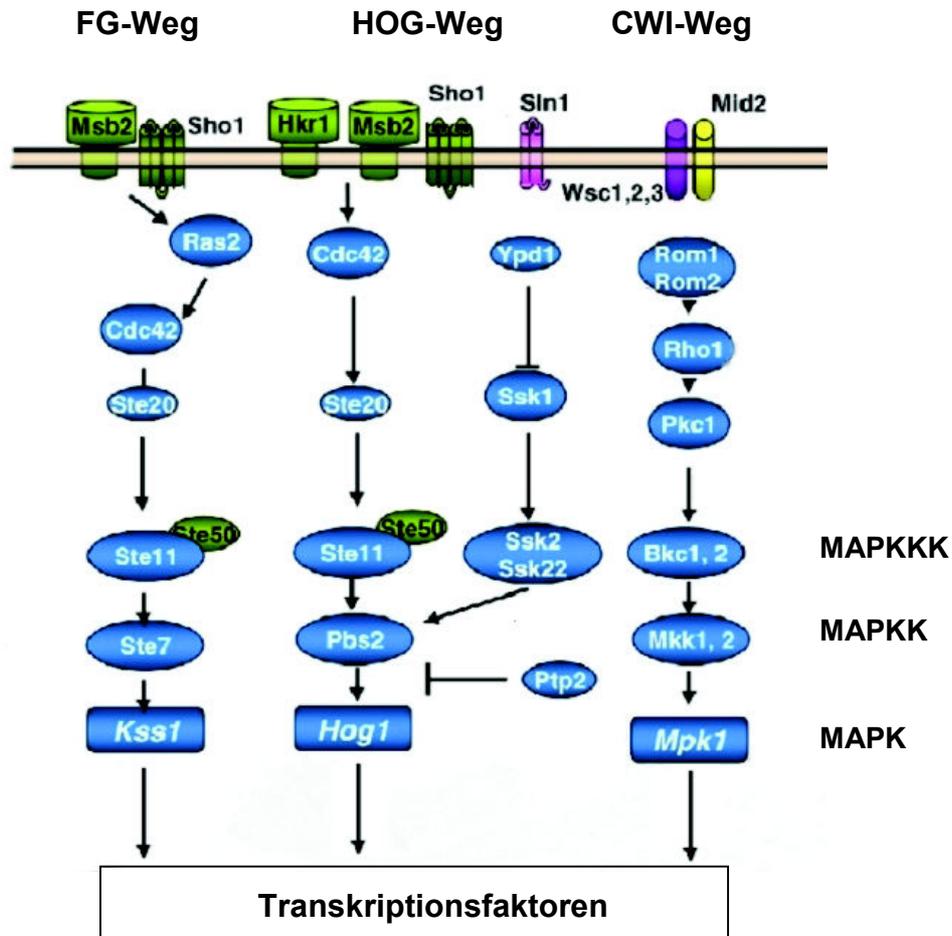


Abb. 1.2 Drei verschiedene MAPK Wege in *S. cerevisiae*

Der Filamentous Growth (FG) -, der High Osmolarity Glycerol (HOG) – und der Cell Wall Integrity (CWI)-MAPK Signalweg in *S. cerevisiae* sind abgebildet. Der FG- und der HOG-Weg teilen sich Komponenten des Weges, wie Cdc42, Ste20, Ste50 und Ste11. (Abbildung aus Rispaill *et al.* (2009), modifiziert).

1.4.2.1 Der High Osmolarity Glycerol (HOG-) Weg in *S. cerevisiae*

Der HOG (high osmolarity glycerol)-MAPK-Weg ist in *S. cerevisiae* und anderen Eukaryoten sehr gut untersucht worden und wird durch osmotischen Stress aktiviert (Westfall *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005). Die MAPK Kinase (MAPKK) Pbs2 des HOG-Weges in *S. cerevisiae* wird über zwei unabhängige Wege aktiviert, die die Sln1- bzw. Sho1-Transmembranproteine enthalten (Abb. 1.2). Nur einer dieser beiden Wege reicht zur Aktivierung einer Antwort bei osmotischen Stress aus.

Bei dem Sln1 2-Komponenten Osmosensor-Weg ist vermutlich die Transmembran-Histidin Kinase Sln1 der Sensor für osmotischen Stress (Maeda *et al.*, 1994; Posas und Saito, 1998). Sln1 detektiert Veränderungen im Turgordruck und übermittelt das Signal per Sln1-Ypd1-Ssk1 vermittelten Phosphotransfer an Pbs2 (Posas *et al.*, 1996; Reiser *et al.*, 2003).

In dem Sho1-Signaltransduktionsweg interagieren die potentiellen Osmosensoren Msb2 und Hkr1 individuell mit dem membrangebundenen Protein Sho1, welches sowohl in dem FG-

Weg als auch in dem HOG-Weg als Sensor fungiert (Abb. 1.2) (Brewster *et al.*, 1993; Brewster und Gustin, 1994; O'Rourke und Herskowitz, 1998; Cullen *et al.*, 2000; Lee und Elion, 1999). Sho1 besitzt 4 Transmembrandomänen mit 3 Schleifen von jeweils 5 bis 8 AS (Tatebayashi *et al.*, 2007) und ist in der Plasmamembran lokalisiert. Außerdem ist für Sho1 eine cytoplasmatische Src-Homologie-3 Domäne (SH3) charakteristisch (Musacchio *et al.*, 1992). Diese Domäne interagiert sowohl direkt mit der MAPKK Pbs2 des HOG-Weges (Maeda *et al.*, 1995; Zarrinpar *et al.*, 2003) als auch mit der MAPKKK Ste11 und dem Adapterprotein Ste50 (Tatebayashi *et al.*, 2006). Sho1 ist somit ein obligatorischer Adapter zwischen Ste11 und dem Pbs2 und hat somit zwei Funktionen: zum einen das Empfangen des Osmostresssignals über Msb2 oder Hkr1 und das Umwandeln des Stresssignals in ein intrazelluläres Signal, zum anderen die Adapterfunktion des Zusammenführens von Pbs2, Ste50 und Ste11 über die cytoplasmatische Domäne (Tatebayashi *et al.*, 2006). Ohne diese Adapterfunktion des Sho1 kann die Hog1 Aktivierung nicht stattfinden.

Die Interaktion von Sho1 und Cdc42 mit den Osmosensoren Msb2 und Hkr1 führt zur Aktivierung von Ste11 (MAPKKK) (Maeda *et al.*, 1995; Tatebayashi *et al.*, 2006). Anschließend wird die MAPKK Pbs2 aktiviert, die wiederum die MAP Kinase Hog1 aktiviert (Posas und Saito, 1997). Hog1 leitet daraufhin eine Serie an adaptiven Antworten ein (de Nadal *et al.*, 2002; Westfall *et al.*, 2004), wie z. B. temporären Arrest der Zellzyklus-Progression, Umstellung der Proteintranslation und Genexpression (Belli *et al.*, 2001) sowie die Synthese des Osmolyten Glycerol (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001; Hohmann, 2002; Escote *et al.*, 2004; O'Rourke und Herskowitz, 2004; Hersen *et al.*, 2008).

Neuere Studien konnten nachweisen, dass Hkr1, welches mit Msb2 am Beginn des HOG-Weges agiert, keine Rolle im FG-Weg spielt. So vermuten Pitoniak *et al.* (2009), dass Msb2 hauptsächlich im FG-Weg wirkt, Hkr1 dagegen hauptsächlich im HOG-Weg, da sie klar voneinander unterscheidbare Expressions- und Sekretionsprofile aufweisen. Außerdem vermuten Pitoniak *et al.* (2009), dass Msb2 nur als Ersatz für Hkr1 in dem HOG-Weg dient, wie es bei den MAP Kinasen Fus3 und Kss1 der Fall ist. Diese arbeiten vorzugsweise in dem Phermon- bzw. dem FG-Weg (Madhani *et al.*, 1997).

1.4.2.2 Der Filamentous Growth (FG-) Weg in *S. cerevisiae*

Unter optimalen Bedingungen wächst die Knospungshefe *S. cerevisiae* als eine runde Einzelzelle. Bei Stickstoffmangel oder bei geringer Kohlenstoff-Quelle bilden diploide Zellen Filamente aus Pseudohyphen (Gimeno *et al.*, 1992). Der FG- (filamentous growth) MAPK-Weg wird daher unter Nährstoffmangel-Bedingungen aktiviert. Dieses geschieht, um festgesessene Hefezellen auf Futtersuche zu schicken oder um schädlichen Abfallprodukten auszuweichen.

Viele der Proteine, die für die Signalweitergabe im FG-Weg verantwortlich sind, agieren auch in anderen Wegen (Schwartz und Madhani, 2004; Qi und Elion, 2005; Murphy und Blenis, 2006). Wie man der Abbildung 1.2 entnehmen kann teilen sich der HOG- und der FG-Weg die obere Signal-Maschinerie, die aus Msb2, Sho1, Cdc42, Ste20, Ste11 (Chen und Thorner, 2007; O'Rourke *et al.*, 2002; Tatebayashi *et al.*, 2006) und dem Adapterprotein Ste50 (Posas *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Truckses *et al.*, 2006) besteht.

Im FG-Weg interagieren das signalgebende Mucin Msb2 und das Adapterprotein Sho1 (O'Rourke und Herskowitz, 1998; Cullen *et al.*, 2004) mit Cdc42, einem globalen Regulator der Zellpolarität und der Signalweitergabe (Johnson, 1999). In seinem aktivierten GTP-Zustand und in Interaktion mit Ste20, kann Cdc42 nun das Signal weitergeben (Peter *et al.*,

1996; Leberer *et al.*, 1997). Mittels der Phosphotransduktion wird die MAPK-Kaskade, bestehend aus Ste11, Ste7, und Kss1, in Gang gesetzt (Abb. 1.2; Madhani *et al.*, 1997). Anschließend kann der FG-Weg zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, sowohl Ste12, als auch Tec1 (Liu *et al.*, 1993; Madhani *et al.*, 1997). Mittels DNA Microarray Analysen wurde Msb2 als eine Komponente des FG-Weges identifiziert, wobei *MSB2* als ein induziertes Zielgen identifiziert wurde (Cullen *et al.*, 2004). Somit ist das *MSB2*-Gen ein transkriptionales Zielgen des Weges, in dem es selbst operiert. Zeitlinger *et al.* (2003) zeigten, dass im Promotorbereich des *MSB2* zwei Konsensus-Sequenzen für die Transkriptionsfaktor Ste12 und Tec1 zu finden sind. Es konnten zusätzliche Informationen gewonnen werden, dass die *MSB2*-Expression weder durch Osmostress (Posas *et al.*, 2000; O'Rourke und Herskowitz, 2002) noch durch den Pheromonweg (Roberts *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2004) beeinflusst wird.

1.4.2.2.1 Die aktivierende HMH- und die inhibitorische STR-Domäne

Die im Abschnitt 1.4.1 erwähnte Mucin Domäne (STR, Abb. 1.3) des Msb2-Proteins erwies sich als wichtig für die Funktion, denn die Deletion dieser Domäne ruft Aktivierung des Weges und Hyperaktivität des Msb2-Proteins hervor. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass die Mucin-Repeats (Wiederholungsregionen) des Msb2 eine inhibitorische Funktion besitzen. Ein weiterer Beweis für die inhibitorische Funktion dieser Domäne war, dass Glykosylierungsdefekte das Msb2-Protein ebenfalls aktivieren. Glykosylierungsdefekte führen zur Veränderung des Mucin-Bereichs, da die Mucin-Repeats stark O-glykosyliert sind (Silverman *et al.*, 2003). Wie oben erwähnt wird Msb2 bei *S. cerevisiae* von den Proteinmannosyltransferasen Pmt1, Pmt2 und Pmt4 O-glykosyliert. Das Defizit der Pmt4 vermittelten O-Glykosylierung des Msb2 führt in einer *pmt4*-Mutante bei Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin zu einem Signal, welches den FG MAPK-Weg aktiviert. Somit aktivieren generelle Glykosylierungsdefekte die FG-Antwort (Lee und Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000).

Die extrazelluläre HMH-Domäne (961-1117 Aminosäuren, Abb. 1.3) wird der glykosylierten STR-Domäne gegenübergestellt und ist für die Aktivierung des HOG-Weges als auch des FG-Weges unentbehrlich. Yang *et al.* (2009) spekulierten, dass die positiv wirkende HMH-Domäne normalerweise durch die O-glykosylierte STR-Domäne maskiert wird, und dass bei Unterglykosylierung der STR-Domäne, z. B. durch Deletion der Region oder durch Glykosylierungsdefizite einer *pmt4*-Mutante, die HMH-Domäne demaskiert und so die Aktivierung des FG-Weges gewährleistet wird.

Es ist bekannt, dass organische Polymergele ihre Eigenschaft abhängig von dem Grad der Wasser-Aktzessibilität verändern (Tanaka *et al.*, 1980). Da die Mucin-ähnliche STR-Domäne hoch glykosyliert ist (Cullen *et al.*, 2004) und organische Polymergele bilden könnte, scheint die STR-Domäne als ein Dual-Sensor der Umgebung zu dienen. Yang *et al.* (2009) vermuten, dass zum einen die chemisch-physikalische Änderung der Oligosaccharid-Gelstruktur unter hyperosmotischen Bedingungen die essentielle HMH-Domäne demaskieren könnte, und zum anderen, dass die Unterglykosylierung des STR unter Nährstoffmangel zur Demaskierung der HMH-Domäne führen könnte. Unter beiden Bedingungen würde die HMH-Domäne ihren aktivierenden Charakter entfalten können.

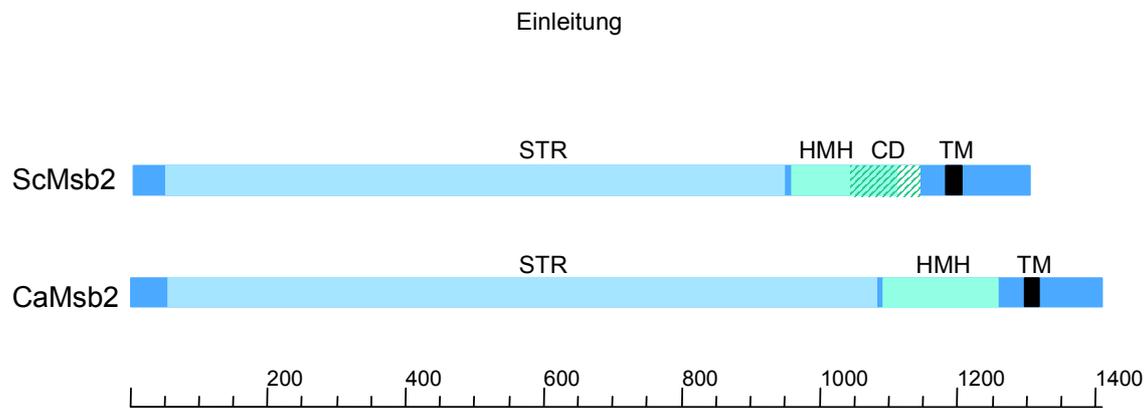


Abb. 1.3 Skizzen von Msb2 aus *S. cerevisiae* und *C. albicans*

ScMsb2 besitzt eine Serin-, Threonin-reiche Domäne (STR; Aminosäuren 51-950), eine Hkr1-Msb2 homologe Domäne (HMH; Aminosäuren 961-1111), eine Spaltungsdomäne (Cleavage domain, CD, schraffierte Fläche; Aminosäuren 1045-1145) und eine Transmembrandomäne (TM; Aminosäuren 1186-1208). CaMsb2 scheint gleiche Domänen zu enthalten, wobei die CD bislang nicht identifiziert werden konnte. Durch Alignment-Untersuchungen konnten die Domänen STR (Aminosäuren 57-1083), HMH (Aminosäuren 1094-1259) und TM (Aminosäuren 1297-1319) zugeordnet werden (Cottier, 2007).

1.4.2.2.2 Die aktivierende Spaltung

Vadaie *et al.* (2008) konnten nachweisen, dass Msb2 in *S. cerevisiae* gespalten wird, wobei die extrazelluläre Domäne ins Medium sekretiert und der kurze cytoplasmatische Teil des Msb2 innerhalb der Zelle verbleibt und hauptsächlich in der Vakuole akkumuliert.

Die Spaltung erfolgt durch Yps1, welches ein Familienmitglied der Yapsin-Proteine ist ((Yps1, Mkc7/Yps2, Yps3, Yps6, and Yps7 (Krysan *et al.*, 2005). Es handelt sich dabei um eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -verankerte Aspartylprotease, die Glykoproteine durch Spaltung in der extrazellulären Domäne an monobasischen Aminosäuren prozessiert (Bourbonnais *et al.*, 2000). Es wurde behauptet, dass die Msb2-Spaltung zur Aktivierung des FG-Weges führt. Tatsächlich ist die Spaltung und somit die Sekretion des extrazellulären Msb2 in einer *yps1* Mutante blockiert (Vadaie *et al.*, 2008), wobei aber die Aktivierung des FG-Weges in der *yps1* Mutante weiterhin bestehen bleibt. Eine fehlende Spaltung kann die Induktion des FG-Signalweges durch Glykosylierungsdefekte ebenfalls nicht beeinflussen. Nur die Deletion der Cleavage Domain (CD, Abb. 1.3) führte zur Inhibierung der FG-Antwort; da diese CD Region teilweise innerhalb der aktivierenden HMH-Domäne liegt, könnte sich die Deletion der CD aber auf die Aktivierung auswirken. Die Deletion der HMH-Domäne, wie bereits im Abschnitt 1.4.2.2.1 erwähnt, stört die Aktivierung des FG-Weges. Damit ist nicht ausgeschlossen, dass die Aktivierung des FG-Weges unabhängig von der Msb2-Spaltung induziert wird (Yang *et al.*, 2009).

1.4.2.2.3 Kreuzreaktionen zwischen FG- und HOG-Weg

Der FG- und der HOG- Weg teilen sich die obere Signal-Maschinerie (Chen und Thorner, 2007) (Abb. 1.2), jedoch aktiviert der osmotische Stress ausschließlich die Hog1 MAP Kinase (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann, 2002) und Nährstoffmangel bzw. Glykosylierungsdefekte aktivieren (Abschnitt 1.4.2.2.1) die Kss1 MAP Kinase des FG-Weges.

Damit bei spezifischen Stressbedingungen nur ein bestimmter Weg angeschaltet wird, gibt es eine reziproke Inhibierungsschleife zwischen Hog1 und Kss1, so dass die Aktivierung

einer der MAPK-Wege stabil erhalten bleibt (Yang *et al.*, 2009). Bei Glykosylierungsdefekten wird die Maschinerie der FG-Antwort angeschaltet; dabei wird die Hog1 MAP Kinase durch die Tyrosin-Phosphatase Ptp2 inhibiert (Abb. 1.2), indem Hog1 de-phosphoryliert wird (Yang *et al.*, 2009). Dadurch bleibt der FG-Weg an- und der HOG-Weg ausgeschaltet. Obwohl kein osmotischer Stress sondern Glykosylierungsdefekte vorliegen, wird der HOG-Weg in Abwesenheit von Ptp2 oder Kss1, das vermutlich an der Ptp2 Aktivierung beteiligt ist, induziert. Auch die Aktivierung des FG-Weges kann umgekehrt durch Osmostress in der *hog1* Mutante hervorgerufen werden (Hall *et al.*, 1996; O'Rourke und Herskowitz, 1998; Davenport *et al.*, 1999). Ist jedoch die Hog1 Kinase vorhanden, so wird Kss1 durch diese direkt oder indirekt inhibiert. In der pathogenen Hefe *C. albicans* inhibiert Hog1 ebenso die Filament-induzierende Cek1 MAPK (homologes Protein zu Kss1; Eismann *et al.*, 2006). Somit ist die Inhibierung von Kss1 durch die MAPK Hog1 ein konserviertes Merkmal der MAPK-Wege der Hefen und Kreuzreaktionen der verschiedenen Wege werden vermieden. Doch auch durch Auswirkungen unterschiedlicher Stimuli auf bestimmte Regionen des Proteins wird ein spezifischer Signalweg aktiviert und Kreuzreaktionen werden vermieden. Es ist bekannt, dass die cytoplasmatische SH3-Domäne des Sho1 die MAPKK Pbs2 bindet; somit ist die SH3-Domäne für die Aktivierung des HOG-Signalweges essentiell, aber für den FG-Weg nicht zwingend nötig (Maeda *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist die cytoplasmatische Region des Msb2 essentiell für den FG-Weg, aber weniger wichtig für den HOG-Weg (Tatebayashi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009).

1.4.2.3 Cell Wall Integrity (CWI-) Weg in *S. cerevisiae*

Die Integrität der Zellwand von *S. cerevisiae* wird durch den CWI-Signalweg (Cell Wall Integrity) sichergestellt. Umgebungsstress und andere Störungen der Zelloberfläche werden durch die in der Plasmamembran lokalisierten Sensoren Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 detektiert und über Signaltransduktionswege weitergeleitet (Heinisch *et al.*, 1999). Veränderungen der Zellwand-Zusammensetzung können u.a. in Mutanten mit Defekten in der Glukanbiosynthese, durch Agenzien wie Calcofluor White und Caspofungin oder durch Pheromon-induzierte Morphogenese verursacht werden. Diese können zu Konformationsänderungen der extrazellulären Domäne der Sensoren führen, die zur Signaltransduktion an die cytoplasmatische Domäne führen (Levin, 2005). Das Signal wird zunächst vom Sensor auf Rom2, einen GDP/GTP exchange factor (GEF), übertragen, welcher nun die kleine GTPase Rho1 in eine aktive GTP-gebundene Form überführt (Abbildung 1.2). Anschließend wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die wiederum aufeinanderfolgende Proteinkinasen, die einem MAPK-Modul angehören (MAPKKK Bkc1, MAPKK Mkk1 und Mkk2, MAPK Mpk1) aktiviert. Abschließend wird das Signal an zwei Transkriptionsfaktoren, Rim1 und den Komplex Swi4 und Swi6 übermittelt. Die zellulären Antworten äußern sich in transkriptionaler Aktivierung der Gene, die Zellwandaufbau und -struktur bewirken.

Zellwandstörungen, verursacht durch Behandlung mit zellwanddestabilisierenden Agenzien oder durch Mutationen in Genen, die in Zellwandbiogenese involviert sind, führen zur Aktivierung von CWI-abhängigen Zellwand-Kompensations-Mechanismen (Lagorce *et al.*, 2003; de Nobel *et al.*, 2000). Die Kompensation der Zellwand-Schwäche beruht z.T. auf Erhöhung des Chitin-Gehalts der Zellwand (Popolo *et al.*, 2001). Der Chitin-Gehalt ist auch in *pmt*-Mutanten (Gentsch und Tanner, 1996; Prill *et al.*, 1995) und in *msb2*-Mutanten (Imai *et al.*, 2005; Cottier, 2007) erhöht.

Die CWI-Sensoren Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 haben nur geringe Sequenz-Identitäten untereinander (ca. 30 % zwischen den Wsc-Typen und 50 % zwischen Mid2 und Mtl1), teilen sich aber einige Eigenschaften, die mit denen des Msb2-Sensors identisch sind. Sie besitzen eine Transmembrandomäne, eine kurze cytoplasmatische und eine große extrazelluläre Domäne, die Serin-, Threonin-reiche und hochglykosylierte Sequenzen (STR) beinhaltet (Lommel *et al.*, 2004; Philip und Levin, 2001). Des Weiteren werden die CWI-Sensoren, wie Msb2 im FG-Weg, durch Proteinmannosyltransferasen O-glykosyliert (Lommel *et al.*, 2004). Wsc1, Wsc2 und Mid2 werden von Pmt2 und Pmt4 und vermutlich auch von Pmt1 mannosyliert und diese O-Mannosylierung ist zum Schutz gegen proteolytischen Abbau dieser Proteine und dadurch zur Aktivierung des CWI-Weges notwendig.

Neben den Ähnlichkeiten zwischen dem Sensor Msb2 und den Sensoren des CWI haben Birkaya *et al.* (2009) nachgewiesen, dass die Zellwandintegrität durch den CWI- und auch indirekt durch den FG-Weg kontrolliert wird (Levin, 2005). Sie behaupten, dass zwischen den zwei Wegen eine Verbindung bestehen muss, denn sowohl der Mid2 als auch der Wsc2 Sensor sind an dem invasiven Wachstum und auch der Hyphenbildung beteiligt und die Expression von FG-Signalweg-Reportern wie *SVS1* und *PGU1* wird durch Überexpression der CWI-Sensoren induziert (Roberts *et al.*, 2000). Birkaya *et al.* (2009) vermuten weiterhin, dass Mid2 und Wsc2 den FG MAPK-Signalweg über Msb2 und über weitere Komponenten stimulieren. Somit steuert der CWI-Weg zum FG-Weg Signale auf der Höhe von Zelloberflächenproteinen bei. Die Sensoren des CWI fördern möglicherweise die Aktivität des FG-Weges durch einen Mechanismus, welcher das Msb2 benötigt. So wird vermutet, dass entweder eine direkte Interaktion zwischen den Zelloberflächenproteinen des FG- und des CWI-Weges vorkommt, oder dass indirekte Regulationsmechanismen ablaufen, z. B. durch Regulierung der Genexpression von *MSB2* durch den FG-Weg. Dadurch wird der FG-Weg durch den CWI-Weg stimuliert, während er durch den HOG-Weg inhibiert wird (Piontak *et al.*, 2009); der FG-Weg wird durch den Pheromon-Weg nicht beeinflusst (Roberts und Fink, 1994).

1.4.3 Msb2 in *C. albicans*

F. Cottier (2007) konnte im Rahmen seiner Dissertationsarbeit ein zu Msb2 von *S. cerevisiae* homologes Protein in dem pathogenen Pilz *C. albicans* identifizieren, das zu 36,1 % ähnlich und zu 21,9 % identisch zu ScMsb2 ist. *CaMSB2* auf Chromosom 2 umfasst einen 4230 bp-langen ORF (open reading frame), der für ein 1410 Aminosäuren-langes Protein kodiert. Die Topologie dieses Proteins stimmt mit Msb2 aus *S. cerevisiae* überein. So enthält CaMsb2 eine Transmembrandomäne, eine cytoplasmatische Region von 89 Aminosäuren und eine sehr große extrazelluläre Domäne (Abb. 1.3). Außerdem besitzt dieses Protein ebenfalls die STR-(Serin-Threonin reiche) Domäne (Abschnitt 1.4.1), die zu 43 % aus den beiden Aminosäuren Serin und Threonin besteht (Cottier, 2007).

1.4.3.1 Der FG-Weg in *C. albicans*

Da ScMsb2 einen Sensor für Nährstoffmangel in dem FG- (filamentous growth) MAPK-Weg repräsentiert, so wurde vermutet, dass CaMsb2 ebenfalls ein Rezeptor des homologen Cek1 MAPK-Signalweges ist. Die Hyphenbildung bei *C. albicans*, die eine der wichtigsten Virulenzeigenschaften darstellt, kann u.a. durch diesen MAPK-Signalweg induziert werden. Der Wechsel zwischen Hefe- und der Hyphenform, auch Dimorphismus genannt, spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenität des Pilzes, da durch die Hyphen *C. albicans* in der Lage ist, an Epithelzellen zu adhären und diese anschließend zu penetrieren (Odds, 1994). Dadurch kann der Pilz z. B. bei immunsupprimierten Personen systemische Candidosen auslösen, die tödlich verlaufen können (Wey *et al.*, 1988). Der Cek1-Weg ist neben der Hyphenbildung auch an Wachstum und Zellwandbiogenese beteiligt (Csank *et al.*, 1998; Eisman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009) und besteht bei *C. albicans* aus den Sho1-, Cst20-, Ste11- (MAPKKK), Hst7- (MAPKK), Cek1-Proteinen, die u.a. den Cph1-Transkriptionsfaktor regulieren (Arana *et al.*, 2008) (Abb. 1.4).

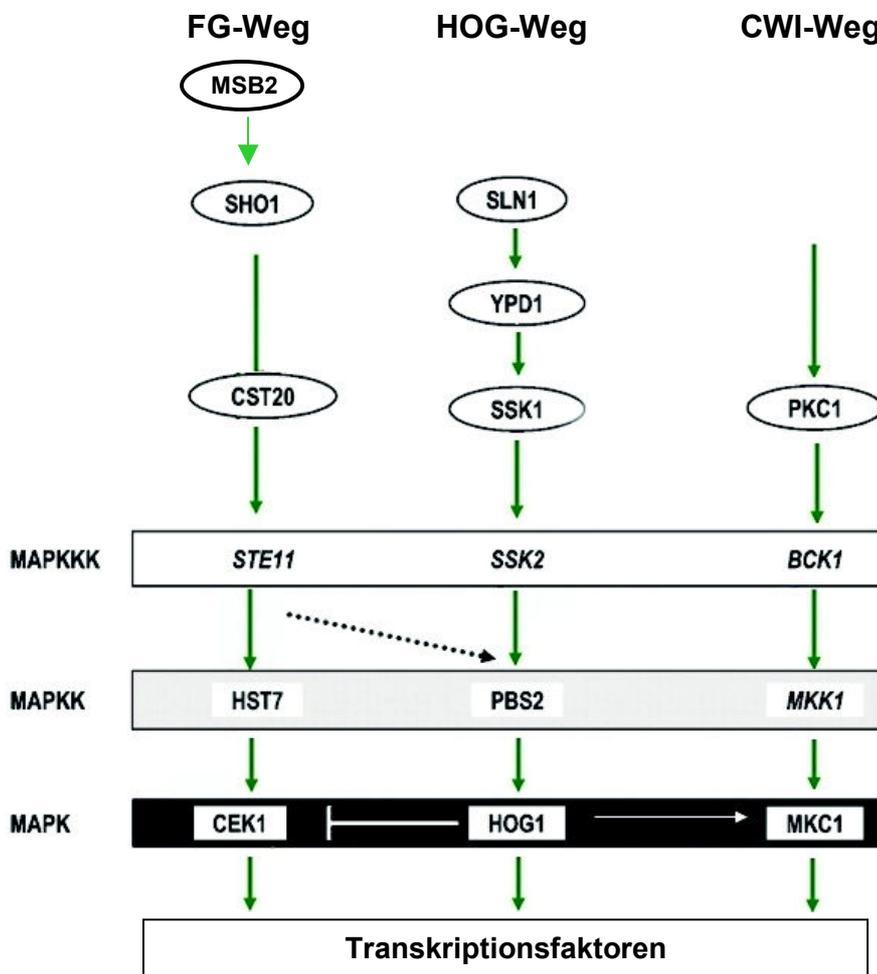


Abb. 1.4 Drei verschiedene MAPK Wege in *C. albicans*

Es sind der Filamentous Growth (FG) -, der High Osmolarity Glycerol (HOG) – und der Cell Wall Integrity (CWI)-MAPK Signalweg in *C. albicans* abgebildet. (Abbildung aus Monge *et al.* (2006), modifiziert).

Cottier (2007) konnte feststellen, dass eine *msb2*-Mutante eine stark veränderte Zellwand aufweist, wobei sowohl der Chitin- als auch der β 1,3-Glukan Anteil in dieser Mutante erhöht sind und der Anteil des β 1,6-Glukans erniedrigt ist. Aufgrund dieser Veränderungen reagiert die Mutante verstärkt sensitiv auf zellwanddestabilisierende Agenzien wie Congo Rot, Calcofluor White und Caspofungin. Daher scheint Msb2 in Zusammenarbeit mit Sho1 die Aktivierung der MAPK Cek1 als Antwort auf Zellwanddefekte zu kontrollieren und in Zellwandbiogenese involviert zu sein. Msb2 und Sho1 sind, wie in *S. cerevisiae*, für die Phosphorylierung der Cek1 MAPK bei Zellwanddefekten verantwortlich, denn in *msb2*- und *sho1*- Mutanten konnte bei Anwesenheit von Congo Rot keine Cek1 Aktivierung festgestellt werden (Román *et al.*, 2009). Glykosylierungsdefekte in *pmt*-Mutanten (Prill *et al.*, 2005) oder durch Tunicamycin-Zugabe führten zur Aktivierung der Cek1 MAPK (Román *et al.*, 2009). Anders als bei *S. cerevisiae* konnten jedoch Cantero *et al.* (2007) nachweisen, dass alleine die O-Glykosylierungsdefekte in *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten schon ausreichen, um die Cek1 MAPK verstärkt zu phosphorylieren (Prill *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2003; Hutzler *et al.*, 2004). Bei *S. cerevisiae* waren dagegen sowohl defekte O-Glykosylierung in *pmt4*-Mutanten als auch defekte N-Glykosylierung (Tunicamycin-Behandlung) für die Kss1-Aktivierung erforderlich. Somit kann Msb2 als Zellwand- und Membran-Sensor die Defekte der Glykosylierung, welche durch die *pmt1* und *pmt4* Mutanten verursacht werden, detektieren und die Aktivierung von Cek1 hervorrufen. Die Cek1-Weg-Aktivierung bei Glykosylierungsdefekten dient der Regulation der *PMT*-Genexpression (Cantero und Ernst, 2011). So wurde nachgewiesen, dass der basale *PMT1* Transkriptspiegel in den *msb2*- und *cek1*-Mutanten deutlich erhöht war, welcher unter Normalbedingungen offenbar durch Msb2 und Cek1 reprimiert wird. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der O-Glykosylierungsdefekt, der durch *pmt1* verursacht wurde, durch Induktion der *PMT2*- und *PMT4*-Gene kompensiert wird und dass für diese Induktion Msb2 erforderlich ist (Cantero und Ernst, 2011).

1.4.3.2 Der HOG-Weg in *Candida albicans*

Es konnte festgestellt werden, dass die *msb2*-Mutante nicht osmosensitiv ist, aber dass eine *ssk1 msb2*-Doppelmutante stärkere Sensitivität aufweist als die *ssk1* Einzelmutante. Das deutet darauf hin, dass Msb2 auch an der Aktivierung des Hog1-Signalweges beteiligt sein muss. Kreuzreaktionen zwischen den beiden MAPK-Wegen sind somit in *C. albicans* wie bei *S. cerevisiae* nicht auszuschließen. Des Weiteren weist eine *hog1* Mutante hyperfilamentöses Wachstum auf, da Hog1 wie in *S. cerevisiae* ein Repressor der Cek1/Kss1-Aktivierung ist (Eisman *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2005). Infolgedessen ist eine höhere basale Aktivierung des Cek1-Proteins in den *ssk1*- und *hog1*-Mutanten vorzufinden. Diese Mutationen rufen zum einen hyperfilamentöses Wachstum hervor und zum anderen führen sie zu einer erhöhten Resistenz gegen Zellwand-Inhibitoren (Eisman *et al.*, 2006). Cek1 und Hog1 sind somit Gegenspieler, welche sich gegenseitig regulieren, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

In *C. albicans* wie in *S. cerevisiae*) sind zwei Signalwege für die Hog1 Aktivierung verantwortlich, die sowohl die Morphogenese als auch Resistenz gegen oxidativen Stress regeln (Abschnitt 1.4.2.1; Calera *et al.*, 2000; Román *et al.*, 2005). Das Ssk1 Protein in *C. albicans* scheint jedoch Hauptkomponente für die oxidative Aktivierung der Hog1 MAPK zu sein, während CaSte11 hauptsächlich an der Zellwandbiogenese beteiligt ist (Calera *et al.*, 2000; Román *et al.*, 2005).

1.4.3.3 Das Sekretom von *C. albicans*

Das Sekretom der Pilze, d. h. die Gesamtheit der ins Medium sekretierten Proteine, ist abhängig von verschiedenen Bedingungen. Das Sekretom von *C. albicans* beinhaltet 283 Proteine (Lee *et al.*, 2003; Sorgo *et al.*, 2010), während das Sekretom von *S. cerevisiae* auf 163 Proteine beschränkt ist (Yang *et al.*, 2006). Verglichen mit dem Sekretom von weiteren nicht-pathogenen Hefen wie *Kluyveromyces lactis* (178 Proteine) (Swaim *et al.*, 2008) oder *Pichia pastoris* (88 Proteine) (Mattanovich *et al.*, 2009) erscheint das Sekretom von *C. albicans* sehr groß. Möglicherweise haben Pathogene generell ein solch großes Sekretom. Im Sekretom von *C. albicans* wurden unter den typischen sekretorischen Proteinen auch Zellwandproteine (Klis *et al.*, 2009), cytosolische Proteine und das lösliche, nicht membrangebundene Msb2 identifiziert. Das lösliche Msb2-Protein wird offenbar kontinuierlich ins Sekretom entlassen, sowohl bei 30 °C, wobei ausschließlich Hefezellen vorzufinden sind, bei 37 °C, wo ein Gemisch aus Hefe und Hyphenzellen vorhanden ist als auch bei Anwesenheit des Hypheninduktors N-Acetylglukosamin (Sorgo *et al.*, 2010). Die Aminosäuresequenz des löslichen Msb2 im Sekretom ist unvollständig, und die identifizierten Msb2-Peptide reichen nur bis zu der Aminosäure 1290 (Sorgo *et al.*, 2010). In ungefähr dieser Region befindet sich die bereits erwähnte „Clevage Domain“ (CD) des Msb2 aus *S. cerevisiae*. So kann vermutet werden, dass eine CD-Domäne ebenfalls in Msb2 von *C. albicans* vorzufinden ist.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Msb2 ist ein Membransensor des Filamentous growth (FG) Signaltransduktionsweges in *S. cerevisiae* und das homologe Msb2 in *C. albicans* scheint ebenfalls als Rezeptor in einem FG-Weg zu fungieren (Román *et al.*, 2009). Die *msb2*-Mutante in *C. albicans* weist Veränderungen der Zellwand auf und reagiert in folgedessen verstärkt sensitiv auf zellwanddestabilisierende Agenzien. Deshalb scheint Msb2 auch in Zellwandbiogenese involviert zu sein und auf Zellwanddefekte und Nahrungsmittelknappheit durch Aktivierung der MAPK Cek1 zu reagieren.

Bislang wurde Msb2 von *C. albicans* wenig auf molekularer Ebene untersucht. Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung von Msb2, wobei die Sekretion, die proteolytische Spaltung, sowie die Glykosylierung von Msb2 charakterisiert werden sollten. Des Weiteren sollten an Msb2 Struktur-Funktionsanalysen durchgeführt werden und nach neuen Funktionen des sekretierten Msb2 gesucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

Agar, Nutrient Broth (Oxoid)
 Agarose (Gibco BRL)
 Antibiotika, BSA, Ethidiumbromid, SDS (Serva)
 Bradford-Reagenz (Bio Rad)
 Bromphenol Blau (Janssen)
 Carrier-DNA (Clontech)
 DNA-Größenstandard (MBI Fermentas)
 DNA Purification Kit, Gel Extraction Kit (Qiagen)
 Glukose (Caesar & Lorentz GmbH)
 Hefeextrakt, Pepton, Trypton, YNB w/o aminoacids (Difco Laboratories)
 HEPES, Magermilchpulver (Applichem)
 ImmobilonP-Membran (Millipore)
 Isopropanol (Fluka)
 PEG, Glycerin, Glasperlen, KCL, DMSO (Roth)
 Proteinmarker (Fermentas, Invitrogen)
 QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
 Restriktionsenzyme (Roche, NE Biolabs, MBI Fermentas, Gibco BRL)
 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
 Tunicamycin, Calcofluor White, Total Protein Kit, Micro Lowry (Sigma)

2.2 Stämme

2.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 α F'	F ⁻ [Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA1 relA</i>	Hannahan, 1983 Woodcock <i>et al.</i> , 1989

2.2.2 *S. cerevisiae* StämmeTabelle 2.2: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1p-HIS3 GAL2p-ADE met2::GAL7p-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

2.2.3 *C. albicans* StämmeTabelle 2.3: Verwendete und hergestellte *C. albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CAF2-1	<i>URA3/ ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	<i>ura3::imm434/ ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
FCCa27	wie CAI4, aber <i>msb2-1::hisG/ msb2-1::hisG-URA3-hisG</i>	Cottier, 2007
FCCa28	wie CAI4, aber <i>msb2-1::hisG/ msb2-1::hisG</i>	Cottier, 2007
CAP1-3121	wie CAI4, aber <i>pmt1::hisG/ pmt1::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
P2-22	wie CAI4, aber <i>pmt2::hisG/PMT2</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
CAP4-2164	wie CAI4, aber <i>pmt4::hisG/ pmt4::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
P5-5744	wie CAI4, aber <i>pmt5::hisG/ pmt5::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
CAP2-2311	wie CAI4, aber <i>pmt6::hisG/ pmt6::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
CPP1123	wie CAI4, aber <i>pmt6::hisG/ pmt6::hisG, pmt1::hisG/ pmt1::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
P15-274	wie CAI4, aber <i>pmt1::hisG/ pmt1::hisG pmt5::URA3/ pmt5::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
Δmnn9 clone1	wie CAI4, aber <i>mnn9::hisG/ mnn9::hisG</i>	Southard <i>et al.</i> , 1999
CNA4	wie CAI4, aber <i>kex2::hisG/ kex2::hisG</i>	Newport und Agabian, 1997
Δsap9	wie CAI4, aber <i>sap9::hisG/ sap9::hisG</i>	Albrecht <i>et al.</i> 2006
Δsap10	wie CAI4, aber <i>sap10::hisG/ sap10::hisG</i>	Albrecht <i>et al.</i> 2006
Δsap9 Δ10	wie CAI4, aber <i>sap9::hisG/ sap9::hisG sap10::hisG/ sap10::hisG</i>	Albrecht <i>et al.</i> 2006
REP18	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG msb2::FRT/msb2::FRT</i>	Pla <i>et al.</i> , 2009
CIS23	Wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{HA}::SAT1</i>	Schmidt, 2007
CIS29	Wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{V5}::URA3</i>	Schmidt, 2007

In dieser Arbeit hergestellte *C. albicans* Transformanten:

Stamm	Genotyp
ESCa3 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa5 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES11c (ACT1p-MSB2^{HA-V5 end})</i>
ESCa7 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pDS1044-2 (ACT1p)</i>
ESCa8 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES10 (ACT1p-MSB2^{HA})</i>
ESCa9 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>msb2-1/msb2-1::pES10 (MSB2p-MSB2^{HA})</i>
ESCa10 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>msb2-1/msb2-1::pES11a (MSB2p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa11 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>msb2-1/msb2-1::pES11c (MSB2p-MSB2^{HA-V5 end})</i>
ESCa13 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES12 (ACT1p-MSB2 N501Q^{HA-V5 mid})</i>
ESCa14 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2:: pNH2 (ACT1p-MSB2 N1191Q^{HA-V5 mid})</i>
ESCa15 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pNH8 (ACT1p-MSB2 N591Q^{HA-V5 mid})</i>
ESCa16 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2:: pES13 (ACT1p-MSB2 N1191Q N591Q^{HA-V5 mid})</i>
ESCa17 (-1,2,3)	wie Δ mn9 clon 1, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa18 (-1,2,3)	wie CAP1-3121, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa19 (-1,2,3)	wie P2-22, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa20 (-1,2,3)	wie CAP4-2164, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa21 (-1,2,3)	wie P5-5744, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa22 (-1,2,3)	wie CAP2-2311, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCaP15 (-1,2,3)	wie P15-274, aber <i>pmt5:: hisG/ pmt5::hisG</i>
ESCa23 (-1,2,3)	wie ESCaP15, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa24 (-1,2,3)	wie CPP1123, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa25 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa26 (-1,2,3)	wie CAP1-3121, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa27 (-1,2,3)	wie P2-22, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa28 (-1,2,3)	wie CAP4-2164, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa29 (-1,2,3)	wie P5-5744, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa30 (-1,2,3)	wie CAP2-2311, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa31 (-1,2,3)	wie ESCaP15, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa32 (-1,2,3)	wie CPP1123, aber <i>LEU2/LEU2::pES14 (ACT1p-MSB2-ΔN^{HA-V5 mid})</i>
ESCa33 (-1,2,3)	wie Δ sap9, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa34 (-1,2,3)	wie Δ sap10, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa35 (-1,2,3)	wie Δ sap9 Δ 10, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa36 (-1,2,3)	wie CNA4, aber <i>LEU2/LEU2::pES11a (ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid})</i>
ESCa37 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES15 (PCK1p-MSB2-tail^{V5 mid})</i>
ESCa38 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES16 (ACT1p-MSB2-ΔC^{HA})</i>
ESCa39 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES17 (ACT1p-MSB2-ΔTM-C^{HA})</i>
ESCa40 (-1,2,3)	wie FCCa28, aber <i>LEU2/LEU2::pES18 (ACT1p-MSB2 Y1408G^{HA-V5 mid})</i>

2.3 Medien

2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

Bei der Herstellung von festen Nährböden wurde 2 % Agar zugesetzt. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37 °C. Zur Selektion plasmidkodierter Ampicillinresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben.

2.3.2 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium): 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

YPGal: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Galaktose

SD (Minimalmedium): 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose, pH 6,9 mit NaOH eingestellt

SCAA: 0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 4 % Casaminosäuren

Bei Bedarf wurden dem Medium Aminosäuren nach Zimmermann (1975) zugegeben. Dafür wurde eine Stocklösung der benötigten Aminosäuren hergestellt, und von diesem Aminosäure-Mix 50 ml pro 1 l Medium zugesetzt.

Aminosäure-Mix (Zimmermann, 1975):
pro 1 l destilliertem Wasser

Adenin	0,28 g	Leucin	1,44 g	Tyrosin	0,72 g
Arginin	0,48 g	Methionin	0,48 g	Uracil	0,48 g
Histidin	0,48 g	Phenylalanin	1,2 g	Valin	0,72 g
Isoleucin	1,44 g	Threonin	0,72 g		
Lysin	0,72 g	Tryptophan	0,48 g		

Zur Herstellung fester Medien wurden 1,5 % Agar zugegeben. Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30 °C.

2.3.3 Sensitivitätstest

Die zu untersuchenden Stämme werden bei 30 °C über Nacht wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Bestimmung und Einstellung der $OD_{600} = 1$ einer 1 ml großen Kultur. Mit dieser Kultur wurde eine Verdünnungsreihe 1/10 in 5 Schritten hergestellt, so daß die letzte Verdünnung eine OD_{600} von 0,0001 aufwies. 5 µl jeder Verdünnung wurde auf die Platten aufgetragen. Anschließend wurden die Platten bei 30 °C 24, 48, 72 oder 96 Stunden inkubiert und abschließend fotografisch datiert. Die in den Platten verwendeten Substanzen und ihre Konzentrationen sind in der Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Stammlösung	Lösungsmittel
OGT 2371 (Pmt1-Inhibitor)	4 μ M	10 mM	DMSO
Tunicamycin	2 μ g/ml	10 mg/ml	DMSO
Caspofungin	125 ng/ml	1 mg/ml	dH ₂ O

2.3.4 Hypheninduktion bei *C. albicans* auf festen Medien

Für die Hypheninduktion bei *C. albicans* wurden YPM-Platten mit 2 % Mannitol angefertigt. Die vereinzelt Zellen wurden mehrere Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden die entstandenen Kolonien fotografisch dokumentiert.

2.3.5 Hypheninduktion bei *C. albicans* in flüssigem Medium

Zur Hypheninduktion von *C. albicans* in flüssigem Medium wurde flüssiges YPM-Medium verwendet. Zuvor wurde die Übernachtskultur (30 °C) gewaschen und auf OD₆₀₀ = 0,05 eingestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C für mehrere Stunden inkubiert. Die Hyphen wurden nach Anfärbung mit Calcofluor White unter dem Mikroskop (Zeiss Axioskop) beobachtet

2.4 Plasmide und Primer

2.4.1 Plasmide

Tabelle 2.5 Verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pDS1044-1	CaARS, ACT1p, SAT1, CaURA3, CaLEU2, ori, Amp ^R	Tielker <i>et al.</i> , 2009
pBI1-1	CaARS, PCK1p, CaURA3, CaLEU2, ori, Amp ^R	Stoldt <i>et al.</i> , 1997
pGAD-C1	ADH1p-GAL4-Aktivierungsdomäne (AD); LEU2-Marker	James <i>et al.</i> , 1996
pGBD-C1	ADH1p-GAL4-Bindedomänedomäne (BD); TRP1-Marker	James <i>et al.</i> , 1996
pGAD-Ino2	CaINO2-GAL4-AD-Fusion in pGAD-C1	Hoppen <i>et al.</i> , 2007
pGBD-Ino4	CaINO4-GAL4-BD-Fusion in pGBD-C1	Hoppen <i>et al.</i> , 2007
pNH2	wie pES11a, nur N1191Q	Horak unveröffentlicht
pNH8	wie pES11a, nur N591Q	Horak unveröffentlicht

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pGBD-C-tail	<i>MSB2-C-TAIL-GAL4</i> -BD-Fusion in pGBD-C1	diese Arbeit
pGAD- <i>CDC42</i>	<i>CDC42-GAL4-AD</i> -Fusion in pGAD-C1	diese Arbeit
pES10	pDS1044-1; <i>MSB2</i> ^{HA} integriert in die Restriktionsschnittstelle <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pES11a	pDS1044-1; <i>MSB2</i> ^{HA-V5 mid} integriert in die Restriktionsschnittstelle <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pES11c	pDS1044-1; <i>MSB2</i> ^{HA-V5 end} integriert in die Restriktionsschnittstelle <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pES12	wie pES11a, mit Mutation N501Q	diese Arbeit
pES13	wie pES11a, mit Mutation N1191Q und N591Q	diese Arbeit
pES14	wie pES11a, mit Deletion innerhalb <i>MSB2</i>	diese Arbeit
pES15	pBI1; cytoplasmatische Domäne des <i>MSB2</i> (<i>Msb2-tail</i>) integriert in die Restriktionsschnittstelle <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pES16	wie pES11a, mit Mutation Stoppcodon 15 bp nach Transmembrandomäne (TM)	diese Arbeit
pES17	wie pES11a, mit Mutation Stoppcodon vor TM	diese Arbeit
pES18	wie pES11a, mit Mutation Y1408G	diese Arbeit

2.4.2 Primer

Tabelle 2.6 Hergestellte Primer

Primer	Sequenz
<i>Msb2</i> -ATG- <i>XhoI</i>	5'-TGAATCTCGAGATGTTGGCCAACGTTAAATTG-3'
IPF6003-3'	5'-CTTGATGGCTCAGCTGATGC-3'
HA-hin	5'-GAAACCACTTCATTAGTGAGATCTTACCCATACGATGTT CCTGACTATGCGAACCCCTACCGATTCCCAAATTG-3'
HA-her	5'-CAATTTGGGAATCGGTAGGGTTCGCATAGTCAGGAACAT CGTA TGGGTAAGATCTCACTAATGAAGTGGTTTC-3'
<i>Msb2</i> -int2	5'-GCTACTGGTTCTCAAGTTAC-3'
<i>Msb2</i> -Stopp- <i>XhoI</i> - <i>NotI</i>	5'-ATTCAGCGGCCGCTCGAGCTAATGATACCAACCCAA TG-3'
PCR1 Hin	5'-CAACAGCTGCTAGCGAG-3'
PCR1 Mitte Her	5'-CCCGGGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG GATAGGCTTACCACCACCTTCTAATGCCTTATTAC-3'
PCR1 Ende Her	5'-CCCGGGCTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTT AGGGATAGGCTTACCACCACCATGATACCAACCCAATG-3'
PCR2 Her	5'-GGGTACCGGGCCC-3'
PCR2 Mitte Hin	5'-GGTGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTC TCGATTCTACGCCCGGGTTACCAATTACTGATTC-3'
PCR2 Ende Hin	5'-GGTGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCT CGATTCTACGTAGCCCGGGCTCGAGGCGAGTG-3'
1N->Q vor2	5'-CCTGACTATGCGCAACCTACCGATTCC-3'

Primer	Sequenz
1N->Q rück2	5'-GGAATCGGTAGGTTGCGCATAGTCAGG-3'
2N->Q vor2	5'-GGTGATAAAT CGTTGCAACAAGTTTCTGTACGTTCG-3'
2N->Q rück2	5'-CGACGTACAGAACTTGTTGCAACGATTTATCACC-3'
3N->Q vor	5'-CAACTGCTGAGCAATTGTCTACTTTTG-3'
3N->Q rück	5'-CAAAGTAGACAATTGCTCAGCAGTTG-3'
<i>Cla</i> 1 Del1 next1	5'-CCATCGATGAAATCTCTGAAAAAATTACCAATAGC-3'
<i>Cla</i> 1 Del1 next2	5'-CCATCGATGATTTCTCCAATCTGGTATTGCATAGTTC-3'
C-Tail vor (<i>Xho</i> I)	5'-CCGCTCGAGATGAGAAAGTTTAGAAAGAG-3'
C-Tail rück (<i>Xho</i> I)	5'-CCGCTCGAGTAAAGTTCTCTAATGATACC-3'
<i>MSB</i> 2 Stopp nach TM Hin	5'-GAAAGTTTAGAAAGTAGTAAGTAGCTAGCTTAAGAGTA ATAAGGCATTAG-3'
<i>MSB</i> 2 Stopp nach TM Her	5'-CTAATGCCTTACTCTTAAGCTAGCTACTTACTACTT TCTAAACTTTC-3'
<i>MSB</i> 2 Stopp vor TM Hin	5'-CGATAAAGGAAGATAGTAAGTAGCTAGCTTAAGATTGCT GGTATAAC-3'
<i>MSB</i> 2 Stopp vor TM Her	5'-GTTATACCAGCAATCTTAAGCTAGCTACTTACTATC TTCCTTTATCG-3'
Y gegen g vor 2	5'-CATTGGGTTGGGGGCATTAGCTC-3'
Y gegen g rueck 2	5'-GAGCTAATGCCCCCAACCCAATG-3'
C-Tail vor (<i>Bam</i> HI)	5'-CGCGGATCCATGAGAAAGTTTAGAAAGAG-3'
C-Tail rück (<i>Bg</i> III)	5'-GGAAGATCTTAAAGTTCTCTAATGATACC-3'
<i>CDC42</i> vor (<i>Eco</i> RI)	5'-CCGGAATTCATCATGCAAACATAAAAATG-3'
<i>CDC42</i> rück (<i>Bg</i> III)	5'-GGAAGATCTCGCCGACCTATAAAAATAG-3'

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Transformation

2.5.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch die Rubidiumchlorid-Methode erlangen logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Behandlung der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (1985): Ein paar Kolonien wurden in 5 ml Medium resuspendiert. Damit wurden anschließend 50 ml Medium neuinokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37 °C wachsen gelassen. Nach einer anschließenden Abkühlung von 15 min bis zwei Stunden wurden die Zellen geerntet (15 min, 3500 x g, 4 °C). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in 20 ml eiskalter RF1-Lösung (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 15% Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 N Essigsäure eingestellt) resuspendiert, dann zwei Stunden auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Nun wurden das Zellpellet erneut in 4 ml Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 6,8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in 200 µl und 300 µl Volumen in Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.5.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* wurde nach der Rubidiumchlorid-Methode von Hanahan *et al.* (1983) durchgeführt. Der *E. coli*-Stamm DH5 α F' wurde für die Transformationen von Plasmid-DNA zur Amplifikationszwecken, sowie für die Transformation von Mutagenese-PCR Produkten verwendet wird.

100 μ l Rubidiumchlorid-kompetente *E. coli*-Zellen wurden 5 min auf Eis aufgetaut und anschließend 1-10 ng Plasmid-DNA den Zellen zugeführt. Zellen wurde nach 30 min Inkubationszeit auf Eis ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec zugefügt. Nach anschließendem Abkühlen auf dem Eis wurden die Zellen 30 min bis zu einer Stunde bei 37 °C in LB Medium regeneriert. Abschließend wurden die Zellen geerntet und auf LB-Platten ausplattiert.

2.5.1.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Zur Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA wurde die Lithiumacetat-Methode nach Gietz und Schiestl (1995) verwendet. Zunächst wurde 200 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 geschüttelt. Nach anschließendem Ernten der Zellen und einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und bei 30 °C für 5 min inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen bei 13000 Upm für 15 sec wurde pro Transformationsansatz 240 μ l 50 % PEG 3500, 36 μ l 1 M Lithiumacetat, 25 μ l denaturierter Carrier-DNA (2 mg/ml) und Plasmid-DNA (2,5-5 μ g pro Plasmid) in 50 μ l destilliertem Wasser in der angegebenen Reihenfolge den Zellen zugeführt. Nun erfolgte ein sorgfältiges Mischen jedes Ansatzes auf dem Vortex und eine 30 min Inkubation bei 30 °C. Anschließend wurde ein 20 minütiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation bei 7000 Upm für 15 sec pelletiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und abschließend wurde das Zellpellet in 1 ml destilliertem Wasser aufgenommen und 200 μ l dieser Suspension auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5.1.4 Transformation von *C. albicans* nach Mitchell

Für die Mitchell Transformation wurden zunächst 500 μ l der Übernachtskultur zum Animpfen einer 50 ml YPD-Hauptkultur benötigt, die anschließend vier Stunden bei 30 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Kultur 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert und in 5 ml einer LATE-Lösung (0,1 M LiAc, 10 mM Tris HCL pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8, die ganze Lösung mit HCl auf pH 5 einstellen) resuspendiert, erneut geerntet und anschließend in 0,5 ml LATE-Lösung aufgenommen. Nun wurde der Zellsuspension (0,1 ml) 5 μ l Carrier-DNA (10 mg/ml) und 2 μ l bis 10 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmente hinzugegeben und bei 30 °C 30 min inkubiert. Nun wurde 0,7 ml PLATE (40 g PEG3350 wurden mit LATE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt) hinzugesetzt und über Nacht (ca. 15 Stunden) bei 30 °C inkubiert.

Der nachfolgende Schritt war ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C mit anschließendem Pelletieren bei 3500 Upm. Dann wurde das Pellet in 5 ml YPD resuspendiert und vier Stunden bei 30 °C regeneriert. Abschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, das Pellet auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 30 °C für 2-4 Tage inkubiert.

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

Die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab (ausgehend von 5 ml Übernachtskultur) wurde mittels des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen durchgeführt, wobei die Methode auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab (ausgehend von 100 ml ÜN-Kultur) erfolgt mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-Kits nach dem Protokoll des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in Wasser eluiert und war für Konzentrationsanalysen bereit. Die Plasmid-DNA wurde für Transformationen, für Restriktionsanalysen und auch direkt zur DNA Sequenzierung eingesetzt.

2.5.3 Isolierung chromosomaler DNA

Zunächst wurde eine 5 ml Übernachtskultur geerntet. Nach anschließendem Waschen in dH₂O wurde das Zellpellet in 400 µl SCE / DTT / Zymolyase-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Pelletieren bei 4000 Upm für 5 min wurde das Zellpellet in 500 µl 50 mM EDTA + 50 µl 10% SDS resuspendiert. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 65 °C, die anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Nun wurde durch Zugabe von 100 µl 5 M KAC pH 6.0 ein 30 bis 90-minütiger Inkubationsschritt eingeleitet, der auf Eis gekühlt durchgeführt wurde. Nach anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit 900 µl eiskaltem absolutem EtOH versetzt. Anschließend wurde das Pellet, welches zuvor durch weitere Zentrifugation für 15 min mit 13000 Upm und 4 °C entstand, in 400 µl RNase-Lsg. (RNase 2 mg/ml, 150 mM NaAC pH 5,9 in TE-Puffer) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform Extraktion, bei der 400 µl Phenol/Chloroform zugeführt wurden, wurde die obere Phase der Extraktion abgenommen. Die obere Phase der Extraktion wurde mit 800 µl EtOH versetzt, um die DNA über Nacht bei -20 °C zu fällen. Abschließend wurde die gefällte DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.4 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen wurden in Auftragsarbeit der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) ausgeführt. Dafür wurden 900 ng bis 3 µg DNA-Proben und 300 pmol Oligonukleotid DNA in einem Endvolumen von 30 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

2.5.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die DNA wurde je nach Größe der Fragmente in 0,5-2 %-igen Agarosegelen (Ultra-Pure-Agarosepulver von Invitrogen) in 0,5x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) bei 75-90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA, die zuvor mit Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt wurde, wurde durch Zuführen von 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 50 ml Agaroselösung und anschließender UV-Licht Bestrahlung (254 nm) detektiert.

2.5.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.5.6.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

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

Gesetz: $E_{260} \cdot \epsilon = c$. Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht der Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA sowie 33 $\mu\text{g/ml}$ Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993). Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen lag der Wert unter 1,8.

2.5.6.2 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel

Nach Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese kann die Konzentration der durch Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden durch Vergleich mit einer definierten Menge eines Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten, die direkt für Restriktionsansätze oder für Sequenzierung benutzt werden sollten, wurde das PCR-Purification-Kit nach Herstellerprotokoll verwendet (Qiagen)

2.5.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach Ausschneiden der Fragmente das Qiaquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen verwendet. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

2.5.9 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme der Firmen Roche, New England Biolabs, Gibco BRL und MBI Fermentas wurden verwendet, wobei die Restriktions-Ansätze etwa 1-2 μg DNA und ca. 10 U des benötigten Enzyms enthalten und zwischen 2 und 16 Stunden bei der erforderlichen Temperatur inkubiert wurden. Zur Überprüfung der Restriktion wurde ein Aliquot des Restriktions-Ansatzes mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

2.5.10 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 20 μl mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Das Verhältnis von Vektor zu Insert-DNA variierte von 1:10 bis 10:1. Alternativ wurde das Quick Ligation Kit von New England Biolabs verwendet, wobei die dreifache molare Menge des Fragmentes und 50 ng der Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

2.5.11 DNA-Größenstandard

Als Größenstandard für die Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen wurde die DNA des Phagen Lambda genutzt (MBI-Fermentas), die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/HindIII* oder *HindIII* geschnitten wurde. Als weiteren Standard wurde die 1 kb Leiter des Herstellers MBI-Fermentas verwendet.

2.5.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.12.1 Standard-PCR

Um spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR, Mullis & Faloona, 1987) in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Mit Hilfe zweier Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzen, der 4 Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP, dGTP und der DNA-Polymerase wurde bei der PCR das betreffende DNA-Fragment in jedem Zyklus dupliziert. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten, der Denaturierung der DNA, dem Anlagern der Oligonukleotide (Annealing) und der DNA-Kettenverlängerung (Elongation). Anhand der eingesetzten Primer wurde die Annealing-Temperatur, sowie die Elongationszeit der PCR bestimmt. Für Amplifikationen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase von NEB eingesetzt. Zur Herstellung von PCR-Produkten mit einer möglichst geringen Mutationsrate wurde der „Expand™ High Fidelity“-PCR-Kit von Roche Diagnostics verwendet.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	10-100 ng
dNTP Mix	200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotid vorwärts	20 pmol
Oligonukleotid rückwärts	20 pmol
10 x Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 µl
H ₂ O (steril)	ad 49 µl
Taq-Polymerase	1 µl (= 5 U)

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	95 °C	5 min
2.	95 °C	30 sec
3.	y °C	30 sec
4.	68 °C	1 min/kb
5.	68 °C	10 min

x-fache Zyklen

y: spezifische Annealing-Temperatur

2.5.12.2 Mutagenese-PCR

Um spezifische Mutationen, Deletionen oder Insertionen (z. B. Restriktionsschnittstellen) innerhalb eines Plasmids einzuführen, wurde die Mutagenese-PCR mit Hilfe des QuikChange Site-directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten nach Angabe des Herstellers. Hierbei wurde die vom Hersteller mitgelieferte Turbo-*Pfu*-Polymerase sowie ein spezielles PCR-Programm verwendet. Nach dieser Durchführung wurde anschließend 10 U *DpnI* zum Reaktions-Ansatz zugegeben und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, um so die methylierte Template-DNA zu degradieren. Anschließend konnte eine *E. coli* Transformation durchgeführt werden.

2.5.13 Calcofluor White Färbung

Durch Verwendung des Farbstoffs Calcofluor White konnten Zellwände und Septen angefärbt werden, da dieser Farbstoff in das Chitin interkaliert. Der Farbstoff wurde in der

Konzentration von 2 µg/ml den Zellen zugeführt und wurde bei der Wellenlänge von 365 nm im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

2.5.14 Mikroskopische Untersuchung

Die Mikroskopie wurde mit dem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bilder wurden mit der CCD-Kamera von Sony aufgenommen und mit dem Programm PhotolImpact 8, dem Programm Photopaint 9.0 und Microsoft Office Powerpoint bearbeitet.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Proteinrohextrakten

Zur Rohextrakt-Herstellung wurden 20 ml bis 50 ml Medium aus einer Übernachtskultur auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Anschließend wurde die Kultur mehrere Stunden bei 30 °C bis zu einer OD_{600} zwischen 0,2 bis 1,0 oder, wenn gewünscht bis zur stationären Phase wachsen gelassen. Nach der Wachstumsphase wurde diese Kultur abzentrifugiert (5 min, 3500 Upm), das Pellet in 2 ml dH₂O gewaschen und über Nacht bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 200 µl bis 500 µl Lysis-Puffer (50 mM HEPES (pH 7,5 mit KOH), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen und mit einem Volumen Glasperlen versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte durch zweimaliges 10-minütiges Schütteln auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kunkel) bei 2200 Upm und 4 °C. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 3500 Upm und 4 °C wurden die Zelltrümmer und die Glasperlen vom Rohextrakt abgetrennt.

Alternativ wurde zum Zellaufschluß der FastPrep Automated Homogenizer der Firma MP Biomedicals verwendet. Zuvor wurde die Zellsuspension (im Lysis-Puffer) in Cruel-Röhrchen aufgeteilt und mit einem Volumen Glasperlen versetzt. Die Geschwindigkeit des Gerätes betrug 6 m/s und es wurden 6 Zyklen von je 45 Sekunden vorgenommen. Zwischen jeweils 2 Zyklen wurde 5 min auf Eis inkubiert. Die Glasperlen sowie die Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 Upm und 4 °C vom Rohextrakt getrennt.

Der klare Überstand wurde bei -70 °C gelagert und konnte sofort auf ein SDS-Proteingel aufgetragen oder zur Proteinkonzentrations-Bestimmung verwendet werden.

2.6.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine

Für die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde zunächst die Säule präpariert. So wurden die Antikörperbeads (Anti-HA Affinity Matrix (Roche) bzw. Anti-V5 Agarose Affinity Gel (Sigma)) mit 4 Volumeneinheiten PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) versetzt und auf die Säule gegeben. Nachdem das PBS abgelaufen war und die Beads sich an der Säule gesetzt haben, wurde die Säule mit 2 Volumeneinheiten PBS gewaschen. Nun wurde 5 ml Säulenlagerungspuffer (20 mM Tris-Base, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,09 % Natriumazid) auf die Säule gegeben, welche bei 4 °C aufbewahrt werden konnte.

Vor der Proteinaufreinigung wurde die Matrix mit 10 ml Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zelllysate, wobei es sich entweder um Rohextrakt oder Wachstumsmedium (Überstand) handelte, auf die Matrix gegeben. Der Durchfluß des Lysats

wurde aufgefangen. Dann wurde die Matrix dreimal mit je 10 ml Lysis-Puffer gewaschen, wobei diese Waschfraktionen ebenfalls aufgesammelt wurden. Für die Elution des Zielproteins wurde zweimal 1 ml der Peptide in TBS (HA-Peptide (1 mg/ml) von Roche bzw. V5-Peptide (1 mg/ml) von Sigma) auf die Matrix aufgetragen und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Eluat wurde aufgefangen und für weitere Experimente verwendet. Die Matrix konnte mehrmals verwendet werden, somit musste die Säule durch Zugabe von zweimal 10 ml Regenerationspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,0) wieder hergestellt werden. Die Äquibrierung erfolgte durch zweimalige Zugabe von 10 ml Äquibrierungspuffer (20 mM Tris-Base, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,1 mM EDTA) und die Lagerung der Säulenmatrix erfolgte in 5 ml Säulenlagerungspuffer bei 4 °C.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.6.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein Assay Dye Reagent der Firma BioRad verwendet. Es wurden 790 µl dH₂O mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Anschließend wurde 10 µl der Probe zugegeben und die Extinktion bei 595 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. An Hand einer mit BSA (Rinderserum-Albumin) erstellten Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Die Bestimmung beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt.

2.6.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Total Protein Kit, Micro Lowry von Sigma verwendet. Zur Leerprobe, Proben und den zum Kit gehörender Standard-Proben wird die Lowry Reagent Lösung dazugefügt und 20 min inkubiert. Anschließend wird die Phenol Reagent Lösung allen Proben zugesetzt und erneut für 30 min inkubiert. Abschließend wird bei einer Wellenlänge 500 nm bis 800 nm die Extinktion der Proben gemessen und an Hand der Eichkurve (Standard-Proben) konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.6.3.3 Proteinkonzentrationsabschätzung

Zur Proteinbestimmung wurden HA-Peptide (1 mg/ml in TBS gelöst; von Roche) in definierter Menge auf eine aktivierte PVDF-Membran getropft. Es wurden ebenfalls Tropfen des zu untersuchenden Proteins aufgetragen. Anschließend wurden nach der Western-Blot Methode die Signale detektiert. Mit Hilfe des Programms FUJIFILM Multi Gauge konnten nun die Signalstärken miteinander verglichen werden und in Relation zueinander gesetzt werden. Anhand der verwendeten definierten Mengen der HA-Peptide konnte die Intensität der Signale in einer Standardkurve in µg/ml dargestellt werden. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnte nun von der Signalstärke des zu untersuchenden Proteins auf die Konzentration des Proteins geschlossen werden.

2.6.4 Methoden zur Western Blot Analyse

2.6.4.1 Protein-Größenstandard

Für die Proteine der Größe 11 bis 170 kDa wurde der Größenstandard PageRuler von Fermentas und für Proteine der Größe 31 bis 460 kDa wurde der Größenstandard HiMark™ Pre-Stained High Molecular Weight Protein Standard von Invitrogen benutzt.

2.6.4.2 Antikörper

Tab. 2.7: Verwendete Primärantikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-HA (1-7)	Monoklonal, Ratte	1:2000	Roche
Anti-V5 (1-34), (1-36)	Monoklonal, Maus	1:2000	AbD, Serotec

Tab. 2.8: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-Maus, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:10000	Thermo Scientific
Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:10000	Thermo Scientific

2.6.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde eine modifizierte Methode nach Laemmli (1970) durchgeführt. Als Matrix wurden SDS-enthaltende Gele verwendet, deren Polyacrylamid-Konzentration zwischen 3 % und 12 % variierte. Zur Herstellung dieser Matrix wurde die Apparatur von Hoefer Scientific verwendet. Zunächst wurde das Trenngel (0,375 M Tris (pH 8,8); 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 3-12 % Acrylamid gegossen, welches anschließend mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel (0,125 M Tris (pH 6,7), 0,1 % SDS, 0,8 % APS, 0,1 % TEMED, 5 % Acrylamid) auf das Trenngel geschichtet. Der Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) wurde für die Gelelektrophorese verwendet.

Als Alternative diente die XCell SureLock™ mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit 4-20 % und 8 % SDS-Gelen der Firma Pierce. Hierfür wurde ein HEPES-Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % SDS (w/v)) benötigt. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit 1/3 Volumen 3 x Laemmli-Probepuffer versetzt, 10 min bei 75 °C bis 95 °C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Anfärbung der Gele wurde mittels der Coomassie- bzw. Silberfärbung durchgeführt.

2.6.4.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zum Anfärben der Proteingele wurde die Bio-Safe Coomassie-Färbelösung von BIO-RAD verwendet. Zunächst wurde das Gel dreimal 5 min in 100 ml dH₂O gewaschen, dann in 50 ml der Färbelösung gefärbt und anschließend in 100 ml dH₂O wieder entfärbt.

2.6.4.5 Silberfärbung von Proteingelen

Für diese Färbung wurde zunächst das Proteingel in der Fixierlösung (50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das

Gel dreimal in 50 % Ethanol gewaschen und für 1 min in 0,2 g/l Natriumthiosulfat-Pentahydrat inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in dH₂O für je 20 Sek wurde das Gel mit Silbernitrat (0,2 g/100 ml, 75 µl Formaldehyd) gefärbt. Nach weiteren Waschschritten in dH₂O wurde die Färbung mit Hilfe der Entwicklerlösung (15 g Natriumcarbonat, 20 µl Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 125 µl Formaldehyd) durchgeführt. Mittels der Stopplösung (50 % Methanol, 12 % Essigsäure) wurde die Entwicklung unterbrochen.

2.6.4.6 Proteinnachweis durch Immunoblot-Analysen

Die in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran von Millipore) übertragen, die zuvor mit Methanol aktiviert worden war. Als Puffer für die Übertragung der Proteine diente ein Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol). Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und 40 Volt bzw. 2 h bei Raumtemperatur mit 80 Volt. Als Alternative konnte der Proteintransfer mit dem „XCell Blot Module“ über Nacht bei 4 °C und 10 Volt, bzw. 1,5 h bei 150 Volt durchgeführt werden. Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulverlösung inkubiert, um potentielle unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte im Anschluss an das Blockieren für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Dann wurde die PVDF Membran mit TBST-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % (w/w) Tween-20) dreimal für je 10 min gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in TBST für 1 h inkubiert. Nach erneuten Waschschritten mit TBST konnte die Detektion durch Verwendung des Chemilumineszenz-Substrat „SuperSignal[®] West Dura“ der Firma Pierce und des LAS1000 durchgeführt werden.

2.6.5 Gelfiltrationschromatographie von Proteinen

Bei der Methode der Gelfiltrationschromatographie handelt es sich um eine Methode der Ausschlusschromatographie, bei der Moleküle nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Die verwendbare Säulenmatrix in diesem Experiment war Superdex 200 10 /300 GL Säule (GE Healthcare). Zunächst mußte eine Eichung der Säule erfolgen. Dafür wurde eine Kalibriergerade mit Proteinen bekannter Molekülmasse erstellt. Bei den Markerproteinen (Sigma, Gel Filtration Molecular Weight Markers) handelt es sich zum einen um die Carbonatanhydrase aus Rinder-Erythrozyten (3 mg/ml, Molekulargewicht 29000), Rinderserum-Albumin (10 mg/ml, Molekulargewicht 66000), Alkoholdehydrogenase (5 mg/ml, Molekulargewicht 150000), β-Amylase (4 mg/ml, Molekulargewicht 200000) und zum anderen Apoferritin (10 mg/ml, Molekulargewicht 434000) und Thyroglobulin (8 mg/ml, Molekulargewicht 669000). Zunächst wurde das Ausschlussvolumen der Säule ermittelt, indem das Blue Dextran (2 mg/ml, molekulare Masse von 2000 kDa) eingesetzt wurde. Alle in diesem Experiment verwendeten Proben und Puffer wurden entgast und steril filtriert. Die Messung erfolgte mit dem ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Die Fliessgeschwindigkeit in diesen Experimenten wurde auf 0,4 ml/min eingestellt. Die Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 200 µl wurden aufgesammelt und für Western-Blot Analysen verwendet.

2.6.6 Protein-Fällung

Es wurden 4 Volumen Aceton zu der Proteinsuspension zugegeben und mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde das gefällte Protein durch Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm) pelletiert und von der restlichen Lösung getrennt. Nun konnte das Pellet in neuen Puffer aufgenommen werden.

2.6.7 Deglykosylierung von Proteinen

2.6.7.1 PNGase F- Behandlung

Eine Abspaltung der *N*-Glykosylierung wurde mit Hilfe von PNGase F (Peptid:*N*-glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum*) der Firma Roche durchgeführt werden. Bei PNGase F handelt es sich um eine Amidase, die zwischen dem Asparagin und dem ersten *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) der Glykosylkette die *N*-Glykosylierung abspaltet. Hierbei wurde zunächst 10 μl des Mediums gefällt und in dH_2O aufgenommen, anschließend wurde 1/10 Volumen Denaturierungspuffer der Probe zugesetzt und bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min inkubiert. Nach der Denaturierung wurde 1/10 Volumen Reaktionspuffer und 1/10 Volumen 10 % NP-40 sowie 1 μl PNGaseF (10 U) zugeführt. Nun erfolgte eine 1 h Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abschließend wurden den Proben 3 x Laemmli-Probenpuffer zugegeben und eine SDS-PAGE durchgeführt.

2.6.7.2 α -Mannosidase-Behandlung

Eine Abspaltung der *N*-Glykosylierung wurde mit Hilfe von α -Mannosidase (aus *Canavalia ensiformis* (Jack bean)) der Firma Sigma durchgeführt werden. Mittels der α -Mannosidase wurde eine Hydrolyse der α 1-2 und α 1-3 gebundenen D-Mannopyranosyl-Reste von Oligosacchariden katalysiert. Es wurden 10 μl des Mediums gefällt und anschließend in 10 μl dH_2O , TE oder NaAc (50 mM Natriumacetat, 5 mM CaCl_2 , pH 5.5) aufgenommen. Nun wurden 10 U des Enzyms α -Mannosidase zugeführt und 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Abschließend wurden den Proben 3 x Laemmli-Probenpuffer zugegeben und eine SDS-PAGE durchgeführt.

2.6.7.3 β -Eliminierung-Behandlung

Bei der β -Eliminierung wurde die *O*-Glykosylierung chemisch entfernt. Hierfür wurde das GlycoProfile™ β -Elimination Kit von Sigma verwendet. Es wurde 200 μl des Mediums gefällt und im selben Volumen dH_2O aufgenommen. Optional wurde das Protein vor der Behandlung 30 min bei ca. $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert, da dies die Deglykosylierung unterstützen kann. Dann wurde 40 μl der β -Elimination Reagent Mixture der Probe zugesetzt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Probe mit 1 M HCl auf den pH-Wert 6 bis 8 neutralisiert und für SDS-PAGE Analysen verwendet.

2.6.7.4 Behandlung mit Trifluoromethansulfonsäure (TFMS)

Bei dieser Deglykosylierungsmethode wurde das chemische Reagenz Trifluoromethansulfonsäure (TFMS) aus dem GlycoProfile™IV, Chemical Deglycosylation Kit der Firma Sigma Kit verwendet. Diese Reagenz sollte sowohl *N*-glykosidisch als auch *O*-glykosidisch gebundene Zuckerketten abspalten. 1,5 ml des Mediums, welches zuvor von Zellmaterial entfernt wurde, wurde in die dafür vorgesehene Glasbehälter eingefügt und bei –

20 °C eingefroren. Dann wurde das Medium über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurde schnell 150 µl der auf 2 bis 8 °C vorgekühlten TFMS auf die gekühlte Probe und auch auf das im Kit vorhandenen Standardprotein gegeben. Dann wurde das Protein durch leichtes Schaukeln gelöst und bei 4 °C 25 min bei leichtem Schwenken inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Pyridin-Lösung im Ethanol-Trockeneisbad vorgekühlt. Nun wurde 4 µl 0,2 % Bromphenol Blau Lösung den Proben zugeführt, so dass die Proben sich rot verfärbten. Anschließend wurde tropfenweise die Pyridin-Lösung zugegeben, um die Proben zu neutralisieren, was sich in dem Farbwechsel der Probe in Blau-Gelb widerspiegeln sollte. Dabei wurden die Proben im Ethanol-Trockeneisbad abgekühlt, da es sich um eine sehr starke exotherme Reaktion handelt. Der Farbumschlag zu blau-gelb zeigte die Neutralisierung an.

2.6.7.4.1 Puffer-Austausch mittels Dialyse-Kassetten

Zum Austausch des Puffers wurde die Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes der Firma Thermo Science verwendet. Hierfür wurde die Kassette zunächst 1 bis 2 min im Austausch-Puffer (PBS) hydratisiert. Nun wurde die Kassette mit Hilfe einer Spritze mit der Probe befüllt, so dass kaum Luft in der Kassette vorhanden war und die Probe an der Kassetten-Membran gut verteilt war. Anschließend wurde die Kassette 3-Mal in den Austausch-Puffer (PBS) für jeweils 2 h bei Raumtemperatur gesetzt, wobei bei jedem Durchgang frischer Puffer benutzt wurde. Das 4. und somit letztes Mal wurde die Kassette bei 4 °C über Nacht dialysiert. Abschließend wurde die Probe mit der Spritze aus der Kassette entfernt und für weitere Analysen verwendet.

2.6.8 Inhibierung von Proteinase Reaktionen

Tab. 2.9: Verwendete Proteinase-Inhibitoren

Substanz	Konzentration	Stammlösung	Lösungsmittel
Complete, Mini, EDTA-free-Tabletten	1 Tab in 10 ml	---	---
Pepstatin A	1-15 µg/ml	1 mg/ml	Methanol
Amastatin	1-15 µg/ml	1 mg/ml	dH ₂ O

Zur Inhibierung von Proteinase Reaktionen wurden verschiedene Inhibitoren dem Medium zugesetzt. Zum einen wurden Inhibitor-Tabletten (Complete, Mini, EDTA-free-Tabletten der Firma Roche) eingesetzt, welche ein breites Spektrum an verschiedenen Protease-Inhibitoren beinhalte. Dadurch wurden effektiv Serin- und Cysteinproteasen gehemmt, aber keine Metallo- und Aspartylproteasen. Zum anderen wurde Pepstatin A der Firma Sigma-Aldrich verwendet, welches ein Aspartylprotease-Hemmer ist. Das Enzym wurde in Methanol gelöst und in einer Arbeitskonzentration von 0,7 - 3,5 µg/ml verwendet. Amastatin der Firma Appli Chem, bei dem es sich um einen Aminopeptidase-Inhibitor handelt, wurde in dH₂O gelöst und in einer Arbeitskonzentration von 0,5 – 5 µg/ml eingesetzt.

Eine Übernacht-Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ = 0,1 inokuliert. Sofort nach der Inokulation wurde der jeweilige Proteinase-Inhibitor dem Medium zugesetzt. Die Kultur wurde bei 30 °C 5 h bis 24 h inkubiert, wobei entweder einmalig, zu Anfang, oder jeweils alle 8 Stunden der Inhibitor der Probe zugegeben wurde. Anschließend wurde das Medium geerntet und für SDS-PAGE weiter verwendet.

2.6.9 Analyse zur Schutzfunktion von Msb2 gegenüber antimikrobiellen Peptiden

2.6.9.1 Flüssigassay-Analyse mit Histatin 5

Eine Übernachtskultur oder eine Kultur in logarithmischer Phase (ca. $OD_{600} = 0,8$), die in YPD bei 37 °C oder 30 °C gewachsen war, wurde geerntet und mit 0,1 M PBS gewaschen und anschließend in dem Volumen einer definierte OD_{600} in PBS gelöst. Nun wurden 100 µl der Zellsuspension in jedes Well (Vertiefung) einer 96 Well-Platte hineingegeben. Anschließend wurde zu jedem Well, außer zu dem mit den Kontrollstamm, Histatin 5 (von AnaSpec, Inc.) zugefügt. Es wurde zwischen 4 und 40 µg Histatin 5 der 100 µl großen Suspension zugegeben. Die empfohlene Arbeitskonzentration des antimikrobiellen Peptids Histatin 5 ist ca. 400 µg/ml). Somit sollte 40 µg in 100 µl Lösung zugefügt werden. Die Platte wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine XTT-Menadion Reduktionsmethode zum Nachweis von physiologisch aktiven *C. albicans* Zellen (Ramage *et al.*, 2001). Hierbei wurde 100 µl einer 1:5 Lösung (1,5 mM 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid (XTT); 0,4 mM Menadion) in jedes Well pipettiert und für 2 h bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei OD_{490} nm im Mikroplatten-Reader gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.6.9.2 Flüssigassay-Analyse mit dem Aβ42 Peptid

Eine Übernachtskultur, die bei 37 °C in YPD-Medium gewachsen war, wurde in YPD inokuliert und bis zu einer ungefähren $OD_{600} = 0,4$ wachsen gelassen, dann wurde die Zellsuspension nach einem Waschschrift in RPMI überführt und mit dem Aβ42 Peptid (Bachem) versetzt. Es wurden 100 µl der Zellsuspension in jedes Well der 96 Well-Platte zugegeben. Anschließend wurde das Aβ42 Peptid der Suspension zugeführt. Nach Soscia *et al.* (2010) sollte der MIC Wert von Aβ42 Peptid bei ca. 1 µg/ml liegen. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ist die niedrigste Konzentration eines antimikrobiellen Produkts, welche das Wachstum eines Organismus inhibiert. Es wurde zwischen 0,125 µg/ml und 4 µg/ml Aβ42 Peptid der Zellsuspension zugegeben, und über Nacht bei 37 °C inkubiert, wobei die Platte leicht geschüttelt wurde und sich im Feuchtraum (verschließbares Gefäß mit feuchten Tüchern ausgelegt) befand, um keine Verdunstungseffekte zu erhalten. Abschließend erfolgte die XTT-Menadion Reduktionsmethode, wie sie schon im Abschnitt 2.6.9.1 erklärt wurde.

2.6.9.3 Histatin 5 Assay auf Agar-Platten

Da im Flüssigassay viel der Sustanz (Aβ Peptid und Histatin 5) verbraucht wurde, wurde der Test in kleinerem Volumen auf YPD Platten durchgeführt. Zunächst wurde eine Übernachtskultur in frisches YPD inokuliert und bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ wachsen gelassen. Dann wurde die Suspension mit PBS gewaschen und anschließend wurden 5 µl der Zellsuspension (gelöst in PBS) mit Histatin 5 (1 µg bis 10 µg in 25 µl Endvolumen) und dH₂O auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht. Zu einigen Proben wurde 10 µl des aufgereinigten Msb2-Proteins zugegeben, wobei das Endvolumen von 25 µl nicht überschritten werden durfte und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension 500-fach verdünnt und 20 µl dieser Verdünnung wurde auf einer YPD Platte ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien ausgezählt (CFU = Colony Forming Units), wobei die unbehandelten Proben 100 % darstellten. Die Proben, die mit Histatin 5 und mit oder

ohne Zugabe von Msb2 behandelt wurden, wurden in Relation zu den 100 % gestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen pro Stamm durchgeführt.

2.6.9.4 A β 42 Peptid Assay auf Agar-Platten

Dieser Versuch ist dem im Abschnitt 2.6.9.3 sehr ähnlich. Die Unterschiede waren zum einen, daß das A β 42 Peptid (10 ng bis 100 ng in 25 μ l Endvolumen) der Zellsuspension zugefügt wurde, zum anderen, daß die Inkubationszeit anstatt 1,5 h nun über Nacht andauerte. Die Auswertung wurde wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt.

2.6.10 Biofilmbildung von *C.albicans*

Eine 5 ml-große Übernachtskultur, die bei 37 °C inkubiert worden war, wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 3500 Upm geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,9 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) resuspendiert und durch 10 min Behandlung im Ultraschallbad aus den Zellaggregaten gelöst (Stichternoth, 2009). Nach erneutem Ernten wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl wurde durch OD₆₀₀-Messung mittels einer Standardkurve ermittelt. Dann wurde die Zellzahl auf 10⁶ Zellen/ml in RPMI1640 eingestellt. Von jeder der Verdünnungen wurden 0,7 ml je Well in eine 24 Well-Platte aus Polystyren der Firma Sarstedt gegeben. Zuvor wurden die leeren Platten gewogen. Dann erfolgte eine 60 h Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde das Medium entfernt und jedes Well wurde mit PBS gewaschen. Es folgte eine 24 h-Trocknungsphase bei 37 °C, um anschließend durch das Wiegen der trockenen Platten die Trockenmasse der Zellen zu ermitteln. Es wurde eine Dreifachbestimmung pro Stamm durchgeführt

2.6.11 Adhäsion von *C.albicans*

Eine 5 ml Übernachtskultur (bei 37 °C inkubiert) wurde auf 0,5 X 10⁶ Zellen verdünnt. Dann wurden je Stamm 100 μ l der Zellen pro Well in eine 96 Well-Platte hineingegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C wurde der Überstand jeden Wells entnommen und mit 100 μ l PBS vorsichtig gewaschen, um die nicht adhärenierten Zellen zu entfernen (Stichternoth, 2009). Anschließend erfolgte die Abschätzung der Lebendzellzahl mittels der XTT-Menadion Reduktionsmethode (Ramage *et al.*, 2001; Abschnitt 2.6.9.1). Die Anzucht als auch die eigentliche Adhäsion wurde unter normoxischen Bedingungen und hypoxischen Bedingungen (93,8 % N₂, 6 % CO₂, 0,2 % O₂, in der Hypoxybank INVIVO₂ 200 von Ruskinn) durchgeführt.

2.6.12 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay“)

Mittels des X-Gal Overlay Assays kann die β -Galaktosidase-Aktivität von mikrobiellen Kolonien ermittelt werden (Suckow und Hollenberg, 1998). Dafür wurden 5 μ l einer Übernachtskultur auf eine Platte getropft und bei 30 °C über Nacht wachsen gelassen. Anschließend wurde die Platte mit 10 ml einer Lösung (100 mg Agarose in 10 ml dH₂O, 10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0, 400 μ l SDS-Lösung (10 %), 400 μ l X-Gal / DMF-Lösung (40 mg/ml)) überschichtet. Die überschichtete Platte wurde für einige Stunden bei 37 °C inkubiert, bis eine Blaufärbung beobachtet wurde, die fotografisch dokumentiert wurde.

2.6.13 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Flüssigassay)

Zur genaueren Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde der β -Galaktosidase-Flüssigassay nach James *et al.* (1996) durchgeführt. Zunächst wurde die OD_{600} einer Übernacht-Kultur bestimmt. Anschließend wurde 1 ml dieser Zellsuspension 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert, worauf das Pellet in 100 μ l Lysepuffer (0,1 M Tris/HCl (pH 7,5), 0,05 % Triton X-100) resuspendiert wurde. Es folgte eine 2 stündige Inkubation bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, die mit dem Auftauen der Probe und der eigentlichen Reaktion beendet wurde. Durch Zusatz von 750 μ l Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mg/ml O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid, pH 7,0) wurde die enzymatische Reaktion gestartet und im Wasserbad bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Gelbfärbung der Proben inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l NaCO_3 gestoppt, wobei die Inkubationszeit (t) notiert wurde. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde die Extinktion bei 420 nm des Überstandes gemessen und die Miller-Units nach Miller *et al.* (1972) wurden wie folgt berechnet:

$$(1000 / t) \times (OD_{420} / OD_{600}) = X \text{ Miller-Units}$$

3 Ergebnisse

C. albicans ist ein humanpathogener Pilz, der Schleimhautinfektionen und insbesondere bei immunsupprimierten Personen systemische Candidosen auslösen kann. Der Dimorphismus, d. h. der Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform, spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenität des Pilzes. Mittels dieser Hyphen kann *C. albicans* an Endothel- und Epithelzellen adhären und anschließend diese Zellen penetrieren. Da die Hyphenbildung u.a. durch den FG-Signalweg induziert wird (Abschnitt 1.4.2) sollte der putative Sensor Msb2 dieses Weges untersucht werden. Um das Protein zu analysieren, sollte es zunächst mit Epitopen markiert werden, um anschließend seine Modifikation, Lokalisation und mögliche Funktionen zu charakterisieren.

3.1 Epitop-Markierung des Msb2

Msb2 hat eine große extrazelluläre und eine kurze cytoplasmatische Domäne, die durch eine Transmembranregion getrennt sind. Beide Domänen wurden mit unterschiedlichen Epitopen markiert, um ihren Verbleib in und außerhalb von Zellen zu charakterisieren.

3.1.1 Markierung der extrazellulären Domäne

In die N-terminale extrazelluläre Domäne von 1296 Aminosäure-Resten sollte ein HA-Epitop eingeführt werden. Die durchgeführten Schritte sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Epitop-Markierung erfolgte mittels Overlap-PCR, wobei die N-terminale Region zuerst amplifiziert wurde. Zunächst wurde die 3227 bp-große Region des *MSB2* von der Startcodonsequenz bis 55 bp stromabwärts der *PstI* Schnittstelle mittels PCR aus dem Genom des Stammes CAF2-1 amplifiziert (Primer Msb2-ATG-*XhoI* und IPF6003-3'). Durch diese Primer entstand vor der Startcodonsequenz eine *XhoI*-Schnittstelle, so dass die N-terminale Sequenz als *XhoI-PstI* Fragment isoliert und in Plasmid pUC21 kloniert werden konnte. Das entstandene Plasmid wurde mittels Mutagenese-PCR unter Verwendung der Primer HA-hin und HA-her so modifiziert, dass das HA-Epitop 1500 bp stromabwärts der *MSB2*-Startsequenz integriert wurde. Der 3'-Bereich des *MSB2*-ORF wurde mit den Primern Msb2-int2 und Msb2-Stopp-*XhoI-NotI* aus dem Genom amplifiziert; es enthält *MSB2*-Sequenzen beginnend in Position 61 bp stromaufwärts der Schnittstelle *PstI* bis zum Stoppcodon und der im Primer vorhandenen *XhoI* -Schnittstelle. Wie man der Abbildung 3.2 D entnehmen kann, überlappen die *MSB2*-Fragmente a und b in 66 bp. Beide *MSB2*-Fragmente dienten als Matrize für eine weitere PCR, wobei das ganze *MSB2* mit den Primern Msb2-ATG-*XhoI* und Msb2-Stopp-*XhoI-NotI* amplifiziert wurde. Das vervollständigte, modifizierte *MSB2* wurde mit *XhoI* geschnitten und stromabwärts des Aktin-Promotors in Plasmid pDS1044-1 integriert. Das entstandene Expressionsplasmid wurde pES10 genannt. Seine Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

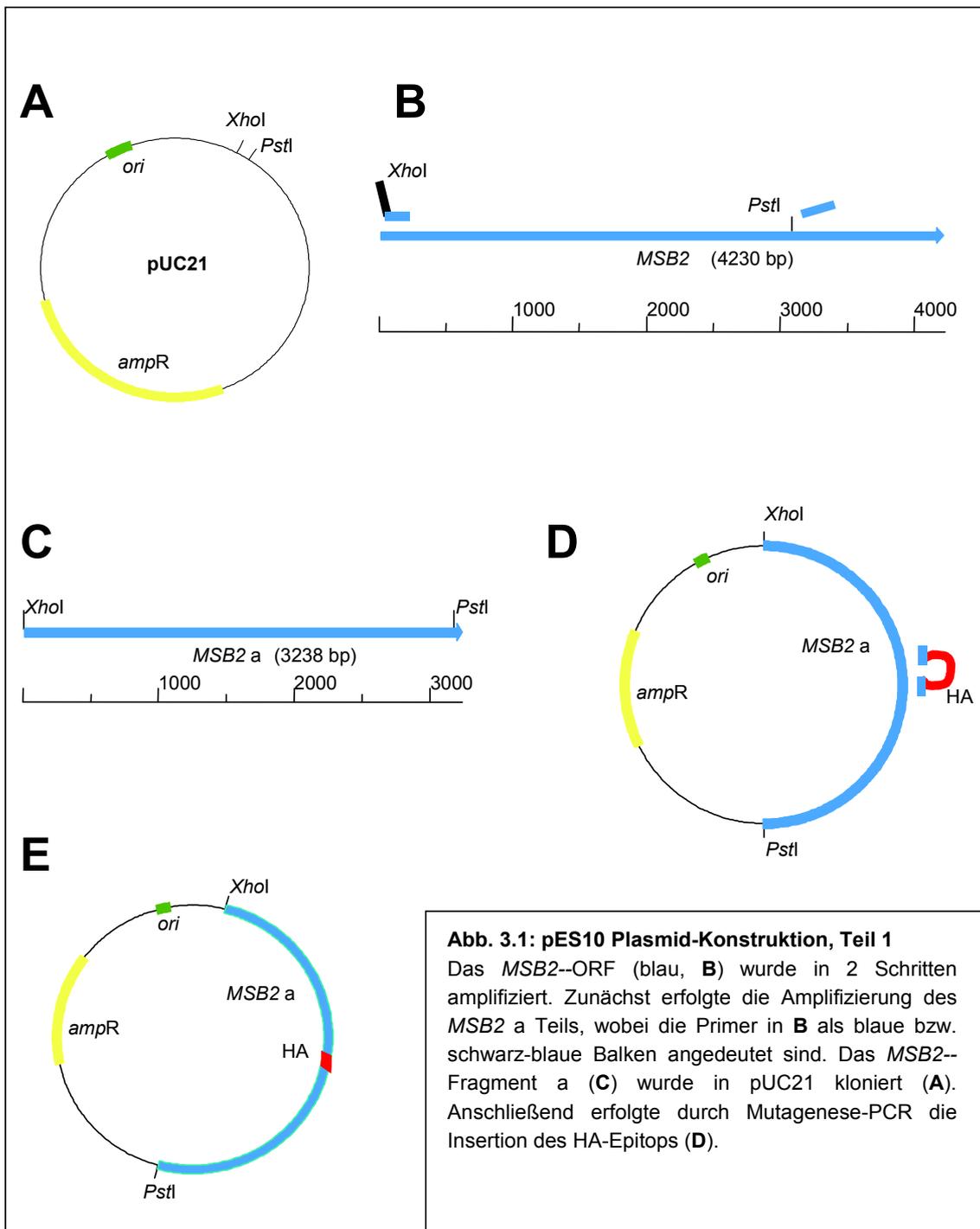
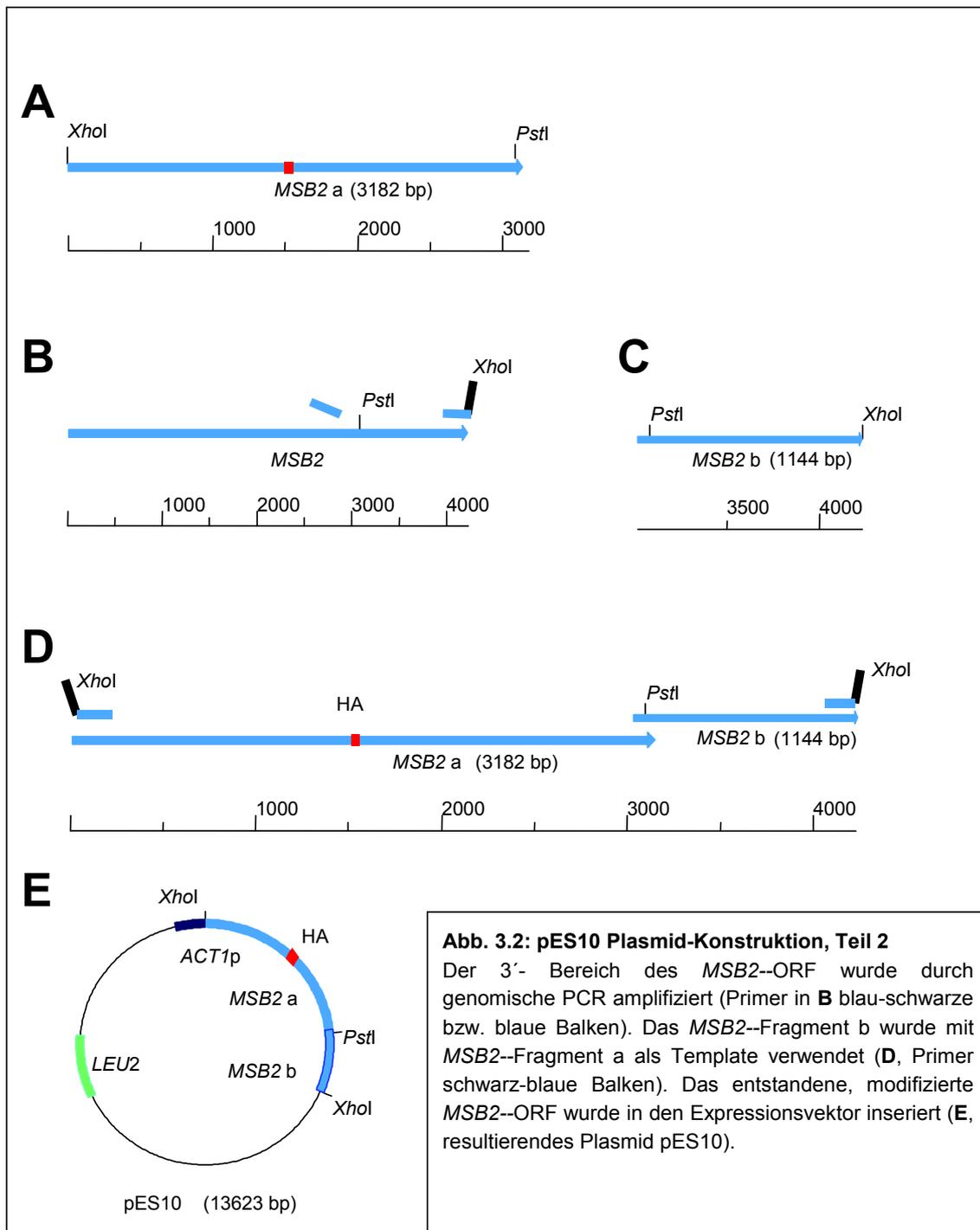


Abb. 3.1: pES10 Plasmid-Konstruktion, Teil 1

Das MSB2-ORF (blau, **B**) wurde in 2 Schritten amplifiziert. Zunächst erfolgte die Amplifizierung des MSB2 a Teils, wobei die Primer in **B** als blaue bzw. schwarz-blaue Balken angedeutet sind. Das MSB2-Fragment a (**C**) wurde in pUC21 kloniert (**A**). Anschließend erfolgte durch Mutagenese-PCR die Insertion des HA-Epitops (**D**).



3.1.2 Markierung der cytoplasmatischen Domäne

Der C-Terminus des Msb2-Proteins in *S. cerevisiae* verbleibt innerhalb der Zelle, während der extrazelluläre N-Terminus nach außen sekretiert wird (Vadaie *et al.*, 2008). Dieses Verhalten von Msb2 sollte ebenfalls bei *C. albicans* untersucht werden und daher wurde der C-Terminus von Msb2 mit dem V5-Epitop markiert.

Die Proteinstruktur des C-Terminus von Msb2 wurde mit dem SCRATCH-Computerprogramm (www.ics.uci.edu/~baldig/, Cheng *et al.*, 2005) ermittelt (Abb. 3.3). Mit Hilfe der Proteinstruktur-Vorhersage konnte ermittelt werden, wo das Antigen-Epitop eingesetzt werden könnte, ohne die Tertiärstruktur und Funktion des rekombinanten Proteins zu beeinflussen. Die Region zwischen den Aminosäuren Glutamat (E1330) und Leucin (L1331) ist für die Epitop-Integration geeignet, da die Proteinstruktur in dieser Region einfach aufgebaut ist. Zusätzlich wurde das Epitop auch an das C-terminale Ende fusioniert.

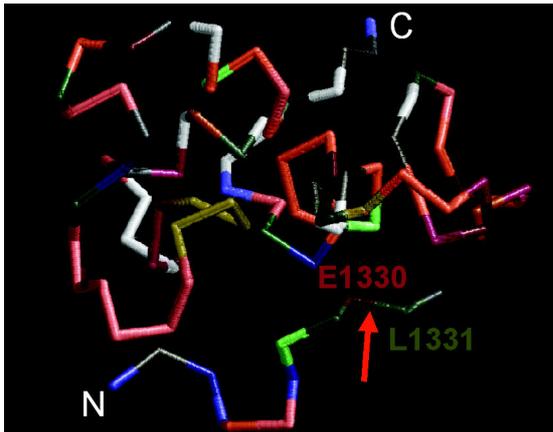


Abb. 3.3: Tertiärstruktur des Msb2 C-Terminus

Vorhergesagte Tertiärstruktur des C-Terminus von Msb2-Proteins (Transmembrandomäne mit dem N angedeutet bis zum Stoppcodon mit dem C angedeutet). Der rote Pfeil zeigt die Stelle zwischen den Aminosäuren E1330 und L1331, in die das V5-Epitop eingesetzt wurde.

Zur Konstruktion eines *MSB2*-ORF mit Sequenzen für das V5-Epitop im Zentrum des C-terminalen Bereiches wurde die Overlap-PCR Methode verwendet. Zunächst wurde das 1037 bp-große PCR Fragment 1 aus pES10 mit den Primern PCR1 Hin und PCR1 Mitte Her amplifiziert, wobei eines dieser Primer die V5-kodierende Sequenzen trug (Abb. 3.4 B). Das zweite Fragment (712 bp) wurde durch PCR mit Primern PCR2 Mitte Hin und PCR2 Her erhalten. Beiden Fragmente überlappen mit 54 bp innerhalb des V5-Epitops. Die dritte PCR wurde mit den Primern PCR1 Hin und PCR2 Her durchgeführt, wobei die Fragmente 1 und 2 als Template dienten (Abb. 3.4 C). Als Resultat lag ein Fragment mit dem 3'-Bereich des ORF vor, welches die Länge von 1695 bp besaß und das V5-Epitop enthielt. Dieses Fragment 3 wurde mit *NheI* und *Apal* geschnitten und in Plasmid pES10 ligiert, wodurch das unmarkierte C-terminale Ende des *MSB2*-ORF in pES10 gegen das V5-tragende Fragment ausgetauscht wurde. Nach Sequenzierungsverifizierung des Plasmids wurde es pES11a genannt.

Das Plasmid, in dem der *MSB2*-ORF Sequenzen für das V5-Epitop terminal am 3'-Ende trägt, wurde in ähnlicher Weise mit den Primern PCR1 Hin, PCR1 Ende Her, PCR2 Ende Hin und PCR2 Her hergestellt und es wurde pES11c genannt (Daten nicht dargestellt).

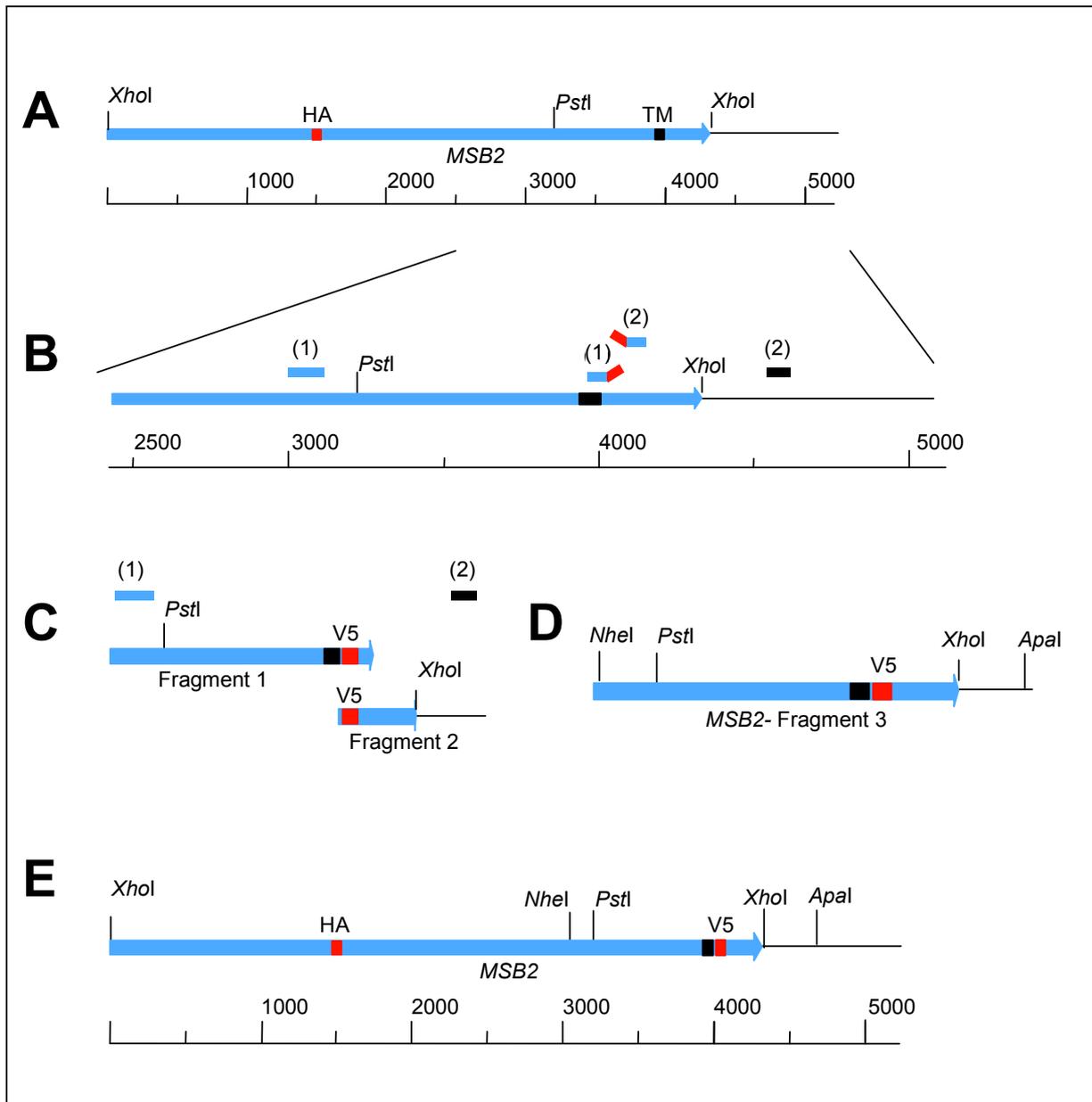


Abb. 3.4: pES11a Plasmid-Konstruktion

Der vollständige $MSB2^{HA}$ -ORF aus Plasmid pES10 ist in **A** dargestellt. **B** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Gens, wobei der 5'-Bereich des ORF nicht dargestellt ist. Für die Insertion des V5-Epitops wurden 2 PCR verwendet, wobei mit (1) die für die Amplifizierung des Fragments 1 und mit (2) die für die des Fragments 2 benötigten Primer bezeichnet sind. Die Fragmente 1 und 2 überlappen und dienen als Template für die dritte PCR (**C**). Das PCR Fragment 3 in **D** enthält HA- und V5-Epitope (rot, **E**). Das $MSB2^{HA-V5}$ tragende Expressionsplasmid wurde pES11a genannt.

TM: Transmembrandomäne

3.2 Funktionalitätsanalysen des markierten Msb2

Nachdem die Plasmide pES10 ($MSB2^{HA}$), pES11a ($MSB2^{HA-V5\ mid}$) und pES11c ($MSB2^{HA-V5\ end}$) konstruiert worden waren, sollte die Funktionalität der Epitop-markierten $Msb2^{HA}$ - und $Msb2^{HA-V5}$ -Varianten bestätigt werden. Dafür wurden die Plasmide zunächst mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* behandelt, so dass sie innerhalb ihres *LEU2* Selektionsmarkers linearisiert wurden. Anschließend wurden die Plasmide durch Transformation (2.5.1.4) in den *LEU2* Locus des Genoms der *msb2*-Mutante FCCa28 integriert. Die Mutanten FCCa28, die das Plasmid pES10 (innerhalb des *LEU2* Locus) enthielt, wurden ESCa8.1, ESCa8.2 und ESCa8.3 genannt. Transformanten mit Plasmid pES11a und Plasmid pES11c wurden mit ESCa3.1, ESCa3.2, ESCa3.3 bzw. ESCa5.1, ESCa5.2, ESCa5.3 bezeichnet.

Da die Expression des $MSB2^{HA}$ bzw. $MSB2^{HA-V5}$ ORF in den oben erwähnten Stämmen unter der Kontrolle des *ACT1*-Promotors steht, welcher konstitutiv angeschaltet ist, könnten die Komplementationsanalysen und Sensitivitätstests wegen der möglichen Überexpression des Epitop-markierten *Msb2* zu irrtümlichen Ergebnissen führen. Um die Wahrscheinlichkeit der möglichen Überexpression auszuschließen, sollten $MSB2^{HA}$ und $MSB2^{HA-V5}$ ebenfalls durch den nativen Promotor transkribiert werden. Da bei der Disruption des *MSB2*-Gens und somit bei der Konstruktion der *msb2*-Mutante FCCa28 (Cottier, 2007) noch eine große Region des *MSB2*-ORF zurückgeblieben war (395 Aminosäuren von der 407 bis zu der 800 Aminosäure fehlen; Abb. 3.5), konnten die Plasmide pES10, pES11a und pES11c mittels homologer Rekombination ebenfalls stromabwärts des nativen *MSB2*-Promotors in die *msb2*-Mutante FCCa28 integriert werden. Dafür wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym *HpaI* 295 bp stromabwärts des Startcodons linearisiert (Abb. 3.5) und durch Transformation in den nativen *MSB2*-Promotor gesetzt.

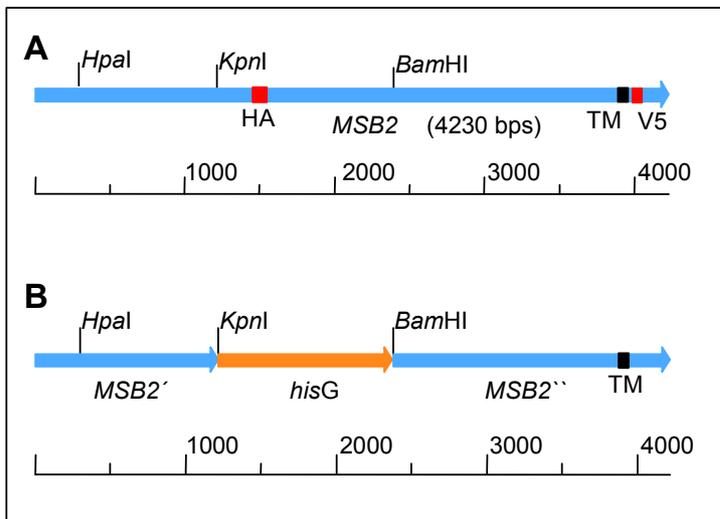


Abb. 3.5: Skizze des *MSB2*-Lokus in der Mutante FCCa28 und FCCa27.

A Dargestellt ist der *MSB2*-ORF mit den beiden Epitopen HA und V5 (rot). **B** Anstelle des kompletten *MSB2*-Gens ist die *hisG*-Sequenz (orange) in der FCCa28 bzw. FCCa27 Mutante vorhanden.

Die Restriktionsschnittstelle *HpaI* ist sowohl in der *msb2*-Mutante als auch in dem markiertem $MSB2^{HA-V5}$ Gen dargestellt.

TM: Transmembrandomäne

Die Stämme mit dem im *MSB2*-Promotor integrierten Plasmid pES10 ($MSB2^{HA}$) wurden ESCa9.1, ESCa9.2 und ESCa9.3, die mit Plasmid pES11a ($MSB2^{HA-V5\ mid}$) als ESCa10.1, ESCa10.2, ESCa10.3 und die mit Plasmid pES11c ($MSB2^{HA-V5\ end}$) als ESCa11.1, ESCa11.2 und ESCa11.3 bezeichnet.

Anschließend wurde die Funktionalität des markierten Msb2 in allen Transformanten durch Sensitivitätstests (2.3.3) und Komplementationsanalysen überprüft. Zur Vereinfachung wurde stellvertretend nur eine Transformante eines Stammes (einer von drei biologischen Replikaten) in allen Abbildungen (Sensitivitäts-, Hypheninduktions- und Western-Blot Analysen) dieser Arbeit gezeigt. Alle drei Transformanten eines Stammes wiesen das gleiche Ergebnis auf.

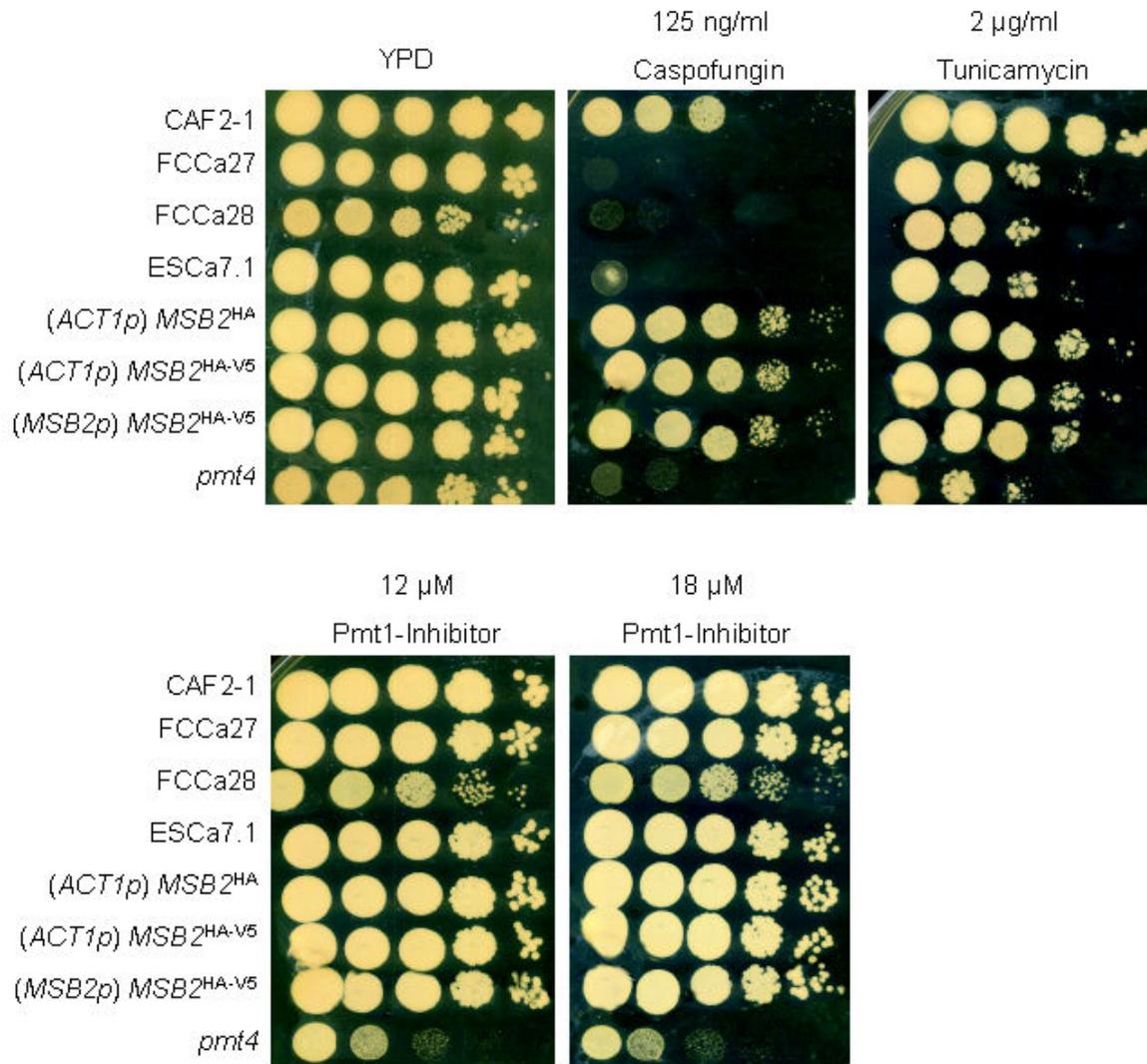


Abb. 3.6: Sensitivitätstest

YPD-Übernachtskulturen wurden auf eine $OD_{600} = 1$ eingestellt und Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} angefertigt. Anschließend wurde von jeder Verdünnung 5 µl auf YPD Platten mit den angegebenen Substanzen getropft und das Wachstum nach 3 Tagen bei 30°C Inkubation überprüft. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur jeweils das Ergebnis von einem Transformanten abgebildet ist. Verwendete Stämme: CAF2-1, (Wildtyp), FCCa27 (*msb2 URA3*), FCCa28 (*msb2 ura3*), ESCa7.1 (mit integriertem Leer-Plasmid pDS1044-1), ESCa8.1 (*ACT1p-MSB2^{HA}*), ESCa3.1 (*ACT1p-MSB2^{HA-V5 mid}*), ESCa10.1 (*MSB2p-MSB2^{HA-V5 mid}*), CAP4-2164 (*pmt4*).

ACT1p: *MSB2* wird durch den Aktin1-Promotor transkribiert; Plasmid ist in den *LEU2* Locus integriert. *MSB2p*: *MSB2* wird durch den *MSB2*-Promotor transkribiert; Plasmid ist in den *MSB2*-Locus integriert.

Verdünnungsreihe (von links nach rechts): unverdünnt, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

Hierfür wurden die Stämme auf Ihre Sensitivität gegenüber zellwanddestabilisierenden Substanzen Caspofungin und Tunicamycin, sowie gegenüber dem Pmt1-Inhibitor (Orchard *et al.*, 2004) untersucht (Abb. 3.6). Neben dem Wildtypstamm CAF2-1 und den $Msb2^{HA}$ - bzw. $Msb2^{HA-V5}$ - synthetisierenden Stämmen wurden weitere *msb2*-Mutanten (FCCa27 und FCCa28), so wie Stamm ESCa7.1, der das Leer-Plasmid pDS1044-1 im *LEU2* Locus der *msb2*-Mutante FCCa28 trägt, getestet. Zusätzlich wurden die Hyphenbildung aller Stämme auf YPM Platten untersucht (Abb. 3.7).

Wie man der Abbildung 3.6 entnehmen kann, wachsen *msb2*-Mutanten in Anwesenheit von Tunicamycin im Vergleich zum Wildtyp (CAF2-1) schlechter und sind in Gegenwart von Caspofungin nicht mehr lebensfähig. Die Anwesenheit des PMT1-Inhibitors in der verwendeten Konzentration hat keine nennenswerte Wirkung auf die Stämme. Die rekombinanten Stämme, die $Msb2^{HA}$ bzw. $Msb2^{HA-V5}$ synthetisieren (unabhängig davon, ob *MSB2*-Allele von nativen oder konstitutiven *ACT1* Promotor transkribiert werden), wachsen in Anwesenheit von diesen Agenzien wie der Wildtypstamm. Die Position des V5-Epitops in den synthetisierten $Msb2^{HA-V5}$ Varianten, terminal in ESCa5.1 (Daten nicht gezeigt) oder zentral in ESCa3.1, hat weder bei der Sensitivität, noch bei der Hyphenbildung (Abb. 3.7) eine Auswirkung auf die Funktion von *Msb2*. Außerdem machte es für die *Msb2* Funktion keinen Unterschied, ob der native *MSB2*-Promotor (Stämme ESCa9.1 (*MSB2p-MSB2^{HA}*) und ESCa11.1 (*MSB2p-MSB2^{HA-V5} end.*; Daten nicht gezeigt) oder der konstitutiv-aktive Aktin1-Promotor für die Expression des Epitop-markierten *MSB2* verantwortlich war.

Die Hyphenbildung auf YPM Platten bei 37 °C (Abb. 3.7) verdeutlichte ebenfalls, dass die Komplementation der *msb2*-Mutante erfolgreich war. Die *msb2*-Mutanten (FCCa28, FCCa27 und ESCa7.1) können keine Hyphen unter diesen Bedingungen ausbilden, während alle *MSB2*-Transformanten wie der Wildtyp CAF2-1 Hyphen auf YPM Platten hervorbrachten. Wiederum hatten die verschiedenen Promotoren und auch die Lage des V5-Epitops (zentral oder terminal im C-Terminus) bei der Hyphenbildung keine unterschiedlichen Auswirkungen auf den Phänotyp.

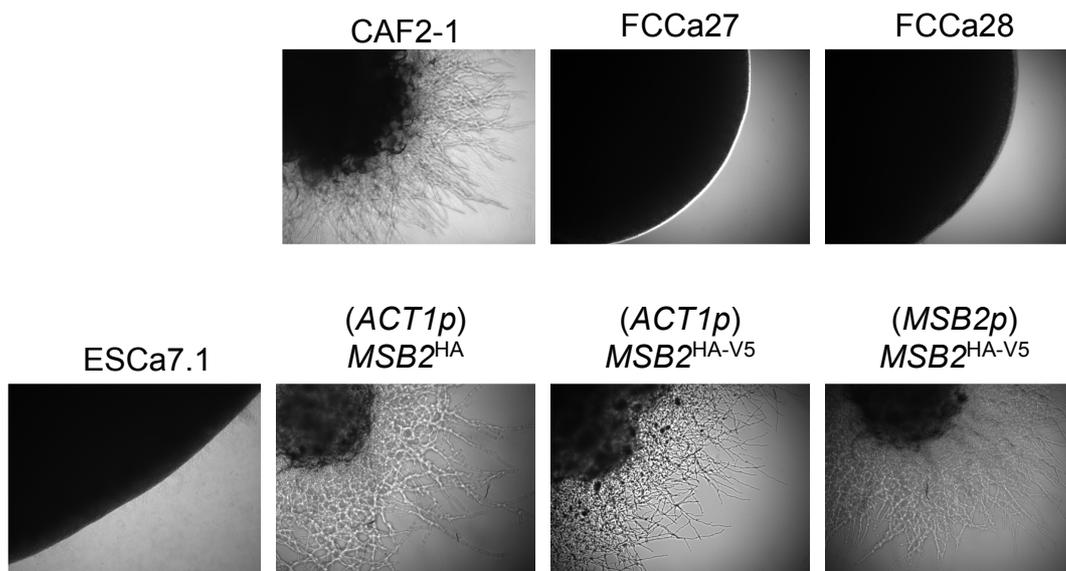


Abb. 3.7: Hypheninduktionstest

C. albicans Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung getestet. Verdünnungsausstriche wurden auf YPM-Agar 2 Tage bei 37 °C inkubiert und die Hyphenbildung von Einzelkolonien fotografiert. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Stammbezeichnungen wie in Abb. 3.6.

3.3 Sekretion des Msb2

Da bei *S. cerevisiae* die extrazelluläre Domäne von Msb2 abgespalten wird (Vadaie *et al.*, 2008), sollte die grundlegende Frage beantwortet werden, ob in *C. albicans* wie in *S. cerevisiae* Msb2 ebenfalls sekretiert werden kann.

3.3.1 Sekretion des Msb2 in Flüssigmedium

Zunächst wurde die Sekretion des Msb2-Proteins nach außen ins Medium überprüft. Um diese Fragestellung zu beantworten wurden die HA- und V5-markierten Msb2-Varianten als Werkzeuge verwendet.

3.3.1.1 Sekretion der extrazellulären Domäne

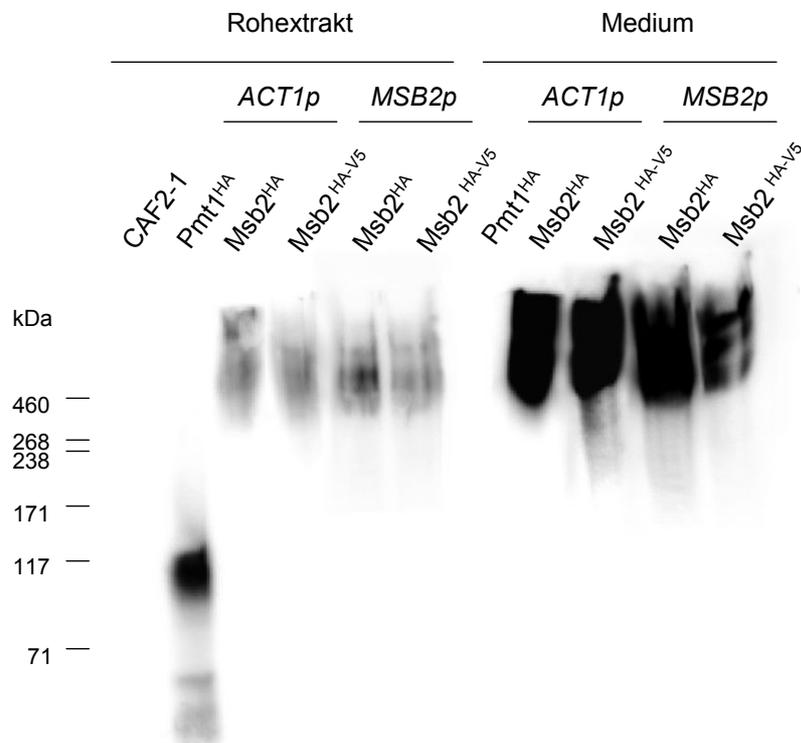


Abb. 3.8: Western-Blot Analyse zum Nachweis der extrazellulären Domäne des Msb2

Die Stämme wurden in YPD bis zu einer $OD_{600} \approx 6,2$ wachsen gelassen. Es wurden jeweils 50 μg Protein der Rohextrakte (Abschnitt 2.6.1) und 20 μl des Mediums, gewonnen durch Zentrifugation (5 min, 13000 Upm), der jeweiligen Stämme auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Abschnitt 2.6.4.3). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:2000-verdünntem Anti-HA Primär-Antikörper aus der Ratte, und dem 1:10000-verdünnten Anti-Ratte Sekundär-Antikörper (Abschnitt 2.6.4.2), der an die Peroxidase gekoppelt ist (Abschnitt 2.6.4.6). CAF2-1 ist der unmarkierte Wildtyp als Negativkontrolle und CIS23 (Pmt1^{HA}) fungierte als Positivkontrolle. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Stammbezeichnung: ESCa8.1 ($\text{ACT1p-MSB2}^{\text{HA}}$), ESCa3.1 ($\text{ACT1p-MSB2}^{\text{HA-V5}}$), ESCa9.1 ($\text{MSB2p-MSB2}^{\text{HA}}$) und ESCa10.1 ($\text{MSB2p-MSB2}^{\text{HA-V5}}$).

Um zu überprüfen, ob Msb2 bei Wachstum in Flüssigmedium in die extrazelluläre Domäne gespalten werden kann, sollte diese Domäne mit Hilfe des HA-Epitops in einem Western-Blot nachgewiesen werden. Dafür wurden die Übernacht-Kulturen der Stämme CAF2-1, CIS23

(*PMT1^{HA}*), ESCa8.1 (*ACT1p-MSB2^{HA}*), ESCa3.1 (*ACT1p-MSB2^{HA-V5}*), ESCa9.1 (*MSB2p-MSB2^{HA}*) und ESCa10.1 (*MSB2p-MSB2^{HA-V5}*) in YPD inokuliert und erneut über Nacht wachsen gelassen. Dann wurde die OD₆₀₀ der Proben ermittelt und auf die gleiche OD₆₀₀ (ca. 6,2) eingestellt, damit die gleiche Ausgangssituation für die Medien gewährleistet war. Anschließend wurden einerseits Rohextrakte aller Stämme hergestellt und andererseits das Wachstumsmedium durch Zentrifugation von den restlichen *C. albicans* Zellen separiert. Die Proteinkonzentration der Mediumproben konnte aber weder mit der Lowry-Methode (2.6.3.2) noch mit dem Bradford-Reagenz (2.6.3.1) ermittelt werden, da Msb2 und andere sekretierte Proteine stark glykosyliert sind und deswegen genaue Konzentrationsbestimmungen nicht möglich sind. Rohextrakt (50 µg) und Medium (20 µl) wurden durch Western-Blot mit Anti-HA Antikörpern untersucht. Als Positivkontrolle wurde der Rohextrakt von CIS23 (*Pmt1^{HA}*) verwendet (Schmidt, 2007), von dem nur 5 µg aufgetragen wurde.

Wie man dem Ergebnis des Western-Blots entnehmen kann, entstand kein Signal im wildtypischen Rohextrakt (CAF2-1), wohingegen *Pmt1^{HA}* aus dem Stamm CIS23 bei ca. 100 kDa detektierbar war (Abb. 3.8). Außerdem ist zu erkennen, dass das Msb2-Protein im Rohextrakt sowohl mit dem einzelnen HA-Epitop, als auch mit dem doppelten HA-V5-Epitop, sowohl unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors als auch des nativen Promotors, auf dem Western-Blot ermittelbar war. Die Msb2-Bande erschien schmierig und verlief bei einer molekularen Masse größer als 460 kDa. Gleichzeitig waren im Rohextrakt der verschiedenen Stämme keine reproduzierbaren Unterschiede bezüglich der Msb2-Signalstärke zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Msb2-Synthese durch den *ACT1*-Promotor nicht signifikant verstärkt wurde. Msb2 war in jedem der vier verwendeten Stämme auch im Medium nachweisbar, so dass offensichtlich Msb2 von *C. albicans* wie bei *S. cerevisiae* nach Außen ins Medium sekretiert wird. Da die Signalstärke des Msb2 in dem Medium sehr hoch ist (nur 20 µl des nicht-konzentrierten Mediums wurde verwendet), lässt vermuten, dass eine große Menge an Msb2 aus der Zelle nach Außen geschleust wird.

Im Verlauf der Arbeit wurde der Rohextrakt und das Medium sowohl in der exponentiellen Wachstumsphase als auch der stationären Phase (bei ca. OD₆₀₀ = 6,0) untersucht. Es wurden jeweils 3 Transformanten des jeweiligen Stammes für den Western-Blot getestet, wobei nur eine Transformante stellvertretend für die anderen in den Abbildungen gezeigt wird. Das Ergebnis des Mediums der stationären Phase ist jeweils dargestellt, wenn es nicht ausdrücklich anders erwähnt wird. Bei unterschiedlichen Western-Blot-Ergebnissen der biologischen Replikate sind alle Ergebnisse gezeigt.

3.3.1.2 Intrazelluläre Lokalisation der cytoplasmatischen Domäne

Vadaie *et al.* (2008) konnten nachweisen, dass die cytoplasmatische Domäne des Msb2-Proteins von *S. cerevisiae* innerhalb der Zelle bleibt. Dieses sollte auch für *C. albicans* näher untersucht werden. Für diese Western-Blot-Experimente wurde derselbe Rohextrakt und das gleiche Medium wie in Abbildung 3.8 verwendet, wobei aber ein 4-20 % SDS-Gradienten-Gel zur Auftrennung der Proteine und als Primärantikörper ein Anti-V5 Antikörper (Serotec mit der Verdünnung 1:2000) und als Sekundärantikörper Anti-Maus-Antikörper (Thermo Scientific mit der Verdünnung 1:10000) eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle wurde der Stamm CIS29 verwendet, der das *Pmt2*-Protein mit einem C-terminalen V5-Epitop produziert (Schmidt, 2007). Eine *Pmt2^{V5}*-Bande konnte wie erwartet bei ca. 100 kDa detektiert werden. Außerdem war bei ca. 15 und 18 kDa jeweils eine Bande im Rohextrakt der Stämme

ESCa3.1 (*ACT1p-MSB2^{HA-V5}*) und ESCa10.1 (*MSB2p-MSB2^{HA-V5}*) nachzuweisen. Weder bei der Negativkontrolle CAF2-1 noch bei den Stämmen ESCa8.1 (*ACT1p-MSB2^{HA}*) und ESCa9.1 (*MSB2p-MSB2^{HA}*), die kein V5-Epitop enthalten, waren diese Banden in dieser Laufröhre zu erkennen. Alle Rohextrakte enthielten zusätzlich eine ca. 37 kDa-große Bande, die offensichtlich eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem unbekanntem *C. albicans* Protein darstellt (Abb. 3.9 *).

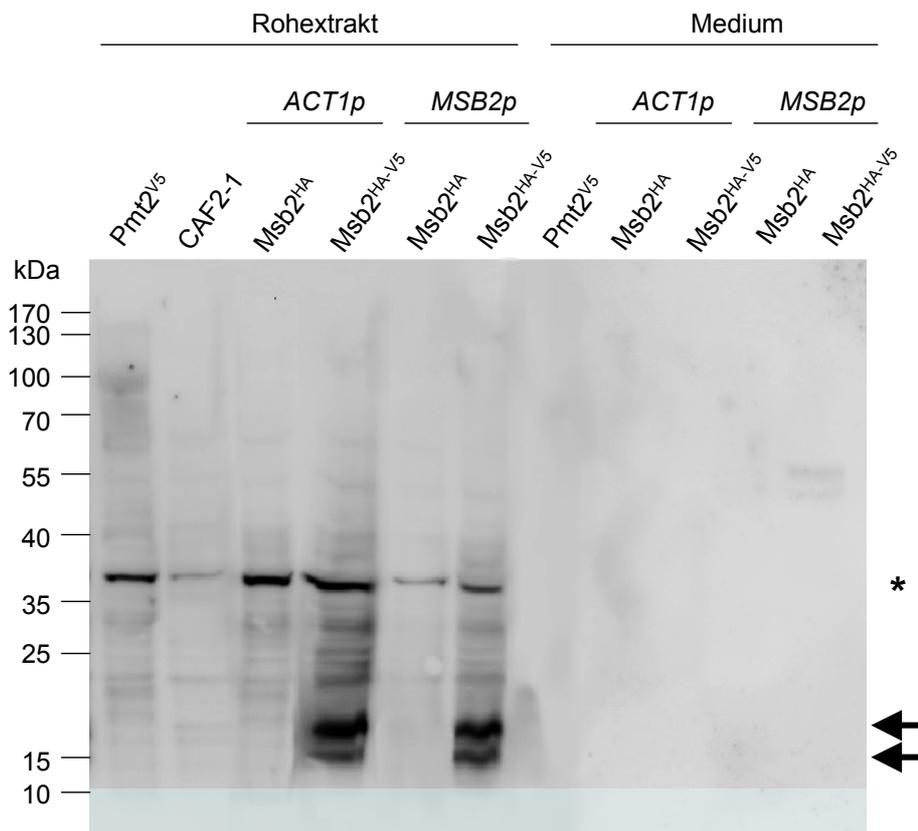


Abb. 3.9: Western-Blot Analyse zum Nachweis der cytoplasmatischen Domäne des Msb2

Die Stämme wurden in YPD bis zu einer $OD_{600} \approx 6,2$ wachsen gelassen. Es wurden jeweils 50 μ g Protein der Rohextrakte (Abschnitt 2.6.1) und 20 μ l des Mediums, gewonnen durch Zentrifugation (5 min, 13000 Upm), der jeweiligen Stämme auf einem 4-20 %igen SDS-Gradienten-Gel aufgetrennt (Abschnitt 2.6.4.3). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:2000 verdünnten Anti-V5 Antikörpern aus der Maus, und dem 1:10000 verdünnten, sekundären Anti-Maus Antikörper (Abschnitt 2.6.4.2), der an die Peroxidase gekoppelt ist (Abschnitt 2.6.4.6).

CAF2-1 ist der unmarkierte Wildtyp als Negativkontrolle und CIS29 (*Pmt2^{V5}*) fungierte als Positivkontrolle. Stammbezeichnungen wie in Abb. 3.8. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. * zeigt eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem unbekanntem *C. albicans* Protein in allen Proben des Rohextraktes auf. Die Pfeile zeigen die möglichen Positionen des cytoplasmatischen Msb2^{V5}.

In keinem der Kulturmedien war das ca. 18 kDa-große Msb2 V5-Fragment nachzuweisen. Dieses Ergebnis entspricht den mit *S. cerevisiae* erhaltenen Ergebnissen (Vadaie *et al.*, 2008). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* wird ein kleines C-terminales Msb2-Fragment in der Zelle zurückgehalten und ein sehr großes, vermutlich stark glykosyliertes N-terminales Fragment in großen Mengen nach Außen sekretiert. Es stellte sich aber die Frage, ob das Msb2 auch als vollständiges Protein im Rohextrakt oder im Medium

aufzufinden ist, d. h. ohne Abspaltung der C-terminalen Region. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Versuch von Abbildung 3.9 wiederholt, jedoch wurde nach dem V5-Epitop-markierten Msb2 auch in dem > 460 kDa Bereich gesucht. Abbildung 3.10 zeigt die Western-Blot Analyse, bei der in der Spur die Positivkontrolle CIS29 deutlich eine ca. 100 kDa große Pmt2^{V5} Bande ergibt. In allen übrigen Proben konnte keine klare Bande weder im Rohextrakt noch im Medium nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der C-terminale Bereich von Msb2 effektiv in Zellen abgespalten wird.

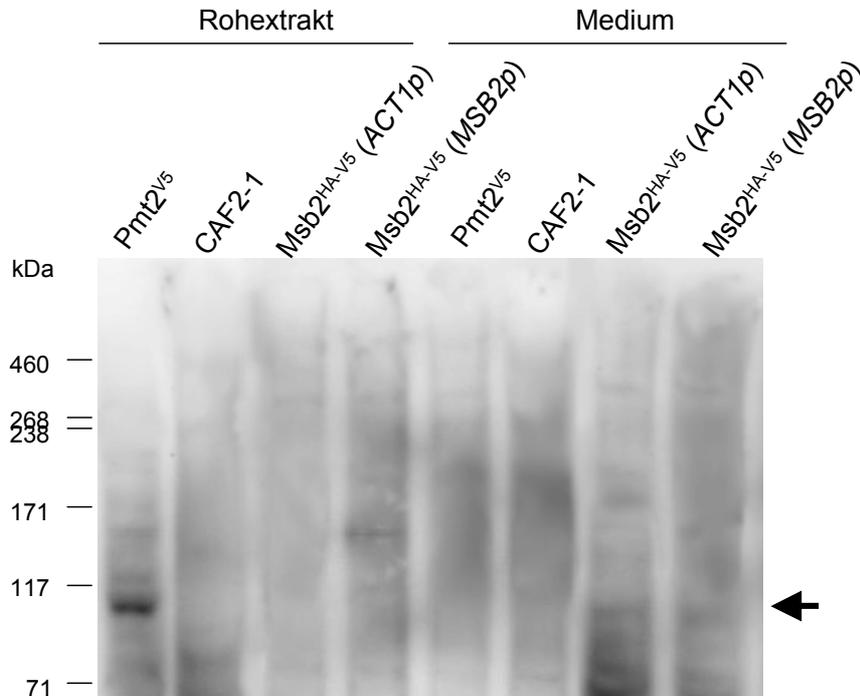


Abb. 3.10: Western-Blot Analyse des Msb2-Proteins mit Anti-V5 Antikörpern

Der Versuchsablauf war wie bei Abbildung 3.9, mit dem Unterschied, dass ein 8 %iges SDS-Gel verwendet wurde. Aufgetragen wurden das Wachstumsmedium und der Rohextrakt der Stämme CAF2-1 (Negativkontrolle), CIS29 (Pmt2^{V5} , Positivkontrolle), ESCa3.1 ($\text{ACT1p-MSB2}^{\text{HA-V5}}$) und ESCa10.1 ($\text{MSB2p-MSB2}^{\text{HA-V5}}$). Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Der Pfeil zeigt die Position des Pmt2^{V5} .

3.3.2 Sekretion des Msb2 auf Festmedium

Es konnte nachgewiesen werden, dass Msb2 gespalten wird und ein großes N-terminales Fragment in Flüssigmedium sekretiert wird (Abb. 3.8). Zusätzlich sollte die Frage beantwortet werden, ob das Msb2-Fragment ebenfalls auf Festmedien nach Außen sekretiert wird. 5 μl der Zellkulturen CAF2-1 (Wildtyp), CIS23, ESCa3.1 und ESCa10.1 wurde auf ein Membranfilter (Millipore, Type HA 0,45 μm) mit der Porengröße von 0,45 μm aufgetropft und dieser Filter wurde auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran auf einer YPD Platte gelegt (Abb.3.11 A). Sobald die Zellkultur-Tropfen in den Filter eingesogen waren, wurde die YPD Platte über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Abbildung 3.11 A zeigt, dass Kolonien auf dem Filter entstanden. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit dem Anti-HA-Antikörper auf HA-positive Signale untersucht. Bei den Stämmen ESCa3.1 (3) und ESCa10.1 (4) war ein positives Signal festzustellen, während weder bei CAF2-1 (1), ohne HA-Epitop-Markierung, noch bei CIS23 (Pmt1^{HA}) (2) ein Signal

entstand. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Msb2 auch bei Wachstum auf Festmedien nach Außen sekretiert wird. Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis durch den Transit ganzer Zellen durch Membranporen auf die PVDF-Membran entstand, wurde der Membranfilter einige Minuten auf eine frische YPD-Platte gelegt und dann entfernt. Nach Inkubation der Platte bei 30 °C für 48 Stunden wurde kein Wachstum beobachtet.

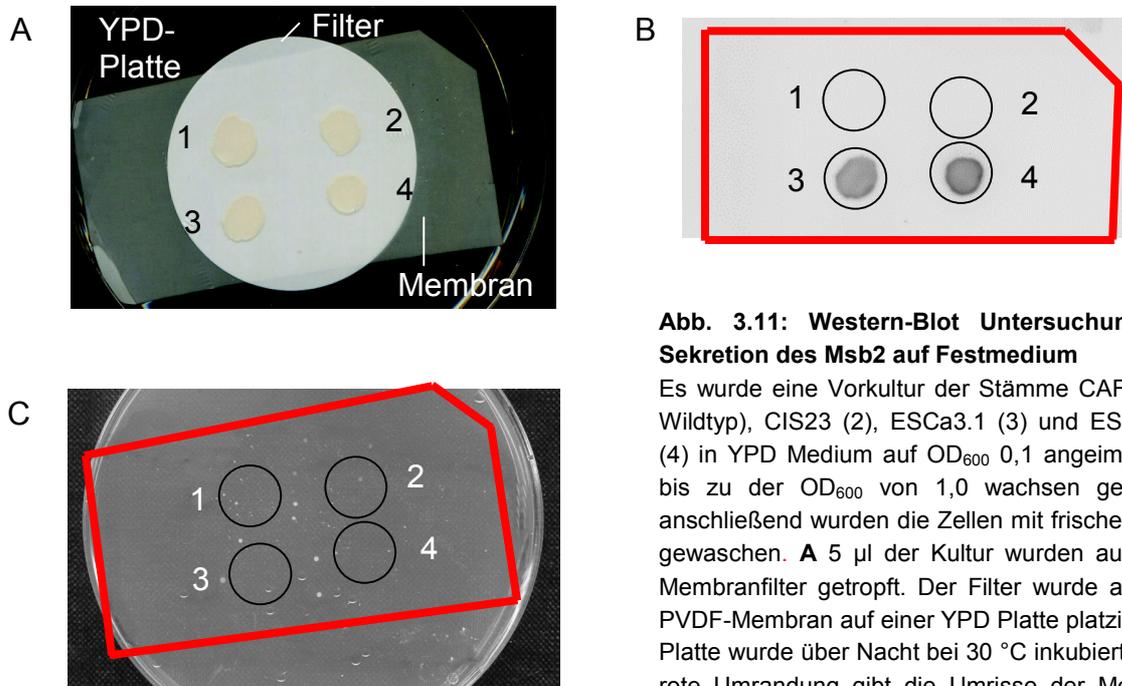


Abb. 3.11: Western-Blot Untersuchung auf Sekretion des Msb2 auf Festmedium

Es wurde eine Vorkultur der Stämme CAF2-1 (1; Wildtyp), CIS23 (2), ESCa3.1 (3) und ESCa10.1 (4) in YPD Medium auf OD_{600} 0,1 angeimpft und bis zu der OD_{600} von 1,0 wachsen gelassen, anschließend wurden die Zellen mit frischem YPD gewaschen. **A** 5 μ l der Kultur wurden auf einen Membranfilter getropft. Der Filter wurde auf eine PVDF-Membran auf einer YPD Platte platziert. Die Platte wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert. **B** Die rote Umrandung gibt die Umrisse der Membran

wieder. Die Kreise zeigen, wo die Stämme aufgetropft wurden. Die PVDF-Membran wurde mit einem Anti-HA Antikörper wie in dem Immunoblot der Abbildung 3. 8 sondiert. **C** Nach kurzzeitiger Platzierung des bewachsenen Membranfilters auf eine YPD Platte wurde diese 48 h bei 30 °C inkubiert. Es entstanden keine Kolonien.

3.3.3 Sekretion des Msb2 bei Hypheninduktion

C. albicans kann in Hefe- und Hyphenform wachsen. In den bisherigen Versuchen waren Bedingungen verwendet worden, unter denen *C. albicans* als Hefe wächst. Daher wurde die Sekretion des Msb2 nach Hypheninduktion (2.3.5) untersucht. Zunächst wurde eine Übernacht-Kultur der Stämme CAF2-1, ESCa8.1 ($ACT1p$ - $MSB2^{HA}$), ESCa3.1 ($ACT1p$ - $MSB2^{HA-V5}$), ESCa9.1 ($MSB2p$ - $MSB2^{HA}$) und ESCa10.1 ($MSB2p$ - $MSB2^{HA-V5}$), welche in YPM bei 37 °C angezogen wurde, erneut in YPM zu einer $OD_{600} = 0,05$ inokuliert und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C wachsen gelassen. Zur Prüfung, ob die Zellen Hyphen ausgebildet hatten, wurden die Zellen nach Anfärben mit Calcofluor White unter einem Mikroskop begutachtet (Daten nicht gezeigt); unter diesen Bedingungen wuchsen ca. 60 % der Zellen in Hyphenform. Wie in Abbildung 3.8 beschrieben, wurden von diesen Zellen Rohextrakte hergestellt und das Wachstumsmedium aufgefangen. Die Immunoblotanalyse erfolgte wie unter Abbildung 3.8 beschrieben, wobei diesmal 40 μ l des Mediums eingesetzt wurde. Wie unter den obigen Standardbedingungen (YPD, 30 °C) konnte das extrazelluläre Msb2-Protein auch bei Hypheninduktion im Western-Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit können sowohl Hefe- als auch Hyphenzellen Msb2 nach Außen ins Wachstumsmedium sekretieren.

3.4 Aufreinigung des Epitop-markierten Msb2-Proteins

Die obigen Versuche zeigten, dass ein großes N-terminales Msb2-Fragment von > 460 kDa ins Medium sekretiert wird. Es sollte der Versuch gemacht werden, dieses Fragment durch Gelfiltration und / oder Affinitätschromatographie zu reinigen.

3.4.1 Reinigung von Msb2 mittels der Gelfiltration

Bei der Methode der Gelfiltrationschromatographie handelt es sich um eine Methode der Ausschlusschromatographie, bei der Moleküle nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Dabei fungiert die Säulenmatrix, das Gelfiltrationsmaterial, als „umgekehrtes“ Sieb, wobei große Moleküle nicht in die Gelmatrix eindringen und im Ausschlussvolumen eluieren. Die kleineren Moleküle hingegen dringen in die Poren ein und werden verzögert. Die verwendete Säulenmatrix in diesem Experiment war Superdex 200 10 /300 GL Säule (GE Healthcare), die aufgrund ihrer Materialeigenschaften Moleküle von 10 bis 600 kDa auftrennt. Das Bettvolumen der Säule betrug 24 ml. Die Proben und alle verwendeten Puffer wurden zunächst entgast und anschließend steril filtriert, um die Wahrscheinlichkeit des Verstopfens der Säule durch Luftblasen und Partikel zu minimieren. Anschließend wurde die Säule mit Hilfe eines ÄKTaprime plus Fraktionsammlers (GE Healthcare) angeschlossen, wobei die Fließgeschwindigkeit auf 0,4 ml/min eingestellt wurde und Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 200 µl auffing. Proteine wurden dabei durch Absorption bei 280 nm detektiert.

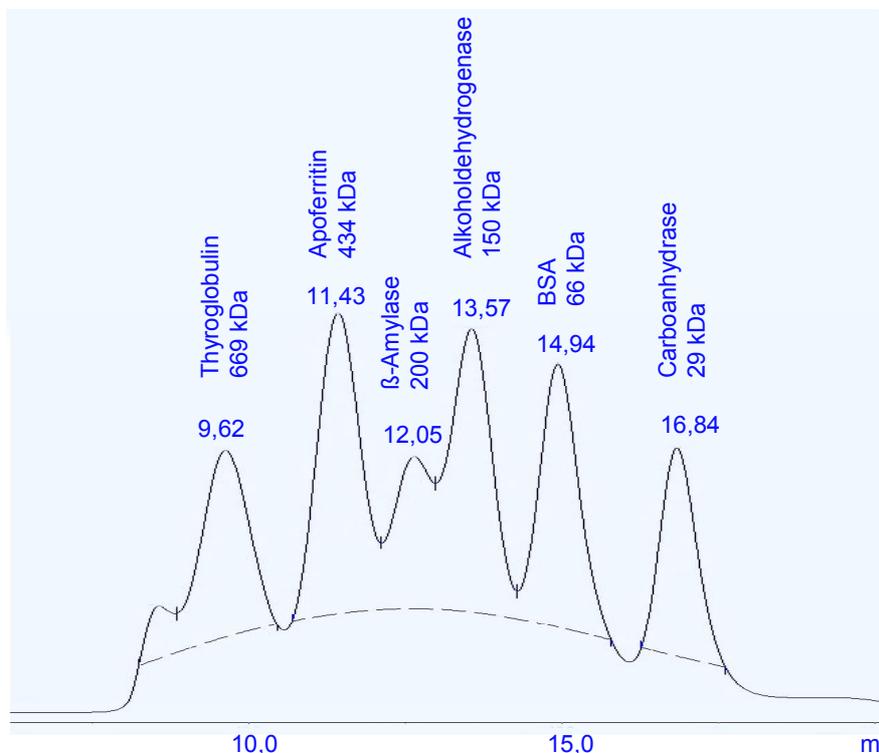


Abb. 3.12: Das Profil der Gelfiltrationschromatographie von Markerproteinen

Die Markerproteine wurden in bestimmter Konzentration im Laufpuffer gelöst und jeweils in einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Mit einer UV-Lampe bei 280 nm wurde detektiert.

Die Superdex-Säule wurde zunächst durch eine Kalibriergerade mit Proteinen bekannter Molekülmasse geeicht. Die Markerproteine, die in dem Größenbereich von 29 bis 669 kDa vorlagen (Sigma, Gel Filtration Molecular Weight Markers), waren Carboanhydrase (MW 29000), Rinderserum-Albumin (MW 66000), Alkoholdehydrogenase (MW 150000), β -Amylase (MW 200000), Apoferritin (MW 434000) und Thyroglobulin (MW 669000) und wurden in SD-Medium aufgenommen. Das Ausschlussvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran (MW 2000000) ermittelt und ergab das Ausschlussvolumen (void) von 8,17 ml. Das Elutionsprofil (Abb. 3.12) stellt dar, bei welchem Durchflussvolumen die Markerproteine detektierbar waren. Das Durchflussvolumen wurde ins Verhältnis zu ihrer molekularen Masse gesetzt und ergab eine Gerade, indem ein Quotient aus dem Durchflussvolumen (V_e) und dem Ausschlussvolumen (Void) gegen die molekulare Masse aufgetragen wurde. Mit Hilfe der Geradengleichung $y=62258e^{-3,695x}$ konnte die molekulare Masse y eines unbekanntes Proteins berechnet werden, wobei x das V_e / Void -Verhältnis Durchflussvolumen des unbekanntes Proteins darstellte.

Tab. 3.1: Gelfiltrations-chromatographie-Eichgerade

Die verwendeten Standardproteine und die aus der Gelfiltrationschromatographie ermittelte Messwerte .

ADH: Alkoholdehydrogenase

BSA: Rinderserum-Albumin

Standard	molekulare Masse (kDa)	Durchflussvolumen V_e (ml)	V_e/Void (8,17 ml) Ausschlussvolumen
Thyroglobulin	669	9,62	1,18
Apoferritin	434	11,43	1,40
β -Amylase	200	12,64	1,55
ADH	150	13,57	1,66
BSA	66	14,94	1,83
Carboanhydrase	29	16,84	2,06
Blue Dextran	2000	8,17	1,00

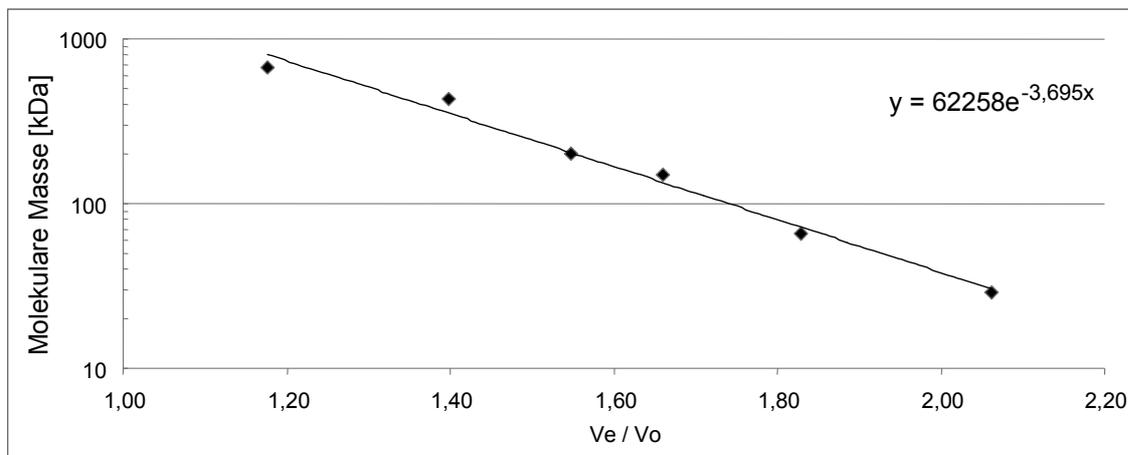


Abb 3.13: Gelfiltrationschromatographie-Eichgerade

Die Eichgerade der verwendeten Standardproteine ist dargestellt. Es ist V_e/V_o (Durchflussvolumen/Ausschlussvolumen) gegen die molekulare Masse aufgetragen. Es ergibt die Geradengleichung: $y = 62258e^{-3,695x}$

Für die Ermittlung der molekularen Masse des Msb2-Proteins wurde der Stamm ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) in SD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C in die stationäre Phase wachsen gelassen (OD ≈ 10,5). Die Kultur wurde mittels Zentrifugation in Medium und Zellpellet aufgetrennt. Anschließend wurde das Medium entgast und steril filtriert, um Luftblasen und Partikel zu entfernen. 500 µl des Mediums wurden für die Gelfiltrationschromatographie mit der Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eingesetzt und 38 Fraktionen (Durchflussvolumen von 7,53 ml bis 14,94 ml) mit jeweils 200 µl Volumen wurden aufgefangen, die anschließend in einem Western-Blot untersucht wurden. Abbildung 3.14 zeigt das Elutionsdiagramm, welches mehrere Peaks an unterschiedlichen Durchflussvolumen zeigt. Der erste Peak entspricht bei 8,2 ml Durchflussvolumen dem Ausschlussvolumen und enthält daher Proteine / Proteinkomplexe, die größer als 2000 kDa sind. Weitere Peaks des Elutionsdiagramms lassen darauf schließen, dass sich zahlreiche sekretorische Proteine im Medium befinden. Keiner der Peaks konnte im Folgenden jedoch ausschließlich Msb2 zugeordnet werden.

Abbildung 3.14 zeigt das Resultat einer Western-Blot Analyse der Elutionsfraktionen 1 bis 38, in der 20 µl der jeweiligen Elutionsfraktion (EF) für SDS-PAGE verwendet wurde. Man erkennt in den Elutionsfraktionen 4 und 5, d. h. in dem Ausschlussvolumen ein sehr schwaches Msb2-Signal.

Weiterhin erkennt man den Hauptteil von Msb2 in den Elutionsfraktionen 13 bis 17, entsprechend dem Durchflussvolumina 10,2 bis 10,8 ml, wobei Fraktion 15, mit dem stärksten Signal, ein Durchflussvolumen von 10,5 ml aufweist. Gemäß der Geradengleichung $y=62258e^{-3,695x}$ entspricht der kleinste Wert des Durchflussvolumens in Fraktion 13 der molekularen Masse von 614 kDa und Fraktion 17 entspricht 468 kDa. Somit liegt das Molekulargewicht von Msb2 in dem Bereich von 614000 bis 468000 und das intensivste Signal in Fraktion 15 der molekularen Masse von 536 kDa.

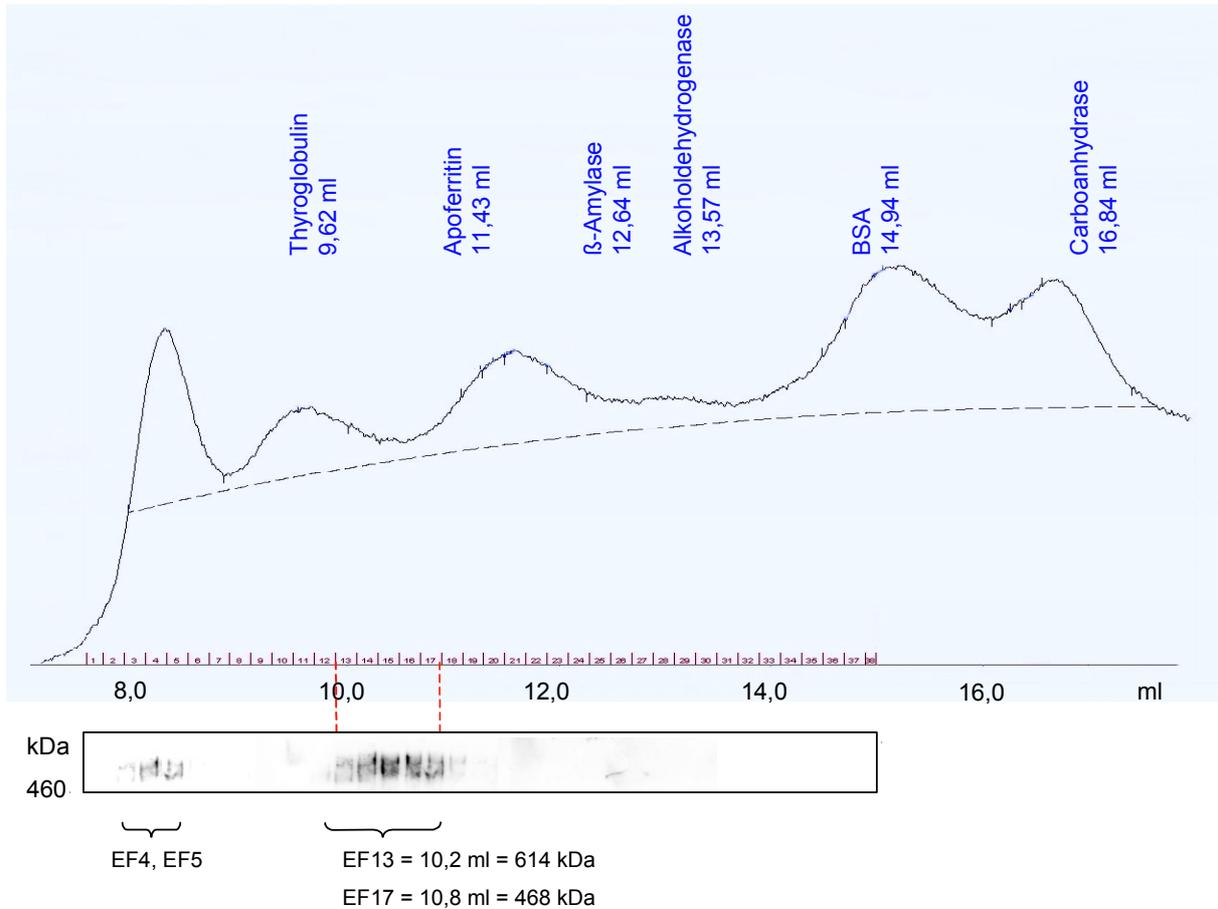


Abb. 3.14: Gelfiltrationschromatographie des Msb2-Proteins aus dem Medium

Das Profil der Gelfiltrationschromatographie von Msb2 aus dem Medium ist dargestellt. Es wurden 38 Elutionsfraktionen mit jeweils einem Volumen von 200 µl gesammelt und 20 µl wurden für Western-Blot Analysen verwendet. Ein Signal wurde bei den Elutionsfraktionen (EF) 4, 5 und 13 bis 17 detektiert (nähere Erläuterung im Text 3.4.1).

Dieser Wert stimmt ebenfalls etwa mit der Größe des denaturierten Msb2-Proteins in den Western-Blot Analysen (Abb. 3.8) überein. Da die theoretische molekulare Masse von Msb2 141 kDa beträgt, ist die reale Größe des Proteins ungefähr um das 3,8-fache erhöht. Die starke Glykosylierung des Msb2 trägt vermutlich wesentlich zu der Vergrößerung der molekularen Masse bei. Ob das Msb2 auch ein Dimer bildet (Msb2 im Ausschlussvolumen), kann mit der verwendeten Säule nicht nachgeprüft werden, da das Ausschlussvolumen zu nah an dem Durchflussvolumen des Msb2-Dimers liegt. Um solche Untersuchungen durchführen zu können, müsste eine Säulenmatrix verwendet werden, die aufgrund ihrer Materialeigenschaften Moleküle mit größerer molekularer Masse (Dimer aus Msb2= 2 x 536 kDa) auftrennen könnte.

3.4.2 Aufreinigung des Msb2 durch Affinitätschromatographie

Diese Experimente wurden durch den Masterstudenten Marc Swidergall durchgeführt und sind hier kurz zusammengefasst. Um das Msb2-Protein affinitätschromatographisch aufzureinigen, wurde 50 ml des Wachstumsmediums (SD-CASA) des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) von den Zellen getrennt und wie in 2.6.2 beschrieben über eine Säule mit kovalent gebundenen Anti-HA-Antikörpern gegeben. Das Msb2^{HA}-Protein konnte durch Zugabe eines Überschusses von HA-Peptiden von der Säule wieder freigesetzt werden. Das gesamte Eluat (2 x 1 ml) wurde durch eine Acetonfällung aufkonzentriert und komplett für SDS-PAGE verwendet. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt und zeigte zwei Banden, die größer als 460 kDa waren (Daten nicht gezeigt), während in den übrigen Proben (Durchläufe und Waschfraktionen) keine Banden zu erkennen waren.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung des Msb2-Proteins

Nach der molekularen Masse des sekretierten Msb2-Proteins sollte seine Konzentration im Medium ermittelt werden. Anhand der Signalstärke in den Western-Blots konnte vermutet werden, dass große Mengen an Msb2 nach Außen sekretiert wurden. Weder mit dem Bradford-Test noch mit der Lowry-Methode konnten verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden, die den Msb2-Gehalt des Mediums widerspiegeln. Auch nach Aufkonzentrierung durch eine Protein-Fällung der Medium-Proteine konnte keine Aussage getroffen werden. Msb2 hat eine tatsächliche molekulare Masse von ungefähr 536 kDa, somit ist es vermutlich stark glykosyliert und ca. 3,8-fach größer als die theoretische Größe. Aufgrund der starken Glykosylierung ist die Konzentrationsbestimmung nach Bradford und auch Lowry problematisch, da die Bindung von Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Bradford-Test) und von Lowry-Reagenz durch die Glykosylierung behindert wird.

Eine alternative Quantifizierungsmethode für Msb2 wurde durch den Masterstudenten Marc Swidergall etabliert. Diese Methode ist hier kurz zusammengefasst und beruht auf der immunologischen Detektion und Quantifizierung der HA-Epitope in Msb2^{HA}. Dafür wurden HA-Peptide in definierter Konzentration und definierte Volumina von Kulturmedium und von einer affinitätschromatographisch aufgereinigten Msb2-Probe (2.6.2) auf eine aktivierte PVDF-Membran getropft. Anschließend wurde wie im Abschnitt 2.6.4 für Western-Blots verfahren. Die Auswertung der Lumineszenz erfolgte mit dem Programm FUJIFILM Multi Gauge. Mittels der bekannten Konzentration der HA-Peptide konnte eine Standardkurve erstellt werden, durch die die Msb2-Konzentration ermittelt werden konnte (Tab. 3.2).

Wie man in der Tabelle 3.2 erkennen kann, ist die Konzentration von Msb2^{HA} (N-terminales Fragment) im Medium mit etwa 100 µg/ml sehr hoch. Die Konzentration der stationären Phase wurde bei Zunahme der Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,955 auf OD₆₀₀ = 6,07 ungefähr verdoppelt. Somit stieg die Konzentration des Proteins im Medium nicht linear mit der Zellzahl an. Die Konzentration des aufgereinigten Msb2 (2.6.3.3) war lediglich ca. 12,5-fach höher im Vergleich zum nicht konzentrierten Medium bei einer OD₆₀₀ = 6,07, obwohl 300 ml Medium auf 1 ml aufkonzentriert worden waren. Möglicherweise treten bei Konzentrierung und Aufreinigung von Msb2 erhebliche Verluste auf.

Tab. 3.2: Konzentrationsbestimmung von Msb2 aus dem Medium

Die Kultur ESCa3.1 wurde in SD-CASA angezogen und die OD_{600} der stationären Phase wurde bestimmt. Bei dem aufgereinigten Protein handelt es sich um eine Suspension, die aus 300 ml einer ESCa3.1 Kultur mit der $OD_{600} = 6,8$ durch affinitätschromatographische Aufreinigung auf 1 ml einer reinen Msb2-Suspension aufkonzentriert wurde. Mit Hilfe des Programms FUJIFILM Multi Gauge konnten die Proteinkonzentrationen aus den Western-Blot-Signalen bestimmt werden.

	OD_{600} Kultur	Proteinkonzentration errechnet aus Standard- kurve mit HA-Peptiden
Stationäre Phase (späte) Stamm ESCa3.1	6,07	146 $\mu\text{g/ml}$
Stationäre Phase (frühe) Stamm ESCa3.1	0,955	76 $\mu\text{g/ml}$
Aufgereinigtes Protein (300 ml einer Kultur der $OD_{600} = 6,8$ wurde auf 1 ml aufkonzentriert)		1,828 mg/ml

3.5 Glykosylierung des Msb2

Die extrazelluläre Domäne in der STR-Region von Msb2 besteht zu 43 % aus den Aminosäuren Serin und Threonin. Außerdem hat Msb2 ein wesentlich höheres tatsächliches Molekulargewicht als das theoretisch Vorausgesagte. Daraus kann gefolgert werden, dass Msb2 stark O-glykosyliert ist, so wie es auch bei *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Yang *et al.*, 2009). Zusätzlich könnte Msb2 auch N-glykosyliert sein, da Msb2 5 mögliche N-Glykosylierungsstellen enthält.

3.5.1 Enzymatische und chemische Versuche zur Entfernung der Glykosylierung

Es sollte überprüft werden, ob Msb2 durch N- und / oder O-Glykosylierung modifiziert wird. Das Wachstumsmedium des Stammes ESCa3.1 wurde durch Zentrifugation von den Zellen separiert und durch Aceton gefällt (2.6.6) und in Puffer bzw. Wasser aufgenommen. Das konzentrierte Medium wurde zum einen mit PNGase F (2.6.7.1) oder mit α -Mannosidase, einer Exoglycosidase behandelt. PNGase F spaltet zwischen der Akzeptor-Aminosäure Asparagin und dem GlcNAc von Glykosylketten, während α -Mannosidase von α 1-2 und α 1-3 gebundene D-Mannopyranosyl-Reste von Oligosacchariden abspaltet. Nach der Inkubationszeit wurden 10 μ l der Probe mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für eine anschließende SDS-PAGE und Western-Blot Analyse verwendet (Abb. 3.15).

Der Western-Blot zeigt, dass die PNGase F-Behandlung keinen Effekt auf die Glykosylierung von Msb2 hatte, da die unbehandelte Kontroll-Probe auf der gleichen Laufhöhe wie die behandelte Probe lag (Abb. 3.15 A). Es konnte vermutet werden, dass Msb2 entweder nicht N-glykosyliert ist oder aufgrund der starken O-Glykosylierung die Bindung zwischen Asparagin und GlcNAc für PNGase F nicht zugänglich ist. Die Behandlung mit der α -Mannosidase zeigte ebenfalls keinen Effekt (Abb. 3.15 B). Sowohl im sauren, als auch in einem neutralen pH-Bereich konnte das Enzym keine nennenswerte Mannose-Abspaltung hervorrufen. Alle Banden liefen im Western-Blot auf der gleichen Höhe.

Neben den enzymatischen Deglykosylierungsmethoden wurden ebenfalls chemische Methoden eingesetzt. So wurde ein β -Eliminierungs-Reagenz verwendet, durch die O-Glykane durch NaOH-Behandlung chemisch entfernt werden und die Proteine intakt lassen. Eine Erhitzung der Probe auf ca. 80 °C vor Zugabe des β -Eliminierungs-Reagenz könnte bei einigen Proteinen eine Verbesserung der Deglykosylierung-Reaktion mit sich bringen. Daher wurde ein Reaktionsansatz auf 80 °C erhitzt und der Andere bei Raumtemperatur belassen. Nach Inkubation mit dem β -Eliminierungs-Reagenz wurden die Proben neutralisiert und nach SDS-PAGE durch einen Western-Blot analysiert (Abb. 3.15 C). Diese chemische Behandlung veränderte die molekulare Masse des Msb2-Proteins, da die Banden der behandelten Proben weiter liefen und das Signal im oberen Bereich der Laufbahn nicht mehr detektierbar war. Somit konnte durch β -Elimination die O-Glykosylierung zumindest teilweise entfernt werden. Da die theoretische molekulare Masse des Msb2 bei 141 kDa liegt, kann man vermuten, dass entweder diese chemische Reaktion für eine komplette Entfernung des O-Glykans nicht ausreichte, oder aber, dass mögliche N-Glykosylierung zusätzlich entfernt werden müsste, um ein komplett deglykosyliertes Msb2-Protein zu erhalten. Die zusätzliche Hitzebehandlung von 80 °C hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Deglykosylierung von Msb2.

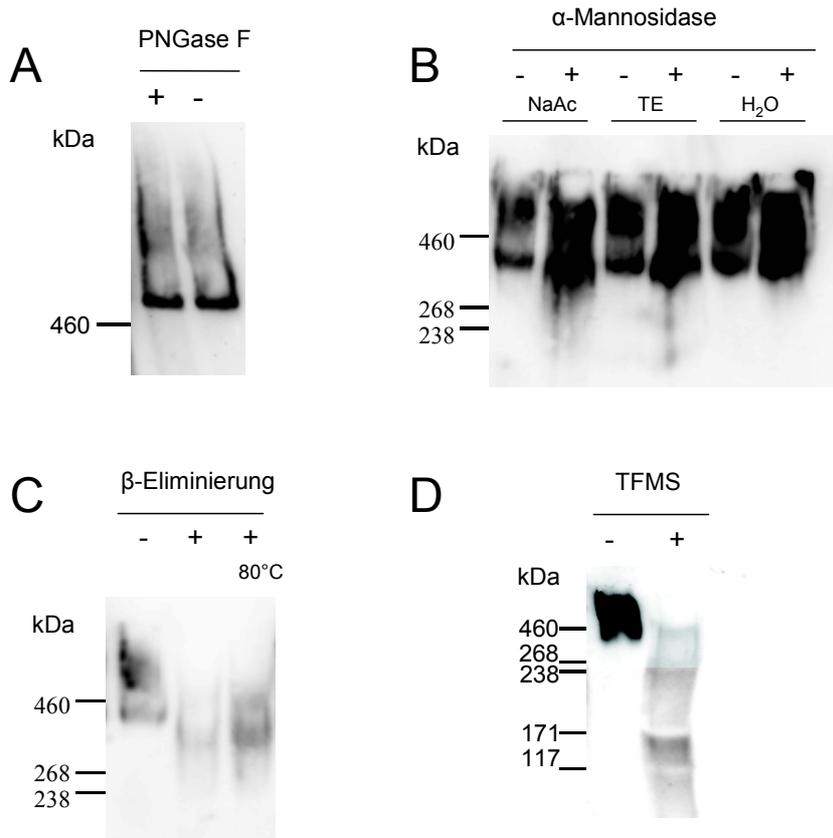


Abb. 3.15: Enzymatische und chemische Deglykosylierung des Msb2

Der Stamm ESCa3.1 ($\text{Msb2}^{\text{HA-V5}}$) wurde in YPD bis zu einer $\text{OD}_{600} \approx 6,2$ wachsen gelassen. **A** 10 μl des Wachstumsmediums des Stammes ESCa3.1 ($\text{Msb2}^{\text{HA-V5}}$) ($\approx 1,5 \mu\text{g}$ von Msb2) wurde mit Aceton gefällt (2.6.6), im selben Volumen Wasser gelöst und mit PNGase F (10 U) behandelt (2.6.7.1). **B** Die gleiche Menge des Wachstumsmediums wie in A wurde gefällt und anschließend in Wasser, TE-Puffer oder Natriumacetat (NaAc) aufgenommen. Proben wurden mit 10 U α -Mannosidase inkubiert (2.6.7.2). **C** 200 μl des Wachstumsmediums ($\approx 30 \mu\text{g}$ von Msb2) wurde mit Aceton gefällt und im gleichen Volumen Wasser aufgenommen. Anschließend wurde 40 μl der „ β -Elimination Reagent Mixture“ (Sigma) zugefügt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden 20 μl der Versuchsreaktion ($\approx 3,0 \mu\text{g}$ von Msb2) für den Western-Blot verwendet (2.6.7.3). **D** 1,5 ml des Wachstumsmediums ($\approx 220 \mu\text{g}$ von Msb2) wurde lyophilisiert, welches anschließend mit 150 μl TFMS (Trifluormethansulfonsäure) versetzt wurde (2.6.7.4). Abschließend wurde die Probe neutralisiert und ein Puffer-Austausch durchgeführt. 3 ml Lösung wurde aus der Dialyse-Kassette entnommen, gefällt und in 40 μl Wasser aufgenommen. 10 μl davon wurden anschließend für die Western-Blot Analyse verwendet.

Western-Blot Bedingungen waren wie in Abb. 3.8.

+ = Zugabe des Enzyms bzw. der Reagenz

- = keine Zugabe

Eine weitere chemische Behandlung führte zu einer kompletten Deglykosylierung des Msb2 (Abb. 3.15 D). Hierbei wurde das chemische Reagenz TFMS verwendet, welches sowohl N-glykosidisch- als auch O-glykosidisch-gebundene Zuckerketten von Proteinen abspaltet. Hierfür wurde 1,5 ml des Mediums vom Stamm ESCa3.1, welches zuvor durch Zentrifugation von Zellmaterial entfernt wurde, über Nacht lyophilisiert. Nach der Behandlung mit TFMS (2.6.7.4) und der Neutralisierung durch 60 %ige Pyridin Lösung wurde die Msb2-Probe dialysiert, wobei 4 Mal der Puffer ausgetauscht wurde (2.6.7.4.1). Abschließend wurden 3 ml der Probe aus der Dialyse-Kassette entnommen, die dann durch Fällung und Aufnehmen in

ddH₂O auf 40 µl aufkonzentriert wurde. 10 µl davon wurden anschließend für die Western-Blot Analyse verwendet (Abb. 3.15 D); die Positivkontrolle war 10 µl des Mediums vor der Lyophilisierung. Nach TFMS-Behandlung war in der Bahn ein leichter Schmier zu beobachten, welcher zwischen den Markerbanden 171 und 117 kDa akkumulierte. Dieses Ergebnis zeigt, dass Msb2 deglykosyliert wurde und eine molekulare Masse in der Nähe des theoretischen Wertes von 141 kDa erreichte. Allerdings ging ein sehr großer Teil des deglykosylierten Msb2-Proteins verloren, da die aufgetragene Menge der behandelten Probe ungefähr 375 µl des unbehandelten Mediums entspricht.

3.5.2 Untersuchungen zur N-Glykosylierung von Msb2

N-Glykosylierung erfolgt an Asparagin-Resten innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr. Mittels des Programms NetNGlyc 1.0 Server (www.cbs.dtu.dk) wurden 5 mögliche N-Glykosylierungsstellen im Msb2 vorhergesagt: Asparagine N501, N1191, N591, N451 und N687 (diese Reihenfolge ist nach der höchsten Wahrscheinlichkeit aufgelistet, Abb. 3.16).

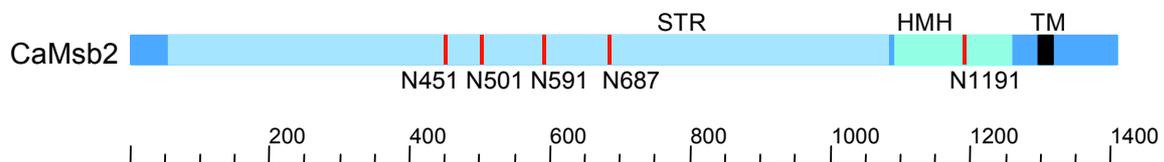


Abb. 3.16: N-Glykosylierung von Ca Msb2

Die 5 möglichen N-Glykosylierungsstellen im Msb2 sind in rot dargestellt. Die Asparagine N501, N591, N451 und N687 liegen innerhalb der STR-Domäne und N1191 innerhalb der HMH-Domäne.

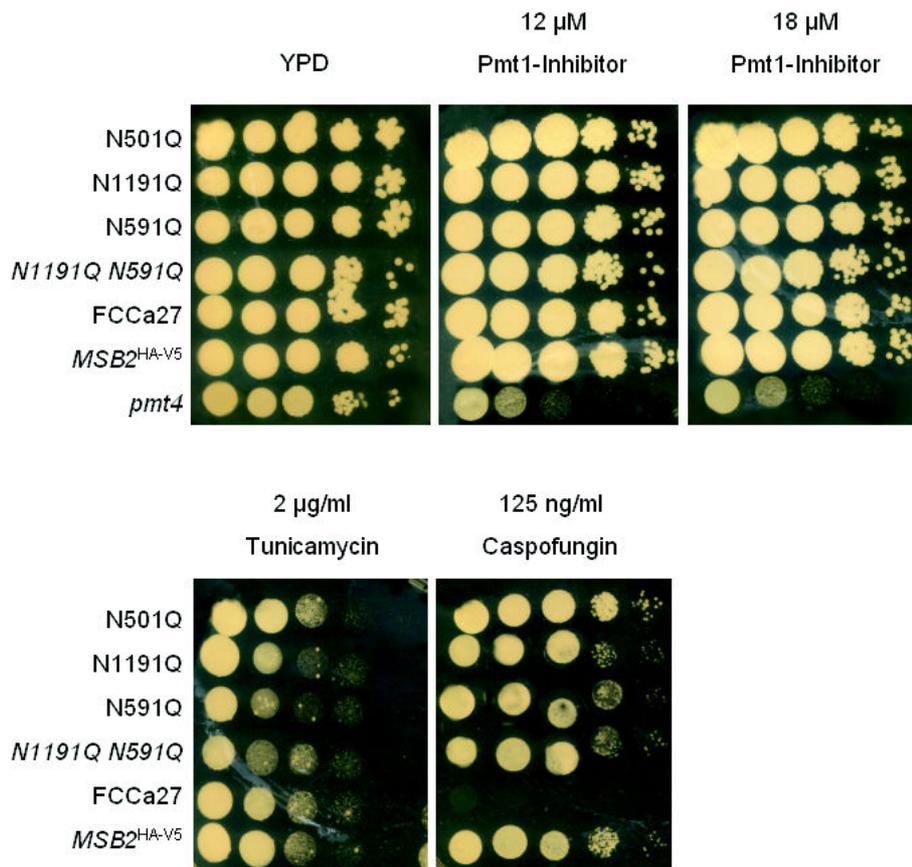
Um nun die Information zu erhalten, ob das Msb2-Protein möglicherweise N-glykosyliert ist, sollten die 5 vorhergesagten Asparagine gegen Glutamin ausgetauscht werden, da beide Aminosäuren ähnliche Eigenschaften haben. Der Austausch der kodierenden Sequenz in Plasmid pES11a wurde mittels Mutagenese-PCR erfolgreich durchgeführt. In Tabelle 3.3 sind die Stämme mit den Aminosäure-Austausch dargestellt. Es gelang 4 von 5 der möglichen N-Glykosylierungsstellen auszutauschen bzw. zu entfernen. Zum einen wurden die Aminosäuren N501, N1191, N591 ausgetauscht und zum anderen wurde durch eine Deletion (Abschnitt 3.5.3) zusätzlich N451 entfernt.

Wie man in den Abbildungen 3.17 und 3.18 erkennen kann, haben die Aminosäure-Änderungen keine Auswirkung auf die Sensitivität und das Hyphenwachstum der Stämme. Der Stamm ESCa3.1, der das native *MSB2* mit integrierten HA- und V5-Epitopen beinhaltete, verhielt sich auf den Sensitivitäts-Platten wie die Stämme mit den Aminosäure-Änderungen, während die *msb2*-Mutante FCCa27 in Anwesenheit von Caspofungin nicht lebensfähig war (Abb. 3.17). Alle untersuchten Stämme waren bis auf die *msb2*-Mutante auf YPM Platten zur Hyphenausbildung fähig (Abb. 3.18).

Tab. 3.3: Verschiedene Stämme mit Asparagin-Austausch innerhalb von Msb2.

Es sind die Plasmide aufgelistet, die mit Hilfe der angegebenen Primer durch Mutagenese-PCR konstruiert wurden. Die Template-DNA für pES12, pNH2 und pNH8 waren pES11a und für pES13 war es pNH2. pNH2 und pNH8 wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Nadine Horak (2010) erstellt. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben in den *LEU2* Lokus ins Genom des Stammes FCCa28 integriert. Die Namen der entstandenen Stämme ist in 4. Spalte aufgelistet. Es wurden immer 3 Transformanten pro Stamm für weitere Experimente verwendet.

Aminosäure-Austausch	Plasmid	Primer	Stamm-Name
N501Q	pES12	1N->Q vor2 1N->Q rück2	ESCa13 (jeweils 3 Transformanten)
N1191Q	pNH2	2N->Q vor2 2N->Q rück2	ESCa14 (jeweils 3 Transformanten)
N591Q	pNH8	3N->Q vor 3N->Q rück	ESCa15 (jeweils 3 Transformanten)
N1191Q N591Q	pES13	3N->Q vor 3N->Q rück	ESCa16 (jeweils 3 Transformanten)

**Abb. 3.17: Sensitivitätsuntersuchung der Stämme mit mutierten N-Glykosylierungsstellen von Msb2**

Ein Verdünnungstropfstest wurde wie in Abb. 3.6 beschrieben mit den Stämmen ESCa3.1 (*Msb2*^{HA-V5}), FCCa27 (*msb2*-Mutante), ESCa13.1 (N501Q), ESCa14.1 (N1191Q), ESCa15.1 (N591Q) und ESCa16.1 (N1191Q N591Q) auf Platten mit angegebener Konzentration von Inhibitoren durchgeführt. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur jeweils das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist.

Verdünnungsreihe (von links nach rechts): unverdünnt. 10^{-2} . 10^{-3} . 10^{-4} . 10^{-5} .

Die Transformanten und Kontrollstämme wurden auf die Anwesenheit von Msb2^{HA} untersucht. Western-Blot Analysen des Mediums zeigten, dass fehlende *N*-Glykosylierungsstellen keine Auswirkung auf das Laufverhalten von Msb2 haben (Abb. 3.19 A). Auch die Transformante mit der Doppel-Substitution sekretierte ein Msb2-Protein mit einer Größe > 460 kDa. Die gleichen Ergebnisse lieferten die Proben des Rohextraktes der untersuchten Stämme (Daten nicht gezeigt).

Eine mögliche *N*-Glykosylierung von Msb2 wurde auch in einer *mnn9* Mutante untersucht, in der *N*-Glykosyketten nicht im Golgi verlängert werden (Stolz und Munro, 2002). Dafür wurde Plasmid pES11a wie im Abschnitt 3.2 beschrieben in den *LEU2* Locus integriert. Die 3 Transformanten des entstandenen Stammes ESCa17.1, ESCa17.2 und ESCa17.3 wurden auf die Anwesenheit von Msb2^{HA} untersucht.

Die Abbildung 3.19 B zeigt, dass die Bande der Positivkontrolle (Msb2^{HA-V5}) auf der gleichen Laufhöhe lag wie die der *mnn9*-Mutante. So scheint die Glykosylierungsmutation *mnn9* keine Auswirkung auf die Zuckerketten-Zusammensetzung des Msb2-Proteins zu haben. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass Msb2 nicht *N*-glykosyliert ist oder aber dass die Kern-*N*-Glykosylierungsstruktur von vorhandenem Msb2 *N*-Glykosyketten nicht durch „äußere Ketten“ verlängert wird.

Zur weiteren Methode der Überprüfung des Msb2 *N*-Glykosylierungszustandes wurde zu dem Wachstumsmedium von ESCa3.1 der *N*-Glykosylierungshemmer Tunicamycin in geringer Konzentration (2 µg/ml) zugegeben. Nach Wachstum zu einer OD₆₀₀ = 0,57 veränderte sich das Laufverhalten des Msb2-Proteins im Western-Blot nicht (Abb 3.19 C). Dieses Ergebnis lässt wiederum vermuten, dass Msb2 nicht oder gering *N*-glykosyliert ist.

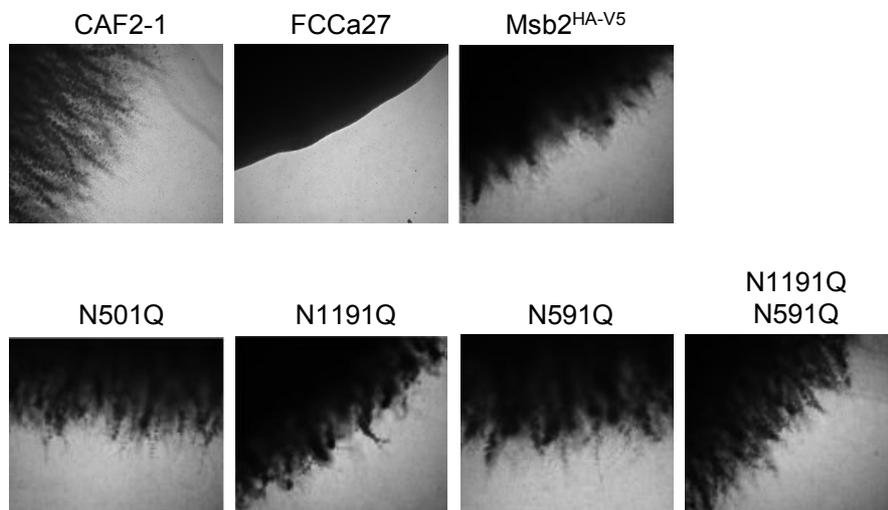


Abb. 3.18: Hyphenbildung der Stämme mit fehlenden potentiellen *N*-Glykosylierungs-stellen in Msb2

Der Wildtypstamm CAF2-1, die *msb2*-Mutanten FCCa27, ESCa3.1, ESCa13.1 (N501Q), ESCa14.1 (N1191Q), ESCa15.1 (N591Q) und ESCa16.1 (N1191Q N591Q) wurden auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung wie in Abb. 3.7 getestet. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei jeweils nur das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist.

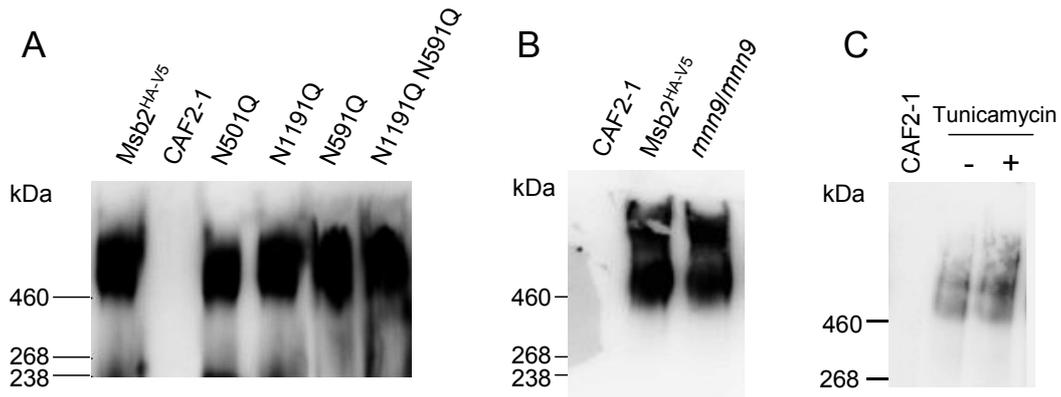


Abb. 3.19 Msb2-Glykosylierung in Mutanten und Inhibierung der N-Glykosylierung

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8 **A** 20 μ l (\approx 3,0 μ g Msb2) des Wachstumsmediums ($OD_{600} \approx$ 5,8) der Stämme ESCa3.1(Msb2^{HA-V5}), CAF2-1, ESCa13 (N501Q), ESCa14 (N1191Q), ESCa15 (N591Q) und ESCa16 (N1191Q N591Q) wurde auf 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. **B** Das gleiche Volumen des Wachstumsmediums ($OD_{600} \approx$ 5,8) der Positivkontrolle ESCa3.1(Msb2^{HA-V5}), der Negativkontrolle CAF2-1 und des Stammes ESCa17.1 (*mnn9*-Mutante mit integriertem *MSB2*^{HA-V5}) wurden für den Western-Blot verwendet. **C** Der Stamm ESCa3.1 wurde bis zu der $OD_{600} = 0,57$ in Anwesenheit von Tunicamycin (2 μ g/ml) in YPD wachsen gelassen. 30 μ l (450 ng Msb2) des Wachstumsmediums wurden für den Western-Blot verwendet. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei jeweils nur das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist.

3.5.3 Glykosylierung von Msb2 in *pmt*-Mutanten

```

MLANVKLNLTALYVLSYVSVVNAYQQENEITPADNIDKRAGAIGNFFRDFNTNSIFGNDNLEV 62
NQPSTNGATSTGHFFGSPSTSTHQQTTPGETSNNVNTKSSSQNQSPSTSPSTVAAAAAT
SSSPVASTRPASTSEKQKQEEITARQSTSPATTATTSNTPPSPSTSKETPTSNTAQTSAN
NNQQSSNTAAPSTSVIQPSTSEVHVQSQQTSTTPNTPTSSPNTPTTSEAAPTTSAAPTTSSEA
PVTPSTSEWPNPTTTSEAPNTPTTSEAPVTPSTSEWPNPTTTSKAPNTPTTSEAPATPTTS 325
EAPNTPTTSEAPVPTTSEWVPTTSTQGDVSTSSVTEQTTLSSTQLPPTTALTQTSTP
EASDSPKPSSTSIETPSTSTFEQDPTTSSVGTSPSEEQPQPTTSELAVTNSPTQESTSLV
EPTTSSLESSNTPTPNPSTSEAQPSTASQAPPDPTSSAPAPELSSSNADFSNLVLSSETI
SLVNPTDSQIDSSSTTDAVSQATTEPTSENTPTAASSVTANDINSAQSSAPTSNADAE TASS
PVSEQSLATGSQTSLDTTAGASSTASEATAENLSTFGTDGSSDASQTIAETTSNSPDQSVVT 715
PSASASPDVSTLPTGSESGTSLVSGSETSIDTNTVASGSTVIPSSNIPTQSPSQSVSSDAA
ASNVSTGSATTDLSLAGSETGVQPISSSATGTSEPVSSEYNSSEGTSLVWPTNSELSSTVT
GSSETAATAINSESVLTGSSDTAATVTGSESILTGNTETSATAIAESESTLTGSTTGATDSAATT
IASESVLTGTS DASATVIPSE SALTGSTTPIASESVLTGTT SADVSGATTIGSESIFTGTTEST
GTPLPTASGTESLDTT VATGTSVSEQSGVETALSTQPTTGTEATVTS GVSQSEQTGTS AVT 1070
GVTESSEIQSGATT PATTASDATAVTNASEASAESQATTTAASEATTGSQVTTAASEAAT
ESQATTAASEAATESQATTAASEAATESQATTPASEPATGSQVTSEVTPATVPSSVTAADTA
ATSIITSPASAEPSSSEVTAVAPSAATTSSTKNWLP SLLVIAETPSSNASKSTESIVQASATGA
STSGLPRAITPETTTTTPGFDYQVITVGFKSALNYPFVENSIS SAQIFQYLPRVLKYPFNGDKS
LQNVSVRRILIPYTASNIDYITVAEVYFPKDSVKALGSFITTPGSAIYRNPDSV LQALASLIDSR 1254
IPLTGLVTDDQQVSGSSSDSNPSTNSYGSMDIVSNTKVADKGRIAGITIGAAAGCGLYMTLM
VLLFRKFRKSNKALELPITDSESNLGFSDDEDSSMLESSSGFSAIFSRINHGGVLTGDPNGGG
DDMMMMNNNNNNLRPNNISSEPVQASNSLGWYH
    
```

Abb. 3.20: Aminosäuresequenz von CaMsb2

Serin und Threonin sind in gelb hervorgehoben. Die STR-Domäne (Aminosäuren 57-1083) ist in blau, die HMH-Domäne (Aminosäuren 1094-1259) in grün und die TM-Domäne (Aminosäuren 1297-1319) in schwarz unterstrichen.

Die STR-Region von Msb2 enthält zu 43 % die potenzielle O-Glykosylierungsstellen Serin und Threonin (Abb. 3.20). Die O-Glykosylierung bei *C. albicans* wird durch 5 Isoformen von Pmt Proteinen (Pmt1, 2, 4, 5 und 6) eingeleitet (Prill *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008).

3.5.3.1 Glykosylierung des vollständigen Msb2-Proteins

Um zu prüfen, welche Proteinmannosyltransferase an der O-Glykosylierung von Msb2 beteiligt ist, wurde Plasmid pES11a (Msb2^{HA-V5}) in alle 4 homozygote *pmt*-Mutanten CAP1-3121, CAP4-2164, P5-5744, CAP2-2311 (*pmt1/pmt1*, *pmt4/pmt4*, *pmt5/pmt5* und *pmt6/pmt6*) und die heterozygote *pmt2/PMT2* Mutante P2-22 wie in Abschnitt 3.2 beschrieben in den *LEU2* Locus des Genoms integriert (Prill *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008). Msb2 im Kulturmedium wurde wie oben beschrieben durch Immunoblot nachgewiesen. In Abbildung 3.21 A sieht man, dass die Msb2-Bande der Positivkontrolle ESCa3.1 auf der gleichen Höhe wie die der *pmt2*-, *pmt4*-, *pmt5*- und *pmt6*- Mutanten liegt. Bei der *pmt1*-Mutante ist das Msb2-Signal ein „Schmier“, der bis zu den Markerbanden 268 und 238 kDa verläuft. Hieraus kann geschlossen werden, dass Msb2 teilweise von Pmt1 O-glykosyliert wird. Die Ergebnisse aus dem Medium und dem Rohextrakt der logarithmischen Phase, sowie dem Rohextrakt der stationären Phase stimmen mit dem Ergebnis aus der Abbildung 3.21 A überein (Daten nicht gezeigt). In mehreren Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass das cytoplasmatische Msb2-Fragment im Rohextrakt aller *pmt*-Mutanten unverändert wie im Stamm ESCa3.1 in der SDS-PAGE lief (Daten nicht gezeigt).

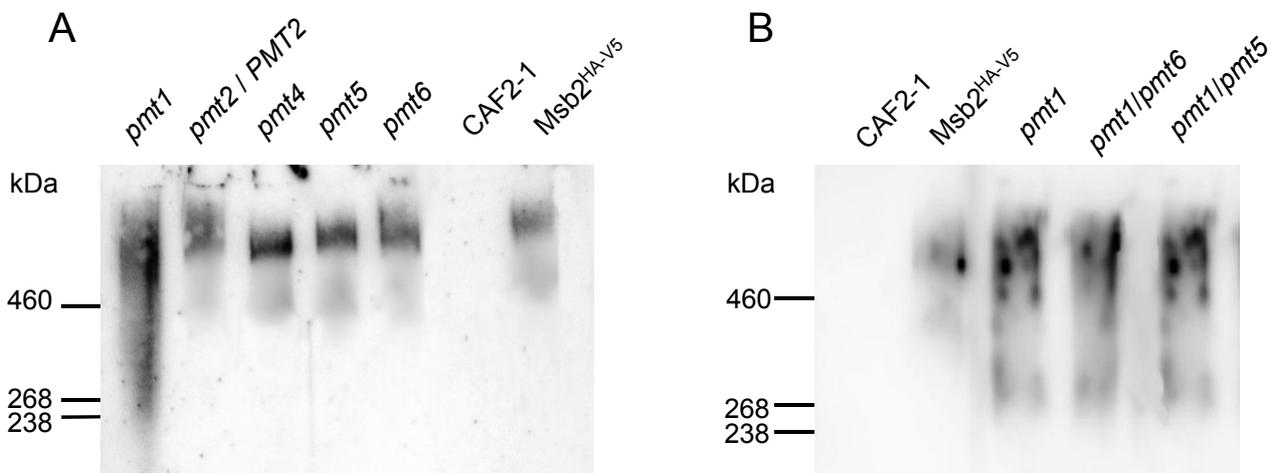


Abb. 3.21: Untersuchung der Glykosylierung des Msb2 in verschiedenen *pmt*-Mutanten

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde das Wachstumsmedium der Kulturen in der stationären Phase ($OD_{600} \approx 6,0$). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei jeweils nur das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist.

A 20 μ l ($\approx 3,0$ μ g Msb2) des Wachstumsmediums der Stämme ESCa3.1(Msb2^{HA-V5}), CAF2-1, ESCa18.1 (*pmt1/pmt1*), ESCa19.1 (*pmt2/PMT2*), ESCa20.1 (*pmt4/pmt4*), ESCa21.1 (*pmt5/pmt5*) und ESCa22.1 (*pmt6/pmt6*) wurden für den Westernblot verwendet und der Glykosylierungszustand des Msb2-Proteins untersucht **B** Der Glykosylierungszustand des Msb2-Proteins in *pmt*-Doppelmutanten ESCa23.1 (*pmt1/pmt1 pmt5/pmt5*) und ESCa24.1 (*pmt1/pmt1 pmt6/pmt6*) wurde wie in A untersucht. Das Wachstumsmedium hatte die $OD_{600} = 6,0$, von der 20 μ l ($\approx 3,0$ μ g Msb2) für den Western-Blot verwendet wurde.

Um einen möglichen verstärkten Glykosylierungsdefekt zu untersuchen, wurde das Plasmid pES11a (*MSB2*^{HA-V5}) in die Doppelmutante ESCaP15 (*pmt1 pmt5*) und CPP1123 (*pmt1 pmt6*) integriert und wie oben beschrieben analysiert. Der „Schmier“ beider Doppelmutanten stimmt mit dem der *pmt1* Einfachmutante überein (Abb. 3.21 B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass Msb2 von Pmt1 aber nicht von Pmt5 bzw. Pmt6 teilweise O-glykosyliert wird, da in den Doppelmutanten der Glykosylierungsdefekt nicht verstärkt wurde.

3.5.3.2 Glykosylierung eines deletierten Msb2-Proteins

Yang *et al.* (2009) konnte Glykosylierungsdefekte des ScMsb2-Proteins in den einzelnen *pmt*-Mutanten besser nachweisen, indem ein durch Deletionen verkleinertes Msb2-Protein für die Western-Blot Analysen verwendet wurde. Daher wurde eine 1,3 kb große Deletion zwischen den Sequenzen für die Signalsequenz und den HA-Epitop des *C. albicans MSB2*-Gens durch Mutagenese-PCR durchgeführt. Wie die Abbildung 3.22 verdeutlicht, wurde anstelle der 1,3 kb großen Region eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle mittels der Primer Cla1 Del1 next1 und Cla1 Del1 next2 in *MSB2* eingefügt. Das für die Mutagenese verwendete Plasmid war pES11a. Das Plasmid, dessen Sequenz durch Sequenzierung verifiziert wurde, wurde pES14 genannt (in Abbildung als *MSB2-ΔN* gekennzeichnet) und in den *LEU2* Lokus der *msb2*-Mutante FCCa28 integriert (Stammbezeichnung: ESCa25, jeweils 3 Transformanten wurden getestet). Der deletierten Variante fehlen 450 Aminosäuren.

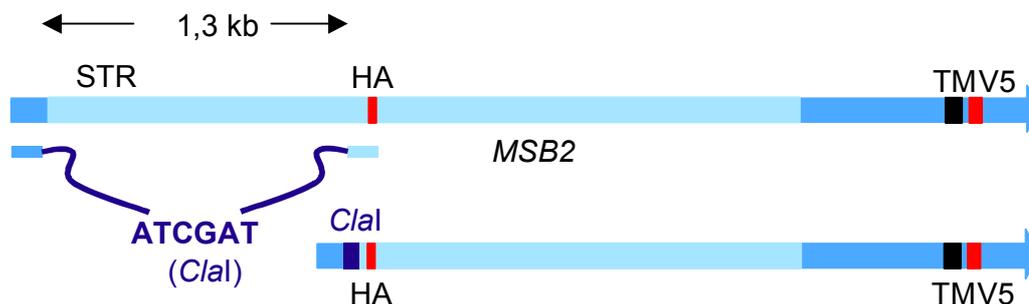


Abb. 3.22: Modifiziertesn *MSB2*-ORF mit einer 5'-terminaler Deletion (*MSB2-ΔN*)

Die obige Darstellung zeigt das vollständige *MSB2*-ORF mit den HA- und V5-Epitopen, welches sich in Plasmid pES11a befindet. Die STR-Region ist in hellblau angedeutet. Die untere Darstellung zeigt das *MSB2*-ORF nach der Deletion. Primer mit *Cla*I Restriktionsschnittstellen sind in violett dargestellt. Es handelt sich um eine ca. 1,3 kb-große Deletion in dem 5'-terminalen Bereich der STR-Region. Das Msb2-ΔN Protein enthält 450 Aminosäuren weniger als Msb2.

Wie man in Abbildung 3.23 erkennen kann, war die N-terminal deletierte Msb2-Variante wie das vollständige Msb2-Protein in der Lage die Sensitivität der *msb2*-Mutante gegenüber Caspofungin zu komplementieren. Diese Deletion komplementierte ebenfalls den Defekt in der Hyphenbildung. Wie erwartet war die *pmt4*-Mutante supersensitiv gegenüber dem Pmt1-Inhibitor (Prill *et al.*, 2005) und die *msb2*-Mutante war supersensitiv gegen Caspofungin (Abb. 3.23).

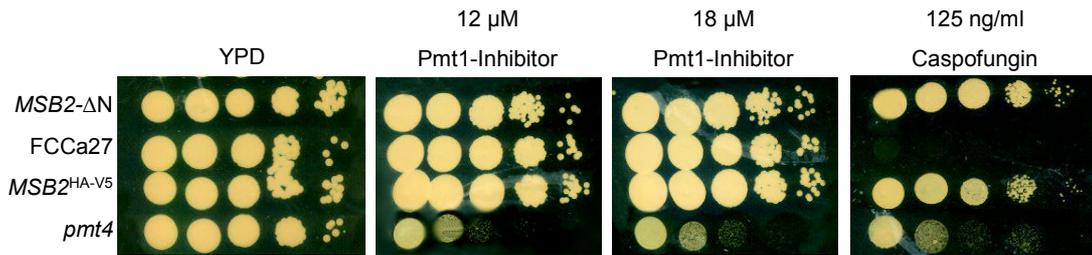


Abb. 3.23: Sensitivitätsuntersuchung von ESCa23 (*MSB2-ΔN*)

Wie in Abb. 3.6 wurde ein Verdünnungstropftest mit den Stämmen ESCa3.1 (*Msb2^{HA-V5}*), FCCa27 (*msb2*-Mutante) und ESCa25.1 (*MSB2-ΔN*) auf Platten mit angegebener Konzentration von Inhibitoren durchgeführt. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei jeweils nur das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist.

Verdünnungsreihe (von links nach rechts): unverdünnt, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

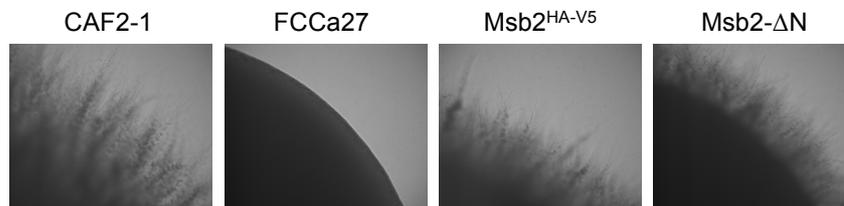


Abb. 3.24: Hyphenbildung des Deletionsstammes ESCa23 (*MSB2-ΔN*)

Der Kontrollstamm CAF2-1, ESCa3.1 (*Msb2^{HA-V5}*), die *msb2*-Mutanten FCCa27, sowie der Stamm ESCa23 (*MSB2-ΔN*) mit der 1,3 kb großen Deletion innerhalb des *MSB2*-Gens wurde auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung auf YPM-Platten wie in Abb. 3.7 getestet. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei jeweils nur das Ergebnis einer Transformante abgebildet ist.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die *MSB2-ΔN*-Variante funktionell war, wurde Plasmid pES14 wie oben beschrieben in alle *pmt*-Mutanten integriert. Anschließend wurden Western-Blot Analysen zum Nachweis von *Msb2* durchgeführt.

Die 1,3 kb-große *MSB2*-Deletion führte zu einem verkleinerten *Msb2*-Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von 98 kDa (Abb. 3.25, Spur 1 und 2). Die diffuse Bande des *Msb2-ΔN* verläuft nun bis zu den Markerbanden 268 und 238 kDa, die in den *pmt2*-, *pmt4*-, *pmt5*- und *pmt6*-Mutanten auf der gleichen Höhe liegt. Andererseits läuft das deletierte *Msb2* in der *pmt1*-Mutante weiter in das Gel hinein, was auch in Doppelmutanten zu beobachten ist. Diese Ergebnisse sind mit den Schlussfolgerungen der Abbildung 3.21 deckungsgleich. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *Msb2* teilweise von *Pmt1* O-mannosyliert wird. Restliche O-Glykosylierung könnte durch die *Pmt2*-Isoform katalysiert werden, da in der heterozygoten *pmt2/PMT2* Mutante noch ein intaktes *PMT2*-Gen vorliegt.

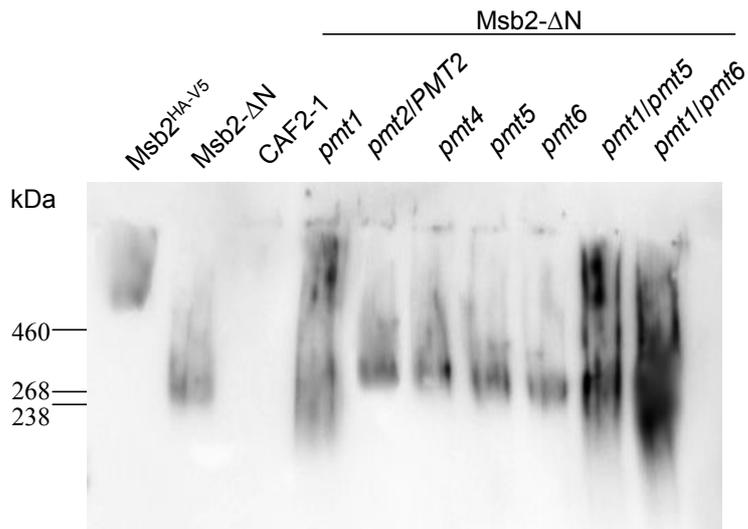


Abb. 3.25: Untersuchung der Glykosylierung des Msb2 und des Msb2-ΔN in verschiedenen *pmt*-Mutanten

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 μ l (\approx 3,0 μ g Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase (\approx OD₆₀₀ = 5,9). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse aus dem Rohextrakt und dem Medium der exponentiellen als auch stationären Phase sind gleich.

Der Glykosylierungszustand des Msb2-Proteins in *pmt*-Einzel- und Doppelmutanten wurde im Western-Blot analysiert. Die Stämme ESCA3.1 (Msb2^{HA-V5}), CAF2-1, ESCa25 (Msb2-ΔN), ESCa26 (Integration des pES14 in die *pmt1*-Mutante CAP1-3121), ESCa27 (Integration des pES14 in die *pmt2*-Mutante P2-22), ESCa28 (Integration des pES14 in die *pmt4*-Mutante CAP4-2164), ESCa29 (Integration des pES14 in die *pmt5*-Mutante P5-5744), ESCa30 (Integration des pES14 in die *pmt6*-Mutante CAP2-2311), ESCa31 (Integration des pES14 in die *pmt1*- und *pmt5*-Mutante ESCaP15) und ESCa32 (Integration des pES14 in die *pmt1*- und *pmt6*-Mutante CPP1123) wurden untersucht.

3.6 Untersuchungen zur proteolytischen Spaltung des Msb2

In Abschnitt 3.3 wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Region von Msb2 in Wachstumsmedium sekretiert wird, die cytoplasmatische Region aber in den Zellen verbleibt. Damit die extrazelluläre Region des Msb2 ins Medium sekretiert werden kann, muss zuvor eine Spaltung des Msb2-Proteins stattfinden. Vadaie *et al.* (2008) konnten zeigen, dass Msb2 bei *S. cerevisiae* durch die Aspartylprotease Yps1 in eine cytoplasmatische und extrazelluläre Region gespalten wird.

3.6.1 Spaltung von Msb2 in *sap9*, *sap10* und *kex2* Mutanten

ScMsb2 wird durch die Aspartylprotease Yps1 gespalten, und in einer *yps1*-Mutante konnte eine Sekretion ins Medium nicht analysiert werden. Die homologe Protease zu Yps1 aus *S. cerevisiae* ist Sap9 in *C. albicans* (21,9 % Identität) und auch Sap10 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu Yps1, wie die GPI-Verankerung in der Plasmamembran. *sap9*- und *sap10*-Mutanten wurden auf die Prozessierung von Msb2 untersucht, indem sie mit Plasmid pES11a transformiert und durch Immunoblot auf die Sekretion von Msb2 untersucht wurden. Msb2 war im Medium der *sap9*-, *sap10*- sowie der Doppelmutante *sap9/sap10* detektierbar (Abb. 3.26). Somit sind diese Aspartylproteasen nicht an der Spaltung des Msb2-Proteins beteiligt.

Kex2 ist eine spezifische Serin-Endoproteinase, die am Carboxy-Ende der Aminosäuren Arginin-Arginin bzw. Lysin-Arginin spaltet. Diese Aminosäuren-Konstellation ist in der Nähe der Msb2-Transmembrandomäne aufzufinden (Positionen: Aminosäuren 1320 und 1323). Plasmid pES11a wurde daher in die *kex2*-Mutante (CNA4) wie vorher beschrieben durch Transformation integriert und in 3 unabhängigen Transformanten analysiert (ESCa36.1, ESCa36.2, ESCa36.3). Msb2 war im Medium der *kex2*-Mutante detektierbar, so dass ausgeschlossen wird, dass Msb2 durch Kex2 gespalten wird (Abb. 3.26).

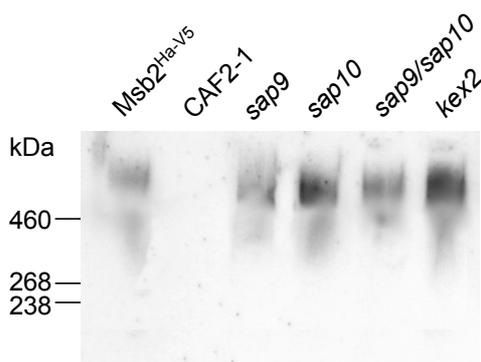


Abb. 3.26: Sekretion von Msb2 durch *sap9*-, *sap10*- und *kex2*-Mutanten

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 μ l (\approx 3,0 μ g Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase (\approx OD₆₀₀ = 6,02). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse aus dem Rohextrakt und dem Medium der exponentiellen als auch stationären Phase sind gleich.

Die Sekretion des Msb2-Proteins wurde in den Stämmen ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}), CAF2-1, ESCa33.1 (*sap9* mit integriertem pES11a), ESCa34.1 (*sap10* mit integriertem pES11a Plasmid), ESCa35.1 (*sap9/sap10* mit pES11a Plasmid) und ESCa36.1 (*kex2* mit integriertem pES11a Plasmid) untersucht, wobei das Plasmid pES11a in allen Mutanten in den *LEU2*-Lokus transformiert wurden.

3.6.2 Proteolytische Prozessierung von Msb2 in Gegenwart von Inhibitoren

Es wurde versucht, durch spezifische Inhibierung der Msb2-Spaltung die zuständige Protease zu identifizieren. Hierfür wurden spezifische Protease-Inhibitoren eingesetzt. Zunächst wurden kommerzielle Inhibitor-Tabletten eingesetzt (Complete, Mini, EDTA-free-Tabletten, Roche), welche ein breites Spektrum an verschiedenen Protease-Inhibitoren enthalten. Dadurch werden Serin- und Cysteinproteasen effektiv gehemmt, jedoch nicht Metallo- und Aspartylproteasen.

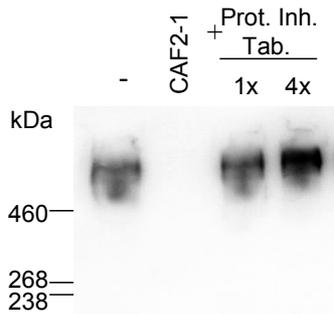


Abb. 3.27: Einfluss von Protease-Inhibitoren auf Msb2-Sekretion

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 μl ($> 3,0 \mu\text{g}$ Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase ($\approx \text{OD}_{600} = 10,0$). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse des Rohextrakts und des Mediums der exponentiellen und der stationären Phase sind gleich.

Das Msb2-Vorkommen im Medium wurde nach Zugabe von Protease-Inhibitoren per Western-Blot Analysen untersucht. Die Positivkontrolle ist ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) mit einem – (keine Zugabe der Reagenz) versehen und die Negativkontrolle ist CAF2-1.

1x deutet auf einmalige Zugabe einer Tablette zum Wachstumsmedium direkt nach dem Innokulieren des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin. 4x deutet auf insgesamt 4-malige Zugabe der Tablette zum Medium des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin, wobei die Zugabe alle 8 Stunden erfolgte. Eine Tablette (Complete, Mini, EDTA-free-Tabletten, Roche) soll in 10 ml Lösung Serin- und Cysteinproteasen, aber keine Metallo- und Aspartylproteasen hemmen. Die genauen Inhibitoren und dessen Konzentrationen sind von Roche nicht preisgegeben.

Die Vorkultur der Stämme ESCa3.1 und CAF2-1 als Negativkontrolle wurden in 10 ml frisches YPD inokuliert und bis zu einer $\approx \text{OD}_{600} = 10,0$ wachsen gelassen. Direkt nach der Inokulation wurde in das frische Medium einer Kontrollprobe eine Inhibitor-Tablette zugefügt (in Abbildung 3.27 als 1x gekennzeichnet), wobei zu einer weiteren Kontrollprobe viermal zusätzlich nach jeweils 8 Stunden eine erneute Tablette zugeführt wurde (in Abbildung 3.27 als 4x gekennzeichnet). Der Positivkontrolle (ESCa3.1) und der Negativkontrolle CAF2-1 wurden keine Inhibitor-Tabletten zugegeben. Die Abbildung 3.27 zeigt, dass die Zugabe der Protease-Inhibitor Tabletten keine Auswirkungen auf die Msb2-Sekretion hatte. Somit kann man daraus folgern, dass weder eine Serin- noch eine Cysteinprotease an der Msb2-Spaltung beteiligt ist.

Pepstatin A ist ein Aspartylprotease-Hemmer, welcher ein spezifischer und kaum toxischer Inhibitor für saure Aspartylproteasen wie Pepsin, HIV- und MMTV-Protease und Cathepsin D ist. Bei diesem Experiment wurde wie oben verfahren, jedoch wurde zusätzlich zu Kontrollproben reines Methanol zugesetzt, da Pepstatin A in Methanol gelöst war. In den Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen (von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 15 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Wie man jedoch der Abbildung 3.28 entnehmen kann, hat Pepstatin A keine Auswirkung auf die Msb2-Sekretion und seine Spaltung. Die Methanolzugabe führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Sekretion. Somit wird Msb2 vermutlich nicht durch eine Aspartylprotease prozessiert.

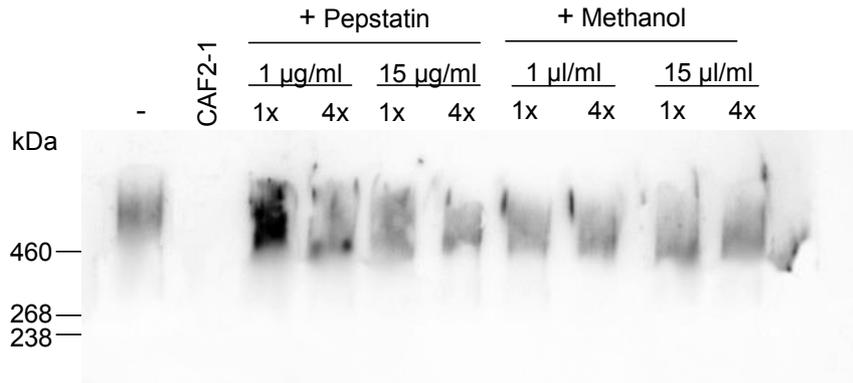


Abb. 3.28: Sekretion von Msb2 bei Zugabe von Pepstatin A

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 µl (> 3,0 µg Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase (≈ OD₆₀₀ = 8,0). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse aus dem Rohextrakt und dem Medium der exponentiellen als auch stationären Phase sind gleich.

Die Msb2-Sekretion im Medium wurde nach Zugabe von Pepstatin A bzw. Methanol per Western-Blot Analysen untersucht. Die Positivkontrolle ist ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) mit einem – (keine Zugabe der Reagenz) versehen und die Negativkontrolle ist CAF2-1.

1x deutet auf einmalige Zugabe der Reagenz (1 µg/ml bzw. 15 µg/ml) zum Wachstumsmedium direkt nach dem Innokulieren des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin. 4x deutet auf insgesamt 4-malige Zugabe der Reagenz (1 µg/ml bzw. 15 µg/ml) zum Medium des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin, wobei die Zugabe alle 8 Stunden erfolgte.

Ebenso wie in den oberen Experimenten beschrieben, wurde der Metalloprotease-Inhibitor Amastatin (Appli Chem) eingesetzt. Amastatin inhibiert viele membrangebundene Proteasen, einschließlich Aminopeptidase, welche endständige Peptidbindungen hydrolysiert. Wie Abbildung 3.29 zu entnehmen ist, hat Amastatin auch bei hoher Konzentration keine Auswirkung auf die Sekretion und somit Prozessierung des Msb2-Proteins.

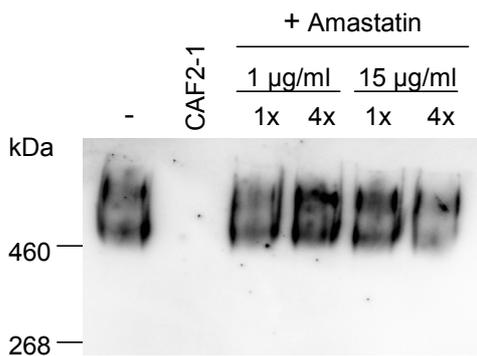


Abb. 3.29: Sekretion von Msb2 bei Zugabe von Amastatin

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 µl (≈ 3,0 µg Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase (≈ OD₆₀₀ = 6,3). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse aus dem Rohextrakt und dem Medium der exponentiellen als auch stationären Phase sind gleich. Das Msb2-Vorkommen im Medium wurde nach Zugabe von Amastatin untersucht. Die Positivkontrolle ist ESCa3.1

(Msb2^{HA-V5}) mit einem – (keine Zugabe der Reagenz) versehen und die Negativkontrolle ist CAF2-1.

1x deutet auf einmalige Zugabe von Amastatin (1 µg/ml bzw. 15 µg/ml) zum Wachstumsmedium direkt nach dem Innokulieren des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin. 4x deutet auf insgesamt 4-malige Zugabe von Amastatin (1 µg/ml bzw. 15 µg/ml) zum Medium des Stammes ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) hin, wobei die Zugabe alle 8 Stunden erfolgte.

3.7 Struktur-Funktionsuntersuchungen von Msb2

In diesem Abschnitt wird die Funktion verschiedener Msb2-Sequenzen durch Mutationsanalysen untersucht. In Absatz 3.5.3 wurde bereits beschrieben, dass N-terminale extrazelluläre Msb2-Bereiche (Aminosäure 32 bis 482) nicht essentiell für die Funktion sind. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der cytoplasmatische Bereich allein oder in gesamten Msb2-Protein wichtig für die Funktion ist. Weiterhin wurde durch Punktmutationen die Bedeutung einzelner Msb2-Reste für die Funktion analysiert.

3.7.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für verschiedene Msb2 Varianten

Folgende Plasmide wurden konstruiert:

A Expressionsvektor für cytoplasmatische Domäne (Msb2-tail)

Die Sequenzen für den cytoplasmatischen Bereich (Aminosäuren 1331-1438) wurden durch PCR mit den Primern C-Tail vor (*Xho*I) und C-Tail rück (*Xho*I) aus genomischer DNA des Stammes CAF2-1 vervielfältigt. Das 321 bp-Fragment wurde stromabwärts des *PCK1* Promotors in Plasmid pBI1 eingesetzt. Das entstandene Plasmid pES15 wurde mit *Eco*RV linearisiert und durch Transformation in den *LEU2* Lokus des Stammes FCCa28 (*msb2*) integriert (erhaltener Stamm ESCa37, jeweils 3 Transformanten).

B Msb2 ohne cytoplasmatische Domäne (Msb2-ΔC)

In einem weiteren Expressionsvektor wurden Sequenzen für die cytoplasmatische Domäne des Msb2 deletiert. Dafür wurden mittels einer Mutagenese-PCR 15 bp stromabwärts der Transmembrandomäne zwei Stoppcodons eingebaut. Für diese Konstruktion wurde Plasmid pES11a als Template verwendet (Primer *MSB2* Stopp nach TM Hin und *MSB2* Stopp nach TM Her). Diese Mutagenese verkürzte Msb2^{HA-V5} von 1438 Aminosäuren auf 1335 Aminosäuren (Abb. 3.30 B). Das entstandene Plasmid pES16 wurde wie oben in den *LEU2* Lokus des Stammes FCCa28 integriert (entstandener Stamm ESCa38).

C Msb2 ohne Transmembranregion und cytoplasmatische Domäne (Msb2-ΔTM-C)

Plasmid pES17 wurde konstruiert, in welches zwei Stoppcodons in *MSB2* stromaufwärts der Sequenz für die Transmembrandomäne eingefügt wurden. Die dadurch kodierte Msb2-Variante enthält weder eine cytoplasmatische Domäne noch eine Transmembranregion und besteht nur noch aus 1307 Aminosäuren (Abb 3.30 C). Die für die Konstruktion benötigten Primer sind *MSB2* Stopp vor TM Hin und *MSB2* Stopp vor TM Her. Integriert wurde das Plasmid in den *LEU2* Lokus des Stammes FCCa28 (Stamm ESCa39).

D Msb2 mit Tyrosin-Austausch in cytoplasmatischer Domäne (Y1437G)

Muc1 in Säugerzellen enthält mehrere Tyrosin-Reste am Carboxyende seiner Aminosäuresequenz, die potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen (Singh und Hollingsworth, 2006). Da Msb2 ebenfalls einen Tyrosin-Rest an vorletzter Stelle in der cytoplasmatischen Domäne enthält (Position 1437 AS), wurde vermutet, dass auch dieser phosphoryliert wird. Daher wurde das Tyrosin-Codon durch Mutagenese-PCR von Plasmid pES11a gegen ein Glycin-Codon ausgetauscht (Primer Y gegen G vor2 und Y gegen G rück2) (Abb. 3.30 D). Die Integration des Plasmides erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den oben erwähnten Plasmiden (entstandener Stamm ESCa40).

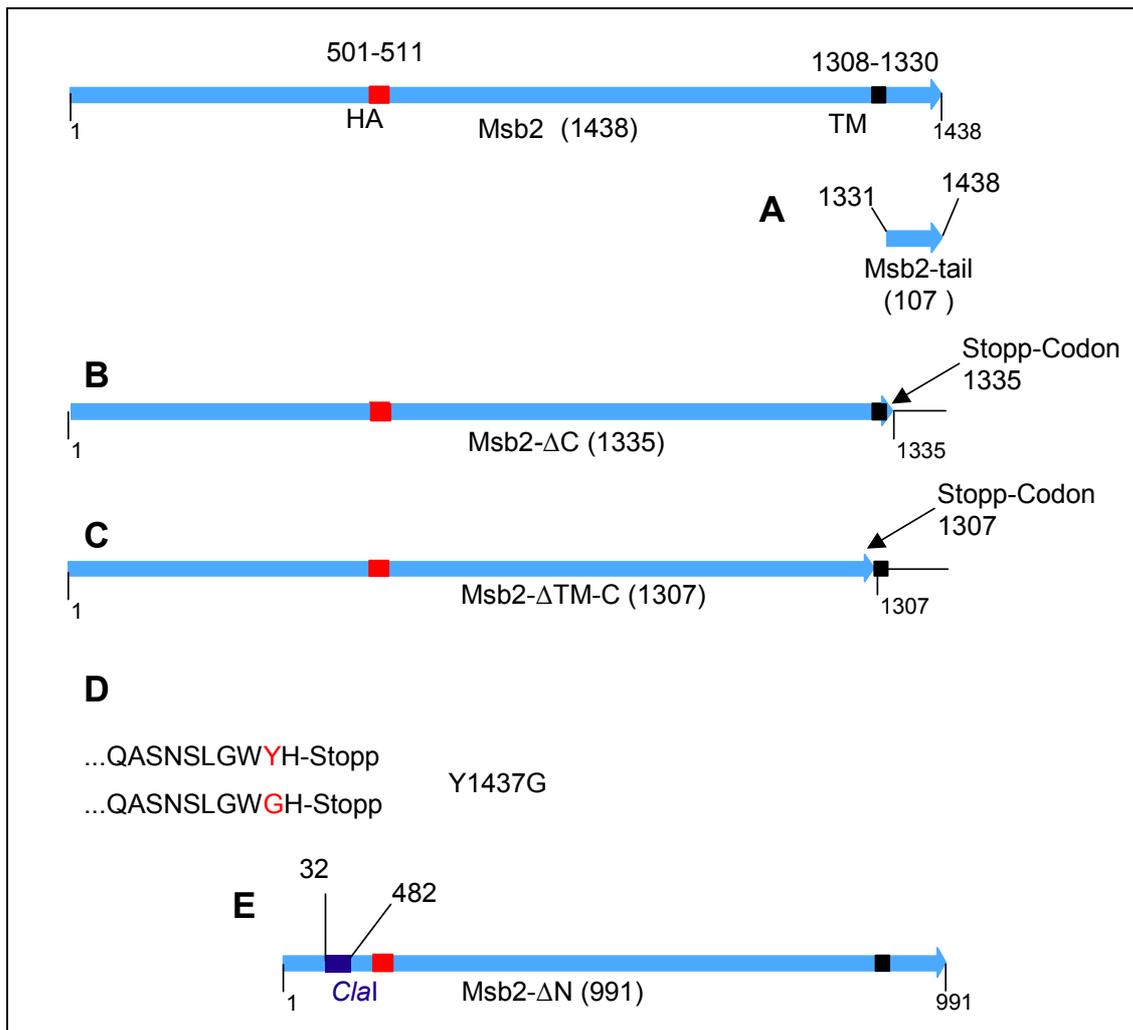
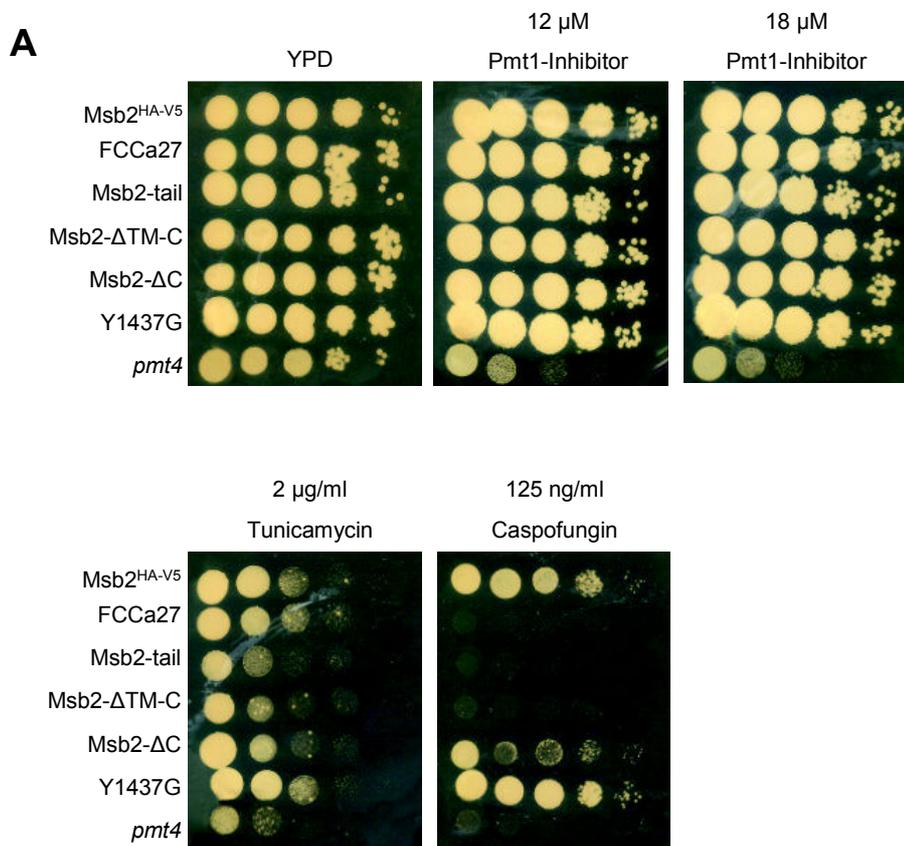


Abb. 3.30: Skizzen von Msb2-Varianten

Das Msb2-Protein (1438 AS) mit HA-Epitop (rot; 501-510) ist oben dargestellt. Die Transmembrandomäne (TM; 1290-1330) ist schwarz gekennzeichnet. Die Positionen der Aminosäuren sind angegeben. **A** Die cytoplasmatische Domäne des Msb2 (Msb2-tail) ist ein 107 AS großes Protein. **B** Das durch Mutagenese-PCR eingefügte Stoppcodon ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Transmembrandomäne ist in dieser Variante enthalten. **C** Das eingesetzte Stoppcodon liegt vor Sequenzen der Transmembrandomäne. **D** Die C-terminalen 10 Aminosäuren des Msb2-Proteins sind dargestellt. Oben ist der originale Tyrosin-Rest rot hervorgehoben, der gegen Glycin ausgetauscht wurde (unten). **E** Das Msb2-ΔN ist abgebildet. Die Aminosäuren 32 bis 482 sind deletiert und durch eine *Clal* Schnittstelle ersetzt worden. Die Beschreibung ist in Abbildung 3.22 angegeben.

3.7.2 Funktionalitäts- und Sekretionsanalysen der verschiedenen Msb2-Varianten

Nachdem Transformanten mit verschiedenen Msb2-Varianten vorlagen, konnten sie auf Msb2-Phänotypen untersucht werden. Dabei wurde die Hypheninduktion auf YPM Platten und auch die Sensitivität gegenüber Caspofungin, dem Pmt1-Inhibitor und Tunicamycin untersucht. Als Positivkontrolle diente ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}) und als Negativkontrolle FCCa27 (*msb2*). Wie auf Abbildung 3.31 A und B zu erkennen ist, kann Stamm ESCa37.1 (Msb2-tail; nur die cytoplasmatische Region) wie die *msb2*-Mutante FCCa27 keine Hyphen auf YPM Platten bilden und in Anwesenheit von Caspofungin wachsen. Die cytoplasmatische Domäne des Msb2 reicht unter diesen Bedingungen nicht aus, um die *msb2*-Mutation zu komplementieren. Stamm ESCa39.1 (Msb2- Δ TM-C; ohne Transmembrandomäne und cytoplasmatische Domäne) kann ebenfalls die *msb2*-Mutation nicht komplementieren, da er sich weder auf YPM Platten noch bei Zugabe von Caspofungin wie der Stamm ESCa3.1 verhält. Offenbar ist die Transmembrandomäne für die Funktion von Msb2 von großer Bedeutung. Fehlte jedoch nur der cytoplasmatische Bereich des Msb2 (Msb2- Δ C; Stamm ESCa38.1), so bildete der Stamm Hyphen und wuchs in Anwesenheit von Caspofungin lediglich ein wenig schwächer als der Wildtyp. Dagegen verhielt sich die Transformante mit dem Aminosäure-Austausch (Y1437G; Stamm ESCa40.1) wie der Wildtyp. Die Sekretion der Msb2-Varianten (Msb2- Δ TM-C, Msb2- Δ C und Y1408G) verhält sich wie bei dem Stamm ESCa3.1 (Abb. 3.32). Im Western-Blot wurde weder eine veränderte Laufhöhe des Proteins noch eine vermindert starke Sekretion der Msb2-Proteine festgestellt.



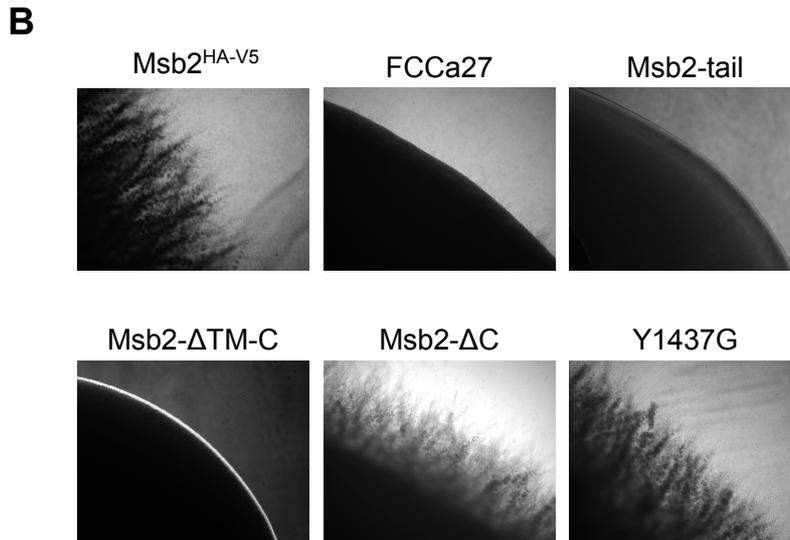


Abb. 3.31: Phänotypen von Transformanten mit verschiedenen Msb2-Varianten

A Wie in Abb. 3.6 wurde ein Verdünnungstropftest mit den Stämmen ESCa3.1 ($Msb2^{HA-V5}$), FCCa27 (*msb2*-Mutante), ESCa37.1 (*Msb2-tail*), ESCa38.1 (*Msb2-ΔC*), ESCa39.1 (*Msb2-ΔTM-C*) und ESCa40.1 (Y1437G) auf Platten mit angegebener Konzentration von Inhibitoren durchgeführt. Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur jeweils das Ergebnis von einer Transformante abgebildet ist. Verdünnungsreihe (von links nach rechts): unverdünnt, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . **B** Die gleichen Stämme wurden wie in Abb. 3.7 auf ihre Fähigkeit zu Hyphenbildung getestet. Auch in B wurde nur eine Transformante eines Stammes abgebildet, wobei zwei Weitere das gleiche Ergebnis aufwiesen.

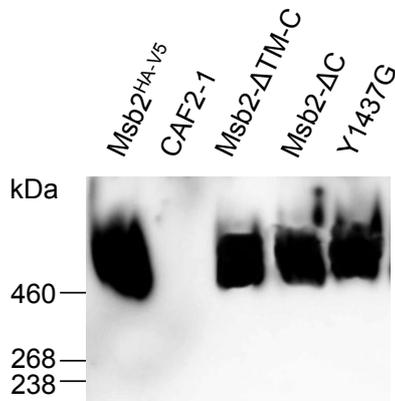


Abb. 3.32: Sekretion von Msb2 durch verschiedenen Msb2-Varianten

Die Immunoblotbedingungen waren wie in Abb. 3.8. Aufgetragen wurde 20 μ l (\approx 3,0 μ g Msb2) des Wachstumsmediums der Kulturen in der stationären Phase (\approx OD_{600} = 6,5). Es handelt sich um ein typisches Ergebnis von drei Transformanten eines Stammes, wobei nur das Ergebnis jeweils von einer Transformante abgebildet ist. Die Ergebnisse aus dem Rohextrakt und dem Medium der exponentiellen als auch stationären Phase sind gleich.

Die Sekretion des Msb2-Proteins wurde in verschiedenen Msb2-Varianten analysiert. Die Stämme ESCa3.1 ($Msb2^{HA-V5}$), CAF2-1, ESCa38.1 (*Msb2-ΔC*), ESCa39.1 (*Msb2-ΔTM-C*) und ESCa40.1 (Y1437G) wurden untersucht.

Die Tabelle 3.4 zeigt die vorläufigen Ergebnisse der Cek1-Phosphorylierung der oben erwähnten Stämme. Diese Experimente wurden im Dep. Microbiologia II, Fac. Farmacia, UCM, Madrid (J. Pla) von Dr. E. Román durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Stämme in YPD bis zur stationären Phase (Tab. 3.4; stationäre Phase) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Stämme neu inokuliert und für weitere 2 Stunden bei 37 °C in An-(+) bzw. Abwesenheit (-) vom Pmt1-Inhibitor (4 μ M) wachsen gelassen und die Cek1 Phosphorylierung analysiert.

Der Wildtyp CAF2-1 wies in der stationären Phase keine Cek1 Phosphorylierung auf (Tab. 3.4; -). Sobald die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase gelangten, wurde der Cek1 MAPK-Signalweg aktiviert und Cek1 wurde phosphoryliert (+). Bei Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors wurde Cek1 stärker phosphoryliert (++) . Die *msb2*-Mutante (ESCa7.1) zeigte dagegen keine Aktivierung der MAPK. Verglichen mit der Wildtyp-Probe, war keine Veränderung der Cek1 Phosphorylierung bei den Stämmen ESCa38.1 (Msb2- Δ C) und ESCa40.1 (Y1408G) zu sehen.

Tab. 3.4: Cek1 Phosphorylierung in verschiedenen *msb2*-Mutanten.

Die Stämme ESCa3.1 (Msb2^{HA-V5}), ESCa7.1 (*msb2*), CAF2-1, ESCa25.1 (Msb2- Δ N), ESCa37.1 (Msb2-tail), ESCa38.1 (Msb2- Δ C), ESCa39.1 (Msb2- Δ TM-C) und ESCa40.1 (Y1437G) wurden auf Cek1 Phosphorylierung in der stationären als auch exponentiellen Phase, in An- (+) und Abwesenheit (-) von Pmt1-Inhibitor (4 μ M), untersucht. + deutet auf eine „normale“ Cek1 Aktivierung hin, die wie beim Wildtyp in der exponentiellen Phase vorhanden ist. ++ deutet auf eine „verstärkte“ Cek1 Aktivierung hin, als es beim Wildtyp in der exponentiellen Phase vorhanden ist. - deutet auf eine „verringerte“ oder nicht vorhandene Cek1 Aktivierung hin, als es beim Wildtyp in der exponentiellen Phase vorhanden ist. Der Stamm ESCa25.1 (Msb2- Δ N) hat eine verstärkte Cek1 Aktivierung in der stationären Phase und der Stamm ESCa39.1 (Msb2- Δ TM-C) weist gar keine Aktivierung unter den untersuchten Bedingungen auf (gelbe Markierung). ? deutet auf ein nicht reproduzierbares Ergebnis hin.

Stamm	Stationäre Phase	Pmt1-Inhibitor (4 μ M)	
		-	+
CAF2-1	-	+	++
ESCa7.1 (<i>msb2</i>)	-	-	-
ESCa3.1 (Msb2 ^{HA-V5})	-	+	+
ESCa25.1 (Msb2- Δ N)	+	+	++
ESCa37.1 (Msb2-tail)	?	?	?
ESCa38.1 (Msb2- Δ C)	-	+	++
ESCa39.1 (Msb2- Δ TM-C)	-	-	-
ESCa40.1 (Y1437G)	-	+	++

Eine reproduzierte Aussage über den Stamm ESCa37.1 (Msb2-tail) zur Aktivierung der Cek1 MAPK konnte nicht gemacht werden. Dieser Versuch muss daher wiederholt werden.

Der Stamm ESCa39.1 (Msb2- Δ TM-C) konnte wie die *msb2*-Mutante ESCa7.1 die MAPK Cek1 in Ab- und in Anwesenheit vom Pmt1-Inhibitor nicht aktivieren. Sobald die Transmembrandomäne des Msb2 deletiert war, verlor das Msb2-Protein seine Funktion in der Signalweitergabe (Tab. 3.4), so dass weder Hyphen ausgebildet noch die Zellen in Anwesenheit von Caspofungin lebensfähig waren (Abb. 3.31 A, B). Die Sekretion des verkürzten Msb2- Δ TM-C verhielt sich unauffällig (Abb. 3.32), somit ist diese Funktion des Msb2- Δ TM-C nicht eingeschränkt.

Der Stamm ESCa25.1 (Msb2- Δ N) zeigte ebenfalls einen speziellen Phosphorylierungszustand, da Cek1 in der stationären Phase genauso stark phosphoryliert wurde, wie in der exponentiellen Phase.

3.8 Untersuchungen zu genetischen Interaktionen von *MSB2*

Zur Aktivierung des FG-Weg in *S. cerevisiae* muss das von Msb2 empfangene Signal unter Interaktion mit weiteren Proteinen, wie Cdc42, in die Signaltransduktionskette weitergeleitet werden. In diesen Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob zum einen aktiviertes Cdc42 ausreicht, um die *msb2* mutanten Phänotypen zu komplementieren und ob zum anderen Cdc42, wie das Homologe in *S. cerevisiae* mit der cytoplasmatischen Domäne des Msb2 interagiert. Weiterhin wurde überprüft, ob Überexpression von *PKC1* oder *MKC1* eine Komplementation der *msb2*-Mutation hervorbringt. Pkc1, die Proteinkinase C und Mkc1, die MAP Kinase gehören zum CWI-Signalweg in *C. albicans*, welcher die Integrität der Zellwand sicherstellt. Dadurch dass der FG Signaltransduktionsweg bei Caspofungin wie der CWI-Weg zur Kompensation u.a. den Chitin-Gehalts der Zellwand erhöht, gibt es Parallelen in beiden Wegen.

3.8.1 Untersuchungen zur Überexpression von Cdc42 und zur Interaktion von Cdc42 und Msb2

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression des *CDC42*-Gen zu einer Komplementation der *msb2* mutanten Phänotypen führen kann, wurde Plasmid pSU48, das ein Gen für die konstitutiv aktive Variante von Cdc42 (Cdc42-GTP; fehlende GTPase-Aktivität durch den Aminosäureaustausch G12V) unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors kodiert, in die *msb2*-Mutante FCCa28 transformiert. Transformanten wurden auf Msb2-Phänotypen untersucht, wobei statt Glukose, welches den *PCK1*-Promotor reprimiert, Galaktose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Transformanten waren wie die *msb2*-Mutante FCCa28 nicht in der Lage in Anwesenheit von Caspofungin zu wachsen oder Hyphen in Anwesenheit auf YPM Platten bei 37 °C auszubilden (Daten nicht gezeigt).

Die cytoplasmatische Domäne des Msb2 interagiert mit Cdc42 in *S. cerevisiae*, daher sollte diese Eigenschaft für den humanpathogenen Pilz *C. albicans* mit der Hefe-Zwei-Hybrid Methode (James *et al.*, 1996) getestet werden. Dafür wurden die Sequenzen für die cytoplasmatische Domäne des *MSB2* mit den Primern C-Tail vor (*Bam*HI) und C-Tail rück (*Bgl*II) auf genomischer DNA von CAF2-1 amplifiziert und in Plasmid pGBD-C1 integriert. Das entstandene Plasmid pGBD-C-tail kodiert für eine Fusion der Gal4-DNA Bindedomäne an dem cytoplasmatischen Bereich von Msb2 (Aminosäuren 1320 bis 1409). Gleichzeitig wurde das *CDC42* Gen mit den Primern *CDC42* vor (*Eco*RI) und *CDC42* rück (*Bgl*II) mittels genomischer PCR vervielfältigt und in Plasmid pGAD-C1 ligiert. Das entstandene Plasmid pGAD-*CDC42* kodiert für eine Fusion der Gal4-Aktivierungsdomäne an das vollständige Cdc42-Protein. Nach Sequenzierungsanalysen der beiden Plasmide pGBD-C-tail und pGAD-*CDC42* wurden sie in den *S. cerevisiae* Stamm PJ69-4A (James *et al.*, 1996) co-transformiert (Selektion auf –Leu2-Trp1 Agar-Platten). Negativkontrolle war eine Transformante, welche pGAD-C1 und pGBD-C1 (Binde- und Aktivierungsdomäne ohne Fusionsprotein) kodierte. Die Positivkontrolle war die Transformante mit 2 Plasmiden, die für bekannte interagierende Proteine kodieren (pGAD-Ino2 und pGBD-Ino4, Hoppen *et al.*, 2007). Sowohl beim X-Gal Overlay als auch beim β -Galaktosidase Flüssigassay (James *et al.*, 1996) konnte ein positives Signal bei der Positivkontrolle und ein negatives Signal bei der

Negativkontrolle erhalten werden, jedoch ergab sich keine Interaktion zwischen Cdc42 und der cytoplasmatischen Domäne von Msb2 (Daten nicht gezeigt).

3.8.2 Überexpression von Pkc1 und Mkc1

Die Plasmide pBI-Ca*PKC1* und pBI-Ca*MKC1* wurden in die *msb2*-Mutante FCCa28 transformiert. Diese Plasmide kodieren Proteine, die dem CWI-Signalweg angehören (Abschnitt 1.5); beide Gene stehen unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors, wodurch diese Gene konstitutiv transkribiert werden. Proteinkinase C (Pkc1) aktiviert das Mkc1 MAPK-Modul durch Phosphorylierung. Mkc1 (homolog zu Mpk1 aus *S. cerevisiae*) ist die MAP Kinase in dem CWI-Signalweg. Die Integrität der Zellwand wird durch diesen Signalweg sichergestellt, der durch Glukan-Defekte der Zellwand, wie z. B. in Anwesenheit von Caspofungin, induziert wird und zur Erhöhung des Chitin-Gehalts der Zellwand führt. Es sollte geprüft werden, ob bei Überaktivierung des CWI-Weges, verursacht durch Überproduktion von Pkc1 oder Mkc1 die Defekte der *msb2*-Mutante komplementiert werden können.

Transformanten wurden wie im Abschnitt 3.7.2 beschrieben, auf ihre Phänotypen getestet. Weder Transformanten mit überexprimiertem *PKC1*, noch die mit *MKC1* waren in Abwesenheit von Msb2 auf Caspofungin-haltigen Platten lebensfähig (Daten nicht gezeigt). Die Transformanten konnten genauso wenig wie die *msb2*-Mutante Hyphen auf YPM-Agar bei 37 °C ausbilden (Daten nicht gezeigt). Somit ist Msb2 trotz der Überaktivierung des CWI-Weges für die Hyphenbildung unter den oben beschriebenen Bedingungen erforderlich.

3.9 Untersuchung zur Funktion und Wirkung des sekretierten Msb2

Im Abschnitt 3.4.3 konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Msb2-Domäne in erheblicher Menge (146 µg/ml) im Medium der OD₆₀₀ = 6,0 zu finden war. Nun stellte sich die Frage, warum Msb2 in so großen Mengen produziert und nach Außen ins Medium sekretiert wird.

3.9.1 Adhäsionsuntersuchungen der *msb2*-Mutante

Es ist bekannt, dass *C. albicans* an zahlreiche Oberflächen, wie z. B. Kunststoff adhären kann (Stichernoth und Ernst, 2009). Es wurde vermutet, dass Msb2 an dieser Adhäsion beteiligt sein könnte. Der Wildtyp Stamm CAF2-1 und die *msb2*-Mutante FCCa27 (*URA3*) wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in YPD-Medium angezogen und wie in Abschnitt 2.6.11 beschrieben in 96 Well-Polystyrol-Platten pipettiert. Die Platten wurden 2 Stunden unter den jeweils gleichen Gasbedingungen inkubiert und anschließend wurden die Überstände in jedem Well verworfen, die Wells wurden vorsichtig mit PBS von nicht adhären Zellen befreit und die Zellzahl wurde durch deren metabolische Aktivität mit Hilfe der XTT-Menadion Reduktionsmethode ermittelt (Ramage *et al.*, 2001). Sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie hatten der Wildtyp Stamm CAF2-1 und die *msb2*-Mutante gleich starke Adhäsionsfähigkeiten (Daten nicht gezeigt). Somit scheint Msb2 an der Adhäsion der Zellen nicht beteiligt zu sein.

3.9.2 Untersuchung der Biofilmbildung der *msb2*-Mutante

Da Msb2 nicht an der Adhäsion an Polystyrol beteiligt ist, wurde die Biofilmbildung getestet. Die Adhäsion ist in der frühen Phase der Biofilmbildung wichtig, da dabei Zellen an die Oberfläche binden. Dieser Phase folgen jedoch weitere Entwicklungsschritte, in denen eine dreidimensionale Struktur des Biofilms gebildet wird (Douglas, 2003).

Der Wildtyp Stamm CAF2-1 und die *msb2*-Mutante FCCa27 wurden auf Polystyrol-Zellkulturplatten unter Normoxie und auch Hypoxie (0,2 % O₂ und 6 % CO₂) inkubiert, unter denen Stichernoth *et al.* (2010) eine Biofilmbildung nachweisen konnte. Anschließend wurde die Trockenmasse der gebildeten Biofilme nachgewogen (Abschnitt 2.6.10). Zwischen dem Wildtyp und der *msb2*-Mutante wurden keine signifikanten Unterschiede der Trockenmasse festgestellt (Daten nicht gezeigt). Wie bereits von Stichernoth *et al.* (2010) beschrieben war jedoch die Trockenmasse bei Hypoxie ca. dreifach geringer als bei Normoxie.

3.9.3 Inaktivierung von Histatin 5 durch Msb2

Es ist bekannt, dass antimikrobielle Peptide (AMP) eine Vielzahl an Organismen wie Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Viren, Pilze oder Protozoen bekämpfen können. AMPs werden in drei Hauptfamilien, Defensine, Histatine und Cathelicidine unterteilt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass *C. albicans* auf das antimikrobielle Peptid Histatin 5, welches sich z. B. im Speichel des Menschen befindet, sensitiv reagiert (Koshlukova *et al.*, 1999; Edgerton und Koshlukova, 2000; Komatsu *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass physiologische Konzentrationen von 15 bis 50 μM Histatin 5 ausreichen, um *C. albicans* abzutöten (Koshlukova *et al.*, 1999).

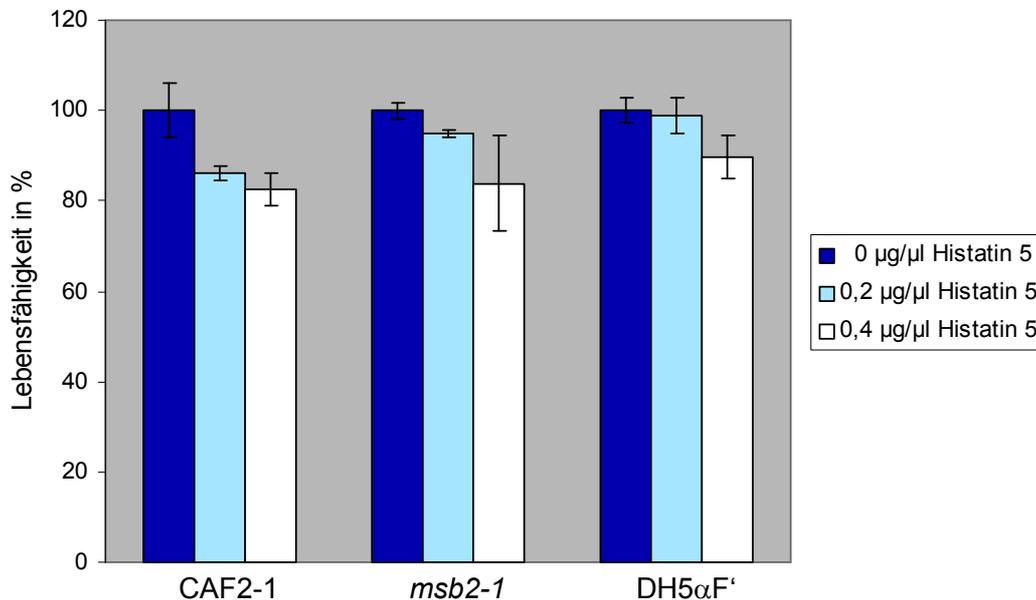


Abb. 3.33: Abwehrfunktion des Msb2 gegen Histatin 5

Die logarithmisch wachsenden Kulturen wurden mit PBS gewaschen und in eine 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde Histatin 5 in verschiedenen Konzentrationen den Kulturen zugefügt. Nach 1,5 h-langen Inkubation wurde die Lebensfähigkeit der Stämme mit der XTT-Menadion Methode untersucht. Die Lebensfähigkeit der unbehandelten Zellen (dunkelblaue Balken) wurde auf 100% gesetzt, während mit Histatin 5 behandelten Proben (hellblaue und weiße Balken) in Relation zu der Kontrollprobe von 100 % gesetzt wurden. Es wurden die Stämme *C. albicans* CAF2-1, FCCa27 (*msb2-1*) und *E. coli* DH5 α F' untersucht. Es wurde eine 3-fach Bestimmung durchgeführt und die Standardabweichung berechnet.

Um zu prüfen, ob das sekretierte Msb2 eine Rolle bei der Abwehr gegen antimikrobielle Peptide spielt, wurden der Wildtyp-Stamm CAF2-1, die *msb2-1*-Mutante FCCa27 und der *E. coli*-Stammes DH5 α F' mit Histatin 5 behandelt. Die Übernachtskultur, die entweder bei 30 °C oder 37 °C angezogen wurde, wurde in frisches YPD inokuliert und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,3$ wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension in einen Well der 96-Well-Platte hineingegeben. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an Histatin 5 (3,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ bis 400 $\text{ng}/\mu\text{l}$) zu der Zellsuspension gegeben und die Zellen 1,5 h inkubiert. Zunächst wurde die XTT-Menadion Reduktionsmethode als Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen verwendet (Ramage *et al.*, 2001). Durch Zugabe von Histatin 5 wurde nur eine geringe Zellzahl (< 20 %) sowohl im Wildtyp Stamm CAF2-1 als auch in der *msb2-1*-Mutante abgetötet (Abb. 3.33). Somit konnten mit dieser Methode die Literaturdaten nicht reproduziert werden.

In einer veränderten Versuchsdurchführung wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Bestimmung der Lebendzellzahl ermittelt. Hierbei wurde eine Übernachtskultur der Stämme CAF2-1, FCCa27 (*msb2-1*), REP18 (*msb2*) und des *E. coli* Stammes DH5 α F' in YPD bis zu der OD₆₀₀ = 0,3 angezogen. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in YPD resuspendiert, so dass die OD₆₀₀ erneut 0,3 ergab. 5 μ l dieser Zellsuspension wurde mit Histatin 5 inkubiert, wobei das Gesamtvolumen 25 μ l betrug (Abschnitt 2.6.9.3). Zu einigen Proben wurde 18 μ g des aufgereinigten Msb2-Proteins (Abschnitt 2.6.2 und 3.4.3) zugegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension 500-fach verdünnt und auf YPD Platten (*C. albicans*) bzw. LB Platten (*E. coli*) ausplattiert. Nach weiterer 24 stündiger Inkubation bei 30 °C oder 37 °C wurde die Lebensfähigkeit der *C. albicans* bzw. *E. coli* Zellen durch Auszählung der gebildeten Kolonien ermittelt („Colony Forming Units“, CFUs). Die CFU der unbehandelten Zellen wurde dabei als 100 % dargestellt, und die mit Msb2 und / oder Histatin 5 behandelten Proben in Relation dazu gestellt. Um sicher zu gehen, dass die Lösungen und die HA-Peptide, die bei der Aufreinigung des Msb2 verwendet wurden (Abschnitt 2.6.2), keine falsch-positive Wirkung hervorrufen, wurden zusätzlich nur die HA-Peptide anstatt des Msb2-Proteins zugefügt (Abb. 3.34; hellgraue bis dunkelgraue Balken). Dafür wurde genau die HA-Peptid Menge zugegeben, die für die Elution von ca. 18 μ g Msb2 benötigt wurden (10 μ l der 1 mg/ml HA-Peptid-Suspension). Es wurden zwei verschiedene *msb2*-Mutanten untersucht, denn in der *msb2*-Mutante (REP18) war der komplette *MSB2*-ORF deletiert während bei FCCa27 ein sehr großer Bereich des *MSB2* im Genom belassen wurde (Abb.3.5), der eventuell durch das Msb2-Fragment das Ergebnis beeinflussen könnte. In der Abbildung 3.34 stellen die blauen Balken die Lebensfähigkeit der unbehandelten Proben (100 %) des jeweiligen Stammes dar. Die roten Balken stellen die Zellen dar, die unter der Behandlung mit Histatin 5 überleben konnten, während weiße Balken Zellen darstellen, die sowohl mit Histatin 5 als auch mit 18 μ g Msb2 behandelt wurden. 20 % der Zellen des Stamm CAF2-1 wurden schon durch die geringste Konzentration des Histatin 5 (0,08 μ g/ μ l) abgetötet. Bei 0,2 μ g/ μ l Histatin 5 sterben schon ca. 90 % der Zellen und bei 0,4 μ g/ μ l sogar mehr als 99% ab. Wurde jedoch aufgereinigtes Msb2 den Proben zugegeben, so stieg die Lebensfähigkeit drastisch an (Abb. 3.34; weiße Balken). So kann man deutlich erkennen, dass bei gleichzeitiger Zugabe von 0,4 μ g/ μ l Histatin 5 und 18 μ g Msb2 die Lebensfähigkeit von 1 % auf 28 % stieg (CAF2-1).

Durch Zugabe der HA-Peptide (Abb. 3.34; graue Balken) wird die Lebensfähigkeit des CAF2-1 Stammes nicht positiv oder negativ beeinflusst. Vergleicht man z. B. den ersten roten Balken (Zugabe von 0,08 μ g/ μ l Histatin 5) des CAF2-1 mit dem ersten grauen Balken (Zugabe von 10 μ g HA-Peptiden), so erkennt man keine relevanten Unterschiede zwischen der Lebensfähigkeit der Zellen.

Vergleicht man die verschiedenen Stämme, so erkennt man, dass die *msb2-1*-Mutante FCCa27 und auch der *E. coli* Stamm DH5 α F' auf die gleiche Art und Weise auf Histatin 5 und Msb2 reagieren. Die *msb2-1*-Mutante FCCa27 reagierte wie CAF2-1 gleich sensitiv auf Histatin 5, und die Zellzahl stieg in Gegenwart von zugesetztem Msb2 an. Da bei FCCa27 kein nennenswerter Unterschied bezüglich der Sensitivität zu CAF2-1 vorhanden war, wurde vermutet, dass möglicherweise die komplette Deletion des *MSB2* (REP18) eine höhere Sensitivität mit sich bringen würde. Der Stamm REP18 verhält sich jedoch wie FCCa27. Die *E. coli* Zellen wiesen ebenfalls nach Zugabe des Msb2-Proteins eine erhöhte Überlebensrate in Anwesenheit des Histatin 5 auf.

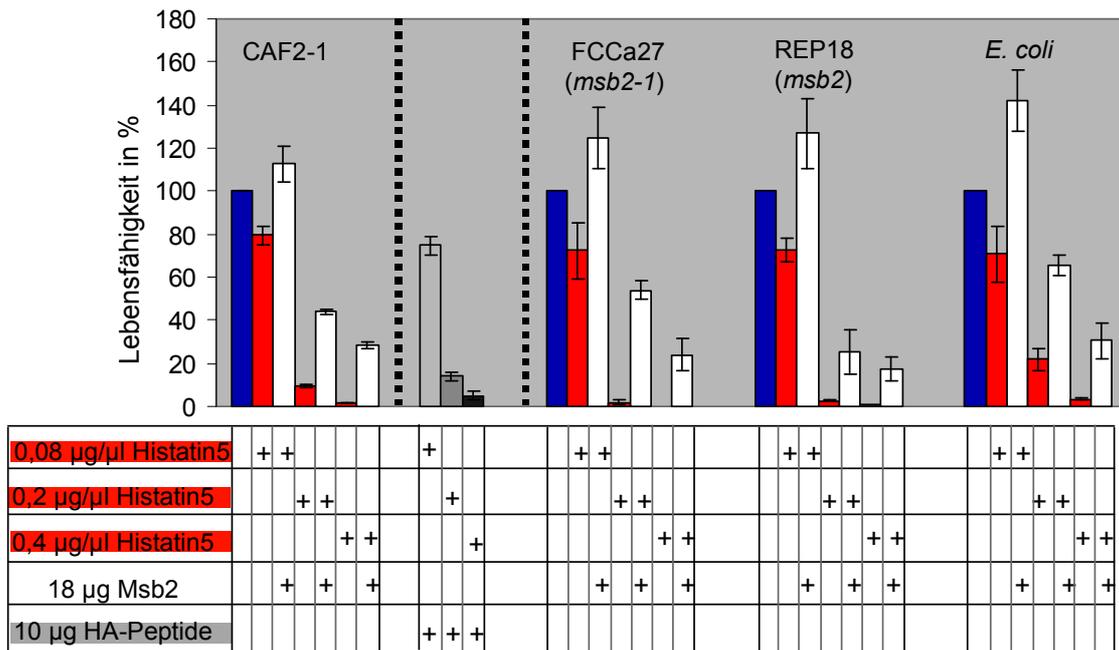


Abb. 3.34: Untersuchung auf Abwehrfunktion des Msb2 gegen Histatin 5 nach der CFU Methode

Die logarithmisch wachsenden Kulturen wurden mit PBS gewaschen. Und anschließend in YPD einer $OD_{600} = 0,3$ inokuliert. Der Zellsuspension wurde Histatin 5 in verschiedenen Konzentrationen, aufgereinigtes Msb2-Protein oder HA-Peptide beigefügt. Nach einer Inkubation wurden die Kulturen 500-fach verdünnt und auf Wachstumsplatten ausplattiert. Über Nacht wurden die Zellen wachsen gelassen und ihre Lebensfähigkeit durch Auszählen der Kolonien ermittelt. Die Lebensfähigkeit ist in % dargestellt. Die Lebensfähigkeit der unbehandelten Zellen (dunkelblaue Balken) wurde auf 100% gesetzt. Die Lebensfähigkeit der mit Histatin 5 und / oder aufgereinigtem Msb2- bzw. HA-Peptiden behandelten Proben (rote, weiße und graue Balken) wurden in Relation zu der Kontrollprobe von 100 % gesetzt. Es wurden die Stämme CAF2-1, FCCa27 (*msb2-1*), REP18 (*msb2*) und DH5 α F' untersucht.

+ = Zugabe des links aufgeführten Substrats. Es wurde eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

4 Diskussion

C. albicans ist ein humanpathogener Pilz und der bedeutendste Erreger humaner Pilzinfektionen (Hermann *et al.*, 2001). Er kommt als opportunistischer Erreger im Darm bei 30 % aller Menschen vor und ruft bei gesunden Menschen keine Symptome hervor. Bei immunsupprimierten Personen kann *C. albicans* jedoch oberflächliche aber auch lebensbedrohliche systemische Candidosen auslösen. Hierbei kann es zu einem Pilzbefall der inneren Organe kommen, welche in über 40 % der Fälle tödlich verlaufen (Wey *et al.*, 1988). Um die Organe zu befallen, verfügt *C. albicans* über mehrere Virulenzeigenschaften, insbesondere den Dimorphismus, den Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform. Mit der Ausbildung einer Hyphe ist *C. albicans* in der Lage, an Epithelzellen zu adhären und diese anschließend zu penetrieren (Odds, 1994).

Die Hyphen-Morphogenese wird u. a. durch den Filamentous growth (FG) Weg induziert. Bei diesem Signaltransduktionsweg handelt es sich um einen MAPK-Weg, dessen MAPK-Modul aus den Kinasen Ste11, Hst7 und der MAPK Cek1 besteht. Der mögliche Rezeptor in der oberen Signalmaschinerie ist das Mucin-ähnliche Protein Msb2. Msb2 ist ein stark glykosyliertes Protein mit einer Transmembrandomäne, mit der es in der Plasmamembran verankert ist. Es beinhaltet eine große extrazelluläre Domäne, welche zahlreiche Serine und Threonine enthält, an denen O-glykosylierte Zuckerketten angehängt sein können und eine kurze cytoplasmatische Region von 89 Aminosäuren.

Ziel dieser Arbeit war es, das Msb2 aus *C. albicans* mit Epitopen zu versehen, so dass sowohl die extrazelluläre Domäne als auch die cytoplasmatische Domäne markiert sind. Dadurch sollte die Lokalisation der beiden Domänen analysiert und die mögliche Sekretion des extrazellulären Msb2, so wie es in *S. cerevisiae* berichtet wurde, untersucht werden. Weiterhin sollte der Glykosylierungsstatus des Proteins, die verantwortlichen Proteinmannosyltransferasen (Pmts) und die molekulare Masse des Msb2 etabliert werden. Weiterhin sollten Struktur-Funktionsbeziehungen bei Msb2 durch eine Mutageneseanalyse untersucht werden.

4.1. Sekretion und Spaltung des CaMsb2

Msb2 bei *S. cerevisiae* wird gespalten und der extrazelluläre Bereich wird ins Wachstumsmedium sekretiert, während der cytoplasmatische Bereich innerhalb der Zelle verbleibt und in der Vakuole angereichert wird (Vadaie *et al.*, 2008). Auch das *C. albicans* Msb2 in Hefe- als auch in Hyphenform wird ins Medium sekretiert (Abschnitt 3.3). Sorgo *et al.* (2010) konnten ebenfalls nachweisen, dass Msb2 unter Standardbedingungen als auch unter hypheninduzierenden Bedingungen kontinuierlich in das Sekretom entlassen wird. Wie bei ScMsb2 wurde ausschließlich die extrazelluläre Domäne von CaMsb2 nach Außen sekretiert (Abb. 3.8), während die cytoplasmatische Domäne innerhalb der Zelle verblieb (Abb. 3.9). Das vollständige Msb2-Protein mit cytoplasmatischer und extrazellulärer Domäne konnte weder im Wachstumsmedium noch in großer Menge Zell-assoziiert nachgewiesen werden. Dieses gilt für exponentielle und stationäre Phasen (Abb. 3.10). Somit erfolgt kurz nach der Synthese des Proteins und vor der Sekretion eine Abspaltung der extrazellulären Domäne. Diese Abspaltung wurde zunächst als Aktivierung von Msb2 gedeutet (Cullen *et al.*, 2004). Die Spaltung des humanen Sensor-Mucins Muc1 erfolgt an der SEA-Domäne (Cullen, 2007). Vadaie *et al.* (2008) konnten eine Spaltungsdomäne auch in ScMsb2 identifizieren, an der die Yapsin-Aspartylprotease Yps1 Msb2 prozessiert. Das zu ScYps1 homologe Protein

in *C. albicans* ist Sap9, welches auch CaYps1 genannt wird (Gagnon-Arsenault *et al.*, 2006). Sap9 und Sap10 unterscheiden sich von den anderen Sap-Proteasen (Sap1-8) durch ihre Verankerung in der Plasmamembran mittels eines GPI-Ankers (Naglik *et al.*, 2004) und die Hydrolyse spezieller Substrate wie bei Yapsinen oder Kexinen. Die CaMsb2-Sekretion erfolgte jedoch normal bei den *sap9*-, *sap10*- und *kex2*-Mutanten (Abb. 3.26), so dass die entsprechenden Proteasen an der Spaltung des CaMsb2 nicht beteiligt sein können. Um die spaltungsverursachende Protease zu identifizieren wurde die Beeinflussung der Msb2-Sekretion durch Protease-Inhibitoren getestet (Abschnitt 3.6.2). Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen (Abb. 3.27), von Aspartylproteasen (Pepstatin A; Abb. 3.28) und von Metalloproteasen (Amastatin; Abb. 3.29) beeinflussten die Spaltung und somit die Sekretion der extrazellulären Domäne von Msb2 nicht. Die Identifizierung der Protease war bislang möglicherweise nicht erfolgreich, weil diese durch die eingesetzten Inhibitoren nicht gehemmt wurde, wie z. B. Metallo- oder Threonin-Endopeptidasen der Gruppen 3.4.24 und 25 der EC-Nomenklatur.

Weiterhin könnte die CaMsb2-Spaltung der von Muc1 in Säugerzellen statt der Spaltung in *S. cerevisiae* entsprechen. Muc1 wird durch Selbstspaltung an dem konservierten Motiv GSYYY der SEA-Domäne gespalten (Macao *et al.*, 2006; Levitin *et al.*, 2005; Ligtenberg *et al.*, 1992; Parry *et al.*, 2001). Weder in ScMsb2 noch in CaMsb2 konnte eine homologe Domäne identifiziert werden, an der Msb2 kurz nach seiner Synthese hydrolysiert wird. Trotzdem könnte die Prozessierung vom Msb2 von bekannten Protease-Inhibitoren unabhängig sein und wäre auch in *sap*- oder *kex*-Mutanten nicht verhindert (Abschnitt 3.6).

4.2 Glykosylierung des CaMsb2

Msb2 in *S. cerevisiae* ist ein mucinähnliches Protein, das an dem HOG- (high osmolarity glycerol) und FG- (filamentous growth) Signalwegen beteiligt ist. An seiner serin-threoninreichen Domäne (STR, Aminosäuren 51-950) wird es stark durch Proteinmannosyltransferasen Pmt1, Pmt2 und Pmt4 glykosyliert (Yang *et al.*, 2009). Msb2 aus *C. albicans* ist ebenfalls stark glykosyliert, wie es die durch Gelfiltration ermittelte molekulare Masse belegt, die ca. 536 kDa beträgt, während die theoretische Größe 141 kDa um 3,8 fach geringer ist (Abschnitt 3.4). CaMsb2 wird eindeutig durch Pmt1 mannosyliert (Abb. 3.21), während keine Beeinflussung der Glykosylierung in der *pmt4*-Mutante ermittelt wurde (Abb. 3.21). Diese Befunde wurden durch eine Msb2-Variante mit einer ca. 450 Aminosäuren-großen Deletion bestätigt (Abb. 3.25). Cantero *et al.* (2007) konnten jedoch sowohl in *pmt1*- als auch *pmt4*-Mutanten eine erhöhte Cek1-Phosphorylierung feststellen, so dass angenommen wurde, dass beiden Pmt-Isoformen an der CaMsb2-Glykosylierung beteiligt sind. Möglicherweise modifiziert Pmt4 nur wenige aber strukturell wichtige Serin-/Threonin-Reste von Msb2; diese Modifikation ist aber durch SDS-PAGE nicht erkennbar. Ob Pmt2 ebenfalls an der Mannosylierung involviert ist, konnte nicht analysiert werden, da eine homozygote *pmt2*-Mutante nicht lebensfähig ist. Ob Msb2 neben der O- auch eine N-Glykosylierung aufweist, wurde in *mnn9*-Mutanten, die für die Elongation der äußeren Zuckerketten verantwortlich ist, durch Deletion einzelner N-Glykosylierungsstellen und auch durch Tunicamycin Zugabe untersucht (Abschnitt 3.5.2). Außerdem wurde Msb2 mit PNGaseF behandelt, die N-Glykosylketten von Protein abspaltet. Alle Versuche führten zu keiner Veränderung der Msb2-Glykosylierung, so dass eine N-Glykosylierung des CaMsb2 unwahrscheinlich ist.

Aufgrund der starken Glykosylierung von Msb2 stellte sich der Nachweis der Proteinkonzentrationen als problematisch dar (Abschnitt 3.5.1). Die große Zuckerstruktur, die das Msb2-Protein umhüllt, verdeckt Seitenketten des Msb2, welche Komplexe mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau (Bradford Reagenz) bilden. Auch die Lowry-Proteinbestimmung ergab kein klares Ergebnis, da dabei reagierende Peptidbindungen des Proteins durch die Glykosylierung nicht zugänglich sind. Ebenso erwies sich die Proteinkonzentrationsabschätzung aus SDS-Gelen mittels Silberfärbung oder Coomassie-Färbung als problematisch, da Glutamin-, Asparaginsäure- und Cystein-Reste des Msb2, welche Komplexe mit Silberionen ausbilden, nicht frei zugänglich sind. Als Alternative wurde zur Proteinkonzentrationsabschätzung von Msb2^{HA} die immunologische Detektion des HA-Epitops verwendet (Abschnitt 3.4).

4.3 Cdc42 in *C. albicans*

Damit der FG-Weg von *S. cerevisiae* z. B. bei Nahrungsmittelmangel aktiviert werden kann, muss der Sensor Msb2 dieses Signal empfangen, mit dem Adapterprotein Sho1 interagieren (O'Rourke und Herskowitz, 1998; Cullen *et al.*, 2004) und die GTPase Cdc42 in die GTP-Form überführen. Bei *C. albicans* müssen die homologen Proteine ebenfalls miteinander interagieren, um eine Aktivierung des FG-Weges auszulösen. In Abwesenheit von CaMsb2 aber in Anwesenheit des konstitutiv aktivierten Cdc42 Proteins (Cdc42-GTP; fehlende GTPase-Aktivität durch den Aminosäureaustausch G12V) wurden die Phänotypen der *msb2*-Mutanten nicht komplementiert. Die *msb2*-Mutanten mit dem Cdc42^{G12V} konnten weder Hyphen bilden noch konnten sie in Anwesenheit von Caspofungin wachsen (Abschnitt 3.8.1). Román *et al.* (2009) konnten ebenfalls zeigen, dass Cek1 Phosphorylierung aufgrund des Msb2- und Sho1-Mangels auch in Anwesenheit des Cdc42^{G12V}-Proteins nicht stattfindet. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass für die Aktivierung des Weges sowohl Sho1, als auch Msb2 anwesend sein müssen.

Bei *S. cerevisiae* konnte mittels der Zwei-Hybrid Methode und Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden, dass Cdc42 und auch Msb2 interagieren (Cullen *et al.*, 2004). Für die Interaktion war die cytoplasmatische Domäne (Aminosäuren 1209-1306) des Msb2 notwendig. Diese Interaktion konnte in *C. albicans* nicht bestätigt werden. Cullen *et al.* (2004) fanden heraus, dass die Interaktion der cytoplasmatischen Msb2-Domäne mit dem aktivierten Cdc42^{G12V}-Protein stärker ist. Dieser Versuch soll auch für *C. albicans* Proteine noch durchgeführt werden. Da bekannt ist, dass Cdc42 durch Isoprenylierung am C-Terminus mit der Plasmamembran assoziiert (Cullen *et al.*, 2004), könnte für die Interaktionsuntersuchungen das Split-Ubiquitin System (Johnsson und Varshavsky, 1994a; 1994b; Varshavsky, 1997; Stagljar *et al.*, 1998) verwendet werden, weil mit dieser Methode Interaktionen von Membranproteinen bzw. von einem Membranprotein und einem löslichen Protein nachzuweisen sind.

4.4 Regulation durch Pkc1 und Mkc1

Die Zellwandintegrität wird durch den CWI- (Cell Wall Integrity) Weg sichergestellt. Bei *S. cerevisiae* werden Defekte in der Zellwand durch die Sensoren Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 detektiert und das Signal wird über die Proteinkinase Pkc1 bis hin zur MAPK Mpk1 weitergeleitet. Anschließend werden Gene, die für die Zellwandstruktur und -aufbau nötig sind, aktiviert. Rodicio und Heinisch (2010) konnten zeigen, dass der CWI- und der FG-Weg

in Verbindung stehen, da in einem „Screening“ nach Genen für filamentöses Wachstum drei der CWI-Sensoren (*WSC1*, *WSC2* und *MID2*) gefunden wurden (Birkaya *et al.*, 2009). Außerdem führt eine Überexpression der CWI-Sensoren zur Induktion von Genen, die dem FG-Weg angehören (*SVS1* und *PGU1*) (Roberts *et al.*, 2000). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass die Zellwandintegrität außer über den CWI-Weg auch durch den FG-Weg kontrolliert wird (Levin, 2005).

Auch bei *C. albicans* ist der CWI-Weg für die Sicherstellung einer korrekten Zellwand notwendig, denn Navarro-Garcia *et al.* (2001) konnten zeigen, dass CaPkc1 und auch die zu Mpk1 homologe MAPK CaMkc1 für die Zellwandintegrität benötigt werden. Um zu prüfen, ob zwischen dem FG- und dem CWI-Weg in *C. albicans* ebenso eine Verbindung besteht, wurde konstitutiv exprimiertes *PKC1* bzw. *MKC1* in eine *msb2*-Mutante transformiert. Obwohl die konstitutive Aktivierung oder Überexpression von *PKC1* oder *MPK1* in *S. cerevisiae* einen Defekt der *wsc1* und auch der *mid2* Mutanten unterdrücken können (Levin, 2005), konnten bei *C. albicans* die Phänotypen der *msb2*-Mutanten nicht komplementiert werden. Die Zellen konnten weder in Anwesenheit von Caspofungin wachsen noch Hyphen bilden. Birkaya *et al.* (2009) vermuten, dass in *S. cerevisiae* die Sensoren des CWI-Weges die Aktivierung des FG-Weges durch einen Mechanismus, welcher Msb2 benötigt, fördern. Es wird angenommen, dass der CWI-Weg den FG-Weg reguliert, indem die Zelloberflächenproteine beider Wege miteinander interagieren oder dass die *MSB2*-Genexpression über den CWI-Weg reguliert wird. Möglicherweise muss Msb2 auch in *C. albicans* vorhanden sein, damit der CWI-Weg den FG-Weg über Msb2 regulieren kann. Durch ein Fehlen des Msb2-Proteins können eventuell die Zelloberflächenproteine nicht miteinander interagieren bzw. kann die Genexpression des *MSB2* nicht reguliert werden, und somit kann die FG-Weg Aktivierung über den CWI-Weg nicht induziert werden.

4.5 Signaltransduktion des FG Weges durch veränderte Msb2-Sensoren

Der Cek1-Signaltransduktionsweg wird bei *C. albicans* durch Zellwanddefekte, oder Nahrungsmittelknappheit aktiviert. Dabei werden die Signale durch den Sensor Msb2 empfangen und durch Signaltransduktion über Cdc42, Cst20, Ste11, Hst7 bis zum Cek1-Protein weitergeleitet. Die MAPK Cek1 wird dabei phosphoryliert und aktiviert nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren wie Cph1. Verschiedene Msb2-Varianten wurden erstellt und ihre Fähigkeit zur Signalweitergabe-Leistung anhand der Phänotypen ermittelt. Ihre Eigenschaften werden nachfolgend zusammengefasst.

CAF2-1 (Wildtyp)

Wildtypische Zellen von Stamm CAF2-1 weisen hyphales Wachstum auf und sind in Gegenwart von Caspofungin lebensfähig (Abb. 3.31). Sie sind auch in der Lage den Cek1-Signalweg zu aktivieren. Vorläufige Daten der Universität von Madrid zeigen, dass CAF2-1 aus der stationären Phase gar keine Cek1-Phosphorylierung und Zellen in exponentieller Phase bei 37 °C eine Aktivierung des FG-Weges aufweisen (Tab. 3.4). Es ist außerdem bekannt, dass durch Zellwandstörungen, verursacht durch z. B. Congo Rot, Zymolyase oder Caspofungin, die Cek1 Aktivierung induziert wird (Román *et al.*, 2009). Kürzlich wurde ebenfalls festgestellt, dass die Cek1 Phosphorylierung in *pmt1* und *pmt4* Mutanten erhöht war (Cantero *et al.*, 2007). Diese und die Untersuchungen zur O-Glykosylierung des Msb2 im Abschnitt 3.5.3 deuten darauf hin, dass die Proteinmanosyltransferasen 1 und 4 an der Glykosylierung des Msb2 beteiligt sind und dass der Glykosylierungsdefekt des Proteins die

Cek1 Aktivierung auslöst. Durch die Zugabe des Pmt1-Inhibitors scheint sich der Cek1 Phosphorylierungslevel ebenfalls zu erhöhen (Tab. 3.4). Der Inhibitor führt zu Glykosylierungsdefekten vieler Zellwandproteine und zu veränderter Mannosylierung des Rezeptors Msb2, was die Signaltransduktionsaktivierung verstärkte. Somit deuten die vorläufigen Daten darauf hin, dass der erhöhte Cek1 Phosphorylierungszustand in Anwesenheit von Pmt1-Inhibitor eine Reaktion auf Glykosylierungsdefekte, die von Msb2 detektiert werden, sein könnte.

C-terminale Deletion in Stamm FCCa27

Normalerweise kann der Wildtyp bei Zellwanddestabilisierenden Agenzien wie Caspofungin den FG-Weg über Msb2 aktivieren und den Zellwanddefekt kompensieren. Eine *msb2*-Mutante, wie FCCa27 ist nicht in der Lage Hyphen zu bilden, in Gegenwart von Caspofungin zu wachsen (Abb. 3.31) und den FG-Weg zu aktivieren. Obwohl FCCa27 sich wie eine *msb2*-Mutante verhält, war nicht der vollständige ORF deletiert worden, sondern anstelle eines 1185 bp-großen Bereichs am 3'-Ende des *MSB2*-ORF wurde *hisG* eingesetzt (Cottier, 2007). Somit ist der Stamm FCCa27 eher eine partielle *MSB2*-Deletion als eine vollständige *msb2*-Mutante, obwohl er alle mutanten Phänotypen aufweist. Durch die 395 fehlenden C-terminalen Aminosäuren (von Position 405 bis 800) ist FCCa27 nicht mehr in der Lage Hyphen zu bilden und auf caspofunginhaltigen Platten zu wachsen. Die vorläufigen Daten aus der Arbeitsgruppe von J. Pla (Universität von Madrid) zeigen ebenfalls weder in der exponentiellen Phase noch in Gegenwart von Pmt1-Inhibitor eine Cek1 Aktivierung bei Stamm FCCa27 (Tab. 3.4), ebenso wie bei vollständiger Deletion des ORF.

Y1408G-Variante

Es wird vermutet, dass die cytoplasmatischen Region des Msb2 in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle in der Signalweitergabe spielt. So vermutet man, dass das Signal-Empfangen durch die extrazelluläre Domäne des Msb2 zur Konformationsveränderung des cytoplasmatischen Teils führt, was die Signaltransduktion aktiviert. Außerdem ist bekannt, dass das Mucin Muc1 in Säugerzellen, welches eine ähnliche Topologie und ebenfalls sensorische und signalvermittelnde Funktion aufweist, mittels seiner cytoplasmatischen Domäne an der Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist. Diese Domäne beinhaltet zahlreiche Tyrosine, die Phosphorylierungsstellen darstellen (Singh und Hollingsworth, 2006) und so die Aktivierung hervorrufen. Um zu analysieren, ob die Tyrosine der cytoplasmatischen Domäne des CaMsb2 ebenfalls phosphoryliert werden können, wurde die Aminosäure Tyrosin an der Stelle 1408 des CaMsb2 gegen Glycin ausgetauscht. Weitere Tyrosine sind in der cytoplasmatischen Domäne des CaMsb2 nicht zu finden. Der Stamm ESCa40 (Y1408G), mit dem ausgetauschten Tyrosin des Msb2, zeigte eine wildtypische Hyphenbildung, sowie wildtypisches Wachstum in Anwesenheit von Caspofungin oder Tunicamycin (Abb. 3.31), seine Sekretion ins Außenmedium unterschied sich auch nicht von der des Wildtyps. Die vorläufigen Ergebnisse zur Signaltransduktion deuten darauf hin, dass die MAPK Cek1 des Stammes ESCa40 (Y1408G) wie die von CAF2-1 phosphoryliert wird (Tab. 3.4). Somit scheint, das C-terminale Tyrosin keine nennenswerte Rolle in der Phosphorylierung der cytoplasmatischen Region des Msb2 und der Signalweiterleitung zu spielen.

Msb2-tail-Variante

Es wird vermutet, dass die cytoplasmatische Domäne des ScMsb2 sowie des CaMsb2 an der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt, aber auch, dass es in abgespaltener und somit gelöster Form in den Zellkern wandern und dort als ein Transkriptionsfaktor fungieren kann. Die cytoplasmatische Region des Muc1 in Säugerzellen kann in Kooperation mit einem Transkriptionsfaktor im Zellkern die Transkription der Zielgene beeinflussen (Singh und Hollingsworth, 2006). Um zu testen, ob die cytoplasmatische Region des CaMsb2 eine Funktion ausübt, wurde der Stamm ESCa37 (Msb2-tail), welcher nur diese Region des Msb2 besaß, auf Komplementation der *msb2*-Mutation untersucht. Obwohl vermutet wird, dass die cytoplasmatische Domäne des Msb2 sehr wichtig ist, konnte der *msb2*-Stamm mit einzig dieser Domäne des Msb2 (Msb2-tail) weder in Anwesenheit zellwanddestabilisierender Agenzien (Caspofungin) wachsen, noch in Gegenwart von Mannitol Hyphen ausbilden (Abb. 3.31). Die vorläufigen Daten der Cek1-Phosphorylierung ergaben keine Ergebnisse (Tab. 3.4). Aufgrund der vorhandenen Ergebnisse (Abb. 3.31) erscheint es, als ob die cytoplasmatische Region des CaMsb2 keine entscheidende Funktion besitzt, oder aber dass es in diesen Experimenten nicht gemessen werden konnte. Möglicherweise muss die cytoplasmatische Domäne an das vollständige Msb2 gebunden sein, um anschließend durch eine Aktivierung ausgehend von der extrazellulären Domäne, in einen phosphorylierten Zustand versetzt zu werden, um dann in abgespaltener, freier Form eine Funktion auszuüben. So wie bei Muc1 (Wreschner *et al.*, 2002), könnte ein Teil der prozessierten, löslichen Msb2-Isoformen mit dem an die Plasmamembran angebindenen Msb2 assoziieren und ein Heterodimer bilden. Dadurch könnte, wie bei Muc1 (Baruch *et al.*, 1999), die Phosphorylierung seiner eigenen cytoplasmatischen Domäne und somit die Aktivierung der Signaltransduktion erfolgen.

Msb2- Δ C-Variante

Um zu überprüfen, ob das Msb2-Protein ohne die cytoplasmatische Domäne seine Funktion tätigen kann, wurde nach der Transmembrandomäne ein Stoppcodon eingefügt, so dass das Msb2 um 104 Aminosäuren verkürzt war. Der Stamm ESCa38 (Msb2- Δ C) mit dem verkürzten Msb2- Δ C konnte sowohl in Gegenwart von Caspofungin wachsen, als auch Hyphen bilden (Abb. 3.31). Auch die Msb2- Δ C-Sekretion (Abb. 3.32) und die Cek1-Aktivierung (vorläufige Daten aus Tab. 3.4) scheinen nicht gestört zu sein. Erneut erscheint die cytoplasmatische Region unter diesen Bedingungen nicht essentiell zu sein. In *S. cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass Zellen ohne die cytoplasmatische Domäne des Msb2 defekt in der Aktivierung des FG-Weges sind (Cullen *et al.*, 2004). Tatebayashi *et al.* (2007) analysierten jedoch, dass die cytoplasmatische Domäne des Msb2 für die Aktivierung des HOG-Weges nicht zwingend notwendig ist. Sie konnten zeigen, dass durch die Interaktion des Msb2 mit Sho1, dessen cytoplasmatische Domäne für die Signalweiterleitung nicht wichtig ist. Dabei vermuteten sie, dass das Signal durch die cytoplasmatische Region des assoziierten Sho1 weitergeleitet wird. Des Weiteren konnten sie eine Sho1 Transmembrandomän-unabhängige Hog1-Aktivierung feststellen, wobei die cytoplasmatische Domäne des Msb2 unter diesen Umständen essentiell war. Die vorläufigen Ergebnisse zur Cek1-Phosphorylierung müssen verifiziert werden (Tab. 3.4), jedoch könnte die cytoplasmatische Domäne des Msb2 in *C. albicans* ebenso für die FG-Weg Aktivierung essentiell sein, wenn die cytoplasmatische Domäne des Sho1 Defekte aufweist. Somit sollte in den nächsten Experimenten der Stammmhintergrund *msb2 sho1* für die Msb2- Δ C-Variante

sein, um zu bestätigen dass das Signal ausschließlich über Msb2- Δ C weitergeleitet werden kann.

Msb2- Δ TM-C-Variante

Durch das Einfügen eines Stoppcodons vor die Transmembrandomäne verlor Msb2 (Msb2- Δ TM-C in Stamm ESCa39) seine vollständige Funktion bezüglich der Hyphenbildung und des Wachstums auf Caspofungin-enthaltenen Platten (Abb. 3.31). Die vorläufigen Ergebnisse aus Tabelle 3.4 deuten darauf hin, dass die Cek1 Aktivierung ebenfalls nicht mehr erfolgte. Das um 131 Aminosäuren verkürzte Msb2- Δ TM-C konnte jedoch wie das wildtypische Msb2 ins Medium sekretiert werden (Abb. 3.32). Vermutlich kann das cytosolische Msb2- Δ TM-C keine Umgebungssignale detektieren, weil es nicht mehr mittels der Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert ist und die extrazelluläre Domäne nach Außen sekretiert wird. Dadurch ist Msb2- Δ TM-C nicht mehr in der Lage aktiviert zu werden und das Signal zu transduzieren. Somit können die Glykosylierungsdefekte verursacht durch Caspofungin (Abb. 3.31) oder durch Pmt1-Inhibitor (Tab. 3.4) von Msb2- Δ TM-C nicht erkannt und die Signalmaschinerie nicht induziert werden.

Msb2- Δ N-Variante

Der Stamm ESCa25 (Msb2- Δ N) enthält eine Deletion zwischen der Signalsequenz und dem HA-Epitop des Msb2^{HA-V5}, so dass die Aminosäuren 32 bis 481 des 1410 Aminosäuren großen Msb2-Proteins fehlen. Der Verlust des 449 Aminosäuren-großen Bereichs führte weder zu veränderter Hyphenbildung noch zur Lebensunfähigkeit in Gegenwart von Caspofungin (Abb. 3.23, Abb. 3.24). Aufgrund der 1,3 kb-großen Deletion wurde ein kleineres Msb2- Δ N synthetisiert, welches jedoch wie das Wildtypische ins Medium sekretiert wurde (Abb. 3.25). Obwohl diese Deletion des Stammes ESCa25 ähnlich groß ist, wie die der *msb2*-Mutante FCCa27, verhielt sich der Stamm wildtypisch. Anders als beim Wildtyp deuten die vorläufigen Cek1 Aktivierungsergebnisse von ESCa25 (Msb2- Δ N) auf eine konstitutive Aktivierung der Cek1 MAPK (Tab. 3.4). Es scheint, dass der Stamm ESCa25 (Msb2- Δ N) Cek1 auch in stationärer Phase phosphoryliert, wobei der Wildtyp die FG-Aktivierung unterlässt. Die Aktivierung wird bei Zugabe des Pmt1-Inhibitors noch erhöht. Das ScMsb2 enthält eine STR-Domäne im Bereich 51 bis 950 Aminosäuren (Abschnitt 1.4.2.2.1). Die Deletion dieser Domäne des ScMsb2 führt zur Aktivierung des FG-Weges und zu Hyperaktivität des Proteins. Somit scheint diese Region eine inhibitorische Funktion zu besitzen. Es wird vermutet, dass diese Serin-, Threonin-reiche (STR) Region in ScMsb2 aufgrund ihrer starken O-Glykosylierung die aktivierende HMH-Domäne bedeckt, und so die Aktivierung des Msb2 und die damit zusammenhängende Aktivierung des FG-Weges kontrolliert. Durch Deletionen der Region oder durch Glykosylierungsdefekte wird dieser Zuckerbaum des Msb2 reduziert, so dass die HMH-Domäne zum Vorschein kommt und seine induzierende Funktion ausüben kann. Die Region 32 bis 481 des CaMsb2 scheint ebenfalls diese Funktion auszuüben, da ihre Deletion die Cek1 Phosphorylierung induziert. Ob eine HMH-Domäne im CaMsb2 vorhanden ist, kann bislang nicht belegt werden. Zunächst müsste eine Region des CaMsb2 nahe der Transmembrandomäne deletiert werden, welche sich auch in dem homologen ScMsb2 befindet (HMH: Aminosäuren 961-1117). Die Tabelle 3.4 zeigt einen erhöhten Cek1 Phosphorylierungslevel des Stammes ESCa25 (Msb2- Δ N) in Gegenwart des Pmt1-Inhibitors. Dies deutet darauf hin, dass auch der Msb2- Δ N Rezeptor den Glykosylierungsdefekt detektieren kann und durch ansteigende Cek1 Phosphorylierung darauf reagiert. Dadurch dass Msb2- Δ N in der Lage ist, trotz der

großen Deletion von 449 Aminosäuren eine FG-Weg Aktivierung zu bewerkstelligen und weil der STR-Bereich in ScMsb2 ca. 900 Aminosäuren beträgt, ist möglicherweise auch die STR-Region des CaMsb2 größer als der deletierte Bereich in Msb2- Δ N. Somit könnte der Pmt1-Inhibitor die O-Mannosylierung der restlichen STR-Domäne von Msb2- Δ N vermindern und zu verstärkter Cek1 Phosphorylierung führen (Tab. 3.4).

4.6 Msb2 als Schutzprotein vor antimikrobiellen Peptiden

In dieser Arbeit wurde ermittelt, dass das Mucin-ähnliche Msb2-Protein von *C. albicans* in das Medium sekretiert wird, unabhängig davon, ob sich der Pilz im flüssigen Medium oder auf Festmedium befindet (Abschnitt 3.3). Da sich die glykosylierte extrazelluläre Region des Msb2 in großer Menge im Medium (146 μ g/ml) anreicherte, wurde vermutet, dass Msb2, neben seiner Aufgabe als Sensor, weitere Funktionen ausüben könnte. Eine mögliche Funktion wäre in der Bildung von Biofilmen. *C. albicans* kann auf Oberflächen (Zellen, Implantaten) Biofilme bilden, d.h. eine mehrschichtige Ablage von *C. albicans* Hefe-mycellhyphen Zellen, die nur sehr schwer durch Antimykotika zu bekämpfen sind (Douglas, 2003), Kojic und Darouiche, 2004). Voraussetzung für Biofilmbildung ist die Adhäsion der Zellen. Die *msb2*-Mutante wurde mit dem wildtypischen Stamm CAF2-1 auf Adhäsionsfähigkeit und Biofilmbildung verglichen (Abschnitt 3.9.1 und 3.9.2). Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Msb2 hat somit keine signifikante Funktion in der Adhäsion an Polystyren-Oberflächen und in der Biofilmbildung.

Des Weiteres wurde vermutet, dass das sekretierte Msb2 möglicherweise die *C. albicans* Zelle vor angreifenden Substanzen, wie antimikrobiellen Peptiden (AMPs) schützt. AMPs werden von fast allen lebenden Organismen produziert, z. B. durch Bakterien, Pilze, Pflanzen und Tiere (den Hertog *et al.*, 2006). In Menschen werden sie zur Bekämpfung von Pathogenen produziert. AMPs haben alle einige charakteristische Merkmale gemein, wie eine niedrige molekulare Masse (zwischen 1 und 5 kDa), positive Ladungen und die Eigenschaft, amphipathische Sekundärstrukturen einzunehmen. Diese Merkmale ermöglichen den AMPs eine Insertion in die Membran des Zielorganismen (Van't Hof *et al.*, 2001; Hancock and Rozek, 2002). AMPs variieren aber in Sequenz und Sekundärstruktur, wobei lineare, α -helikale Peptide und Peptide mit Disulphidbrücken und β -Faltblattstruktur die verbreitetsten AMPs sind (Peschel und Sahl, 2006). Viele AMPs haben neben der membranlytischen Eigenschaft noch zusätzliche Chemokin-ähnliche Aktivitäten, welche Infektionsprozesse und eine adaptive Immunantwort aktivieren. Eine weitere Eigenschaft vieler AMPs, Lipopolysaccharide (LPS) zu binden, wird als eine wichtige Rolle in der LPS-Entgiftung während einer Infektion angesehen (Rosenfeld *et al.*, 2006). Bei Menschen befinden sich AMPs auf Schleimhäuten und Haut, und werden in drei Klassen gegliedert, Histatine, Defensine und Cathelicidine (den Hertog *et al.*, 2006).

Histatine sind antibakterielle und antifungale AMPs, die für den Menschen nicht toxisch sind und die ausschließlich in der Speicheldrüse von Menschen und höheren Primaten exprimiert werden. Histatine gehören zu einer Familie von kleinen Histidin-reichen kationischen Proteinen, von denen zwölf Mitglieder systematisch als Histatin 1 bis Histatin 12 durchnummeriert wurden. Die wichtigsten sind Histatin 1, 3 und 5, welche insgesamt 85 bis 90 % der Gesamthistatinmenge bilden. Aus verschiedenen Publikationen war bekannt, dass das antimikrobielle Peptid Histatin 5 *C. albicans* Zellen abtötet (den Hertog *et al.*, 2006; Edgerton und Koshlukova, 2000; Komatsu *et al.*, 2011). Torres *et al.* (2009) konnten außerdem eine Verbindung zwischen der Histatin 5-Konzentration und der Kolonisation von

C. albicans im Mundraum von HIV+ Patienten herstellen. Eine orale Candidiasis kann bei 47 % von HIV+-Patienten aufgrund erniedrigter Histatin 5-Werte eher ausbrechen als bei Gesunden, da ihre Histatin 5-Konzentration von 9,17 µg/ml (gesunde Probanden) auf 7,32 µg/ml (HIV+ Patienten) erniedrigt ist.

Histatin 5 wirkt „candidazid“ und „candidastatisch“ (Koshlukova *et al.*, 1999) und tötet *C. albicans* sowohl in der Hefe- als auch Hyphenform in der Konzentration 15 µM bis 30 µM ab (Raj *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1991). Histatin 5 besteht aus 24 Aminosäuren und wird proteolytisch aus Histatin 3 gespalten (32 Aminosäuren) und dann freigesetzt (Edgerton und Koshlukova, 2000). Es ist bekannt, dass dieses Peptid weder Poren noch Kanäle in die mikrobielle Plasmamembran bewirkt, da die Membranpermeabilität in Anwesenheit von Histatin 5 unverändert ist. Die Wirkungsweise des Histatin 5 ist noch nicht völlig verstanden, aber der intrazelluläre ATP-Gehalt wird drastisch reduziert (Koshlukova *et al.*, 1999). Man vermutet, dass die Translokation dieses antimikrobiellen Peptids durch das transmembrane Potential (Helmerhorst *et al.*, 1999) und durch die Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor (Edgerton *et al.*, 1998) gewährleistet wird. Somit hat Histatin 5 keinen direkten Einfluss auf die Zellwand bzw. Membran der Zellen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Msb2 *C. albicans* vor Histatin 5 schützen kann. Histatin 5 wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den Stämmen CAF2-1, FCCa27 und REP18 gegeben (Abb. 3.33 und 3.34); dabei wurden zwei verschiedene *msb2*-Mutanten überprüft, von denen Mutante FCCa27 noch ein N-terminales Msb2-Fragment produziert, dem 395 Aminosäure von G405 bis T800 des vollständigen Msb2 fehlen (Abb. 3.3), in *msb2*-Mutante REP18 ist dagegen *MSB2*-ORF komplett deletiert. Es wurde zunächst vermutet, dass die nicht deletierten *MSB2*-Bereiche des FCCa27 Stammes die Ergebnisse dieses Experiments beeinflussen könnten, jedoch waren die Überlebensraten der Stämme CAF2-1, FCCa27 und REP18 bei Zugabe von Histatin 5 sehr ähnlich. So überlebten zwischen 79 % und 72 % der Zellen aller Stämme bei Zugabe von 0,08 µg/µl Histatin 5 und nur noch 0,5 % bis 1 % der Zellen bei Zugabe von 0,4 µg/µl des Peptids. Somit beeinflusst die Anwesenheit von Msb2 die Sensitivität gegenüber Histatin 5 nicht. Andererseits führt die Zugabe des aufgereinigten Msb2 (18 µg) mit Histatin 5 zu einer drastisch gesteigerten Überlebensrate, die sich bei Zugabe von 0,4 µg/µl Histatin 5 und Msb2 (18 µg) von ca. 1 % auf 18 % bis 28 % erhöht. Dieses Ergebnis zeigt, dass Msb2 die Zellen gegen Histatin 5 schützt. In diesem Experiment (bei 10 µg Histatin 5 und 18 µg Msb2) betrug das molekulare Verhältnis ca. 90 Moleküle Histatin 5 auf ein Msb2-Molekül. Obwohl daher ein großer molarer Überschuss an Histatin 5 vorlag, konnte Msb2 die vielen Histatin 5-Moleküle inaktivieren bzw. von *C. albicans* fern halten.

Ein weiteres antimikrobielles Peptid LL-37 wurde in gleicher Weise untersucht. LL-37 ist das einzige Mitglied aus der Gruppe der Cathelicidine im Menschen und entsteht durch Proteolyse des Vorläuferpeptids hCAP18. Es ist ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort und wird hauptsächlich in Immunzellen produziert. Neben der antimikrobiellen Eigenschaft ist LL-37 auch an Apoptose körpereigener Zellen beteiligt. Anders als beim Histatin 5 ergab sich eine erhöhte Sensitivität der *msb2*-Mutante FCCa27 (M. Swidergall persönliche Mitteilung). Somit war die Sterberate der *msb2*-Mutante höher in Anwesenheit von LL-37 als beim Wildtyp. Das LL-37 Peptid assoziiert mit der Membran von *C. albicans* und bewirkt die Auflösung der Membran in Vesikel-ähnliche Strukturen, was zum Ausströmen von zellulären Komponenten und zum Zelltod führt (den Hertog *et al.*, 2006). Wie Cottier (2007) feststellen konnte, haben *msb2*-Mutanten in der Zellwand einen erhöhten Anteil an Chitin und β1,3-Glukan, aber einen niedrigeren β1,6-Glukan Anteil. Auch bei S.

cerevisiae ist der Chitin-Gehalt in *msb2*-Mutanten erhöht (Imai *et al.*, 2005; Popolo *et al.*, 2001). Die Veränderung der Zellwand äußert sich in erhöhter Sensitivität der *msb2*-Mutante gegen Zellwand-destabilisierende Agenzien wie Caspofungin. Wahrscheinlich führt die veränderte Zusammensetzung der Zellwand von *msb2*-Mutanten zu einer erhöhten Sensitivität für LL-37, z. B. durch erhöhte Durchlässigkeit.

Möglicherweise wird das extrazelluläre Msb2 von *C. albicans* im Medium angereichert und bildet eine Hülle um die Pilzzellen und -kolonien. Durch die starke Glykosylierung der extrazellulären Domäne des Msb2 könnte eine Art „Gallerte“ / „Barriere“ gebildet werden, die durch AMPs schwer zu durchdringen ist. Diese Hülle kann nun eine schützende Funktion ausüben, die z. B. die Zellen vor Histatin 5 bewahrt. Alternativ könnte das Msb2-Protein direkt an Zellen binden und so ebenfalls die AMPs von den Zellen fernhalten. Eine weitere Möglichkeit ist das Abfangen der AMPs durch Msb2. Durch die Zugabe des Msb2 konnte die Überlebensrate der Zellen, trotz eines großen molaren Überschusses an Histatin 5 (ca. 90-fach) erhöht werden, so dass Msb2 möglicherweise zahlreiche Bindestellen für verschiedene AMPs besitzt.

Als ein weiteres mögliches antimikrobielles Peptid wurde das Amyloid β -Protein ($A\beta$) verwendet. $A\beta$ wird als der Schlüssel-Mediator der Alzheimer-Krankheit angesehen, welches zunächst als ein zufälliges Beiprodukt ohne normale physiologische Wirkung angesehen wurde. Lange blieb eine Funktion des $A\beta$ unbekannt, bis man dem $A\beta$ proinflammatorische Aktivität zuweisen konnte. Soccia *et al.* (2010) konnten beweisen, dass $A\beta$ ein unerkanntes antimikrobielles Peptid des angeborenen Immunsystems war, welches gegen 8 klinisch relevante Mikroorganismen aktiv ist, einschließlich *Streptococcus pneumoniae* und *C. albicans*. Diese beschriebene antimikrobielle Wirkung des $A\beta$ konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Weder *C. albicans* noch *E. coli* wurde durch die Anwesenheit des $A\beta$ (sogar bei einer 4-fachen Konzentration des MIC Wertes) abgetötet.

4.7 Msb2, das multitasking-fähige Protein

Vermutlich hat Msb2 mehrere Funktionen, einerseits die sensorisch signalgebende Tätigkeit (Abschnitt 3.9 und 4.5) und andererseits eine Schutzfunktion (Abschnitt 4.6), welches die Zelle u.a. vor antimikrobiellen Peptiden schützt (Abschnitt 3.9.3). Wie in dem Diagramm 3.34 zu erkennen ist, wird *C. albicans* in Anwesenheit des antimikrobiellen Peptids Histatin 5 abgetötet. Durch die zusätzliche Anwesenheit von Msb2 im Medium steigt die Lebensfähigkeit der Zellen stark an. Zum einen (Abb. 4.1) fungiert das komplette, nicht-prozessierte Msb2 als ein Sensor an der Plasmamembran und detektiert Veränderungen / Defekte der Zellwand, kann Nahrungsmittelknappheit erfassen und an die Signalkaskade weiterleiten. Und zum anderen (Abb. 4.1) wird Msb2 kontinuierlich von *C. albicans* Kolonien gespalten und nach Außen sekretiert. Im Außenmedium bilden möglicherweise die einzelnen extrazellulären Msb2-Einheiten eine Schicht, die wie eine Gallerte die einzelnen Hefezellen oder Kolonien umhüllt und vor Histatin 5 oder LL-37 schützt. Sekretiertes Msb2 könnte auch durch direkte AMP-Bindung die Wirkung von z. B. Histatin 5 herabsetzen.

Das so „abgefangene“ Histatin 5 könnte seine antimikrobielle Funktion nicht ausüben. Eine weitere mögliche Funktion des sekretierten Msb2 könnte sein, dass es mit der Zelle interagiert und so die Interaktionsstellen von z. B. Histatin 5 besetzt (Abb. 4.1). Somit könnten durch Anwesenheit von Msb2 im Medium *C. albicans* Kolonien geschützt werden. Es wird vermutet, dass die cytoplasmatische Domäne des ScMsb2 sowie des CaMsb2 ebenfalls eine besondere Funktion ausübt, jedoch wurden dafür in *S. cerevisiae* wie in *C. albicans* keine Indizien gefunden.

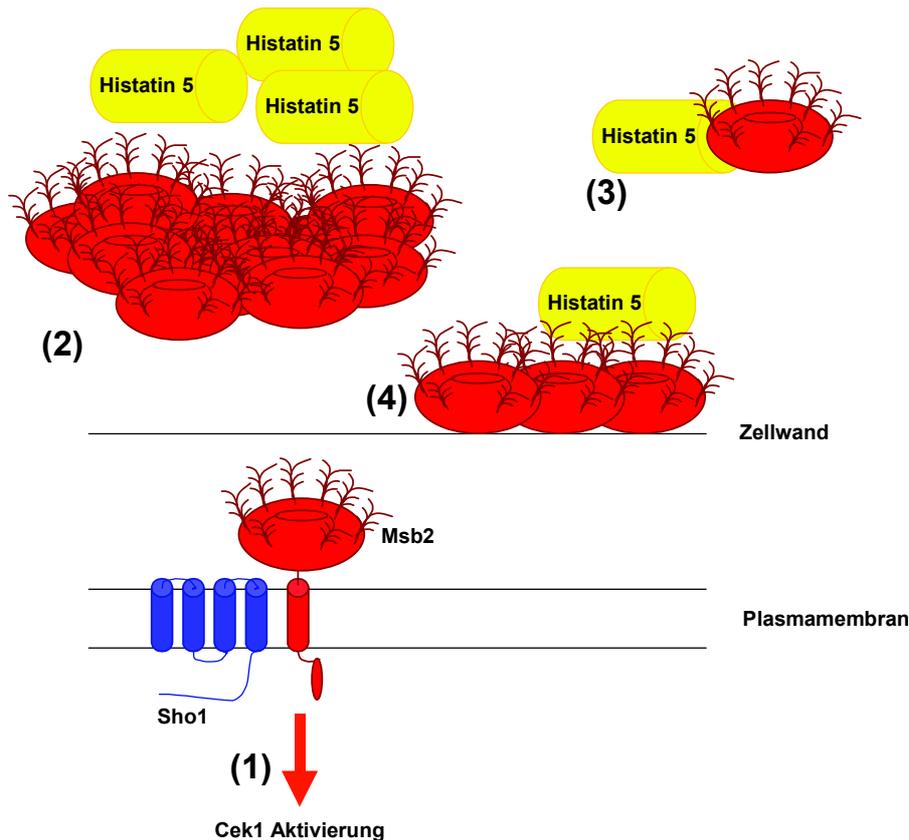


Abb. 4.1: Verschiedene Funktionen des CaMsb2

Msb2 (rot) interagiert mit Sho1 (blau), und kann bei Zellwandschäden oder Nahrungsmittelmangel den FG-Weg aktivieren (1). Zusätzlich kann die extrazelluläre Domäne von Msb2 kontinuierlich nach Außen sekretiert werden, wo es möglicherweise eine Gallert-artige Schicht um die Kolonie bildet und so die Zellen vor Angriffen des angeborenen Immunsystems, wie des Histatin 5 (gelb), schützt (2). Als ein weiterer Schutzmechanismus könnte Msb2 direkt mit Histatin 5 interagieren und so das AMP abfangen (3). Msb2 könnte ebenfalls direkt die Zelle binden und so die Bindestellen für das Histatin 5 absättigen (4).

5 Zusammenfassung

Die Virulenz des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* hängt von der Fähigkeit ab, seine Zellstruktur an Umgebungsbedingungen anzupassen. Das Typl-Membranprotein Msb2 in der Cytoplasmamembran von *C. albicans* ist für die Hyphenbildung und den Erhalt der Zellwand verantwortlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Msb2 biochemisch und funktionell charakterisiert, wobei insbesondere seine posttranslationale Modifikationen und das Sekretionsverhalten untersucht wurden.

C. albicans-Stämme wurden konstruiert, die für eine Msb2-Variante kodieren, in der die große N-terminale extrazelluläre Domäne mit einem HA-Epitop und die kleine C-terminale cytoplasmatische Domäne mit einem V5-Epitop markiert sind. Analysen des produzierten Msb2 ergaben, dass die extrazelluläre Domäne quantitativ abgespalten und ins Medium sekretiert wird, während die cytoplasmatische Domäne in der Zelle verbleibt. Yapsin-ähnliche Proteasen Sap9 und Sap10 sind an der Msb2-Spaltung nicht beteiligt. Mittels Gelfiltrationschromatographie wurde die molekulare Masse der sekretierten Msb2-Domäne mit 470 - 610 kDa ermittelt (theoretischer Wert 132 kDa). Der hohe Serin- und Threonin-Gehalt (43 %) in der extrazellulären Domäne wies auf eine hohe O-Glykosylierung hin, die durch chemische Behandlung mit Trifluoromethansulfonsäure entfernt und somit bestätigt wurde. Durch Untersuchungen verschiedener *C. albicans*-Mutanten konnte festgestellt werden, dass die Proteinmannosyltransferase Pmt1 für die O-Glykosylierung von Msb2 teilweise verantwortlich ist. Obwohl Msb2 5 potentielle N-Glykosylierungsstellen beinhaltet, scheint das Protein nicht oder nur in geringem Maße N-glykosyliert zu sein.

Struktur-Funktionsuntersuchungen ergaben, dass die cytoplasmatische Msb2-Domäne für die Funktion von Msb2 entbehrlich ist. Zusätzliche Deletion der Transmembranregion führte dagegen zum vollständigen Funktionsverlust. Überraschenderweise war eine Msb2-Variante mit einer N-terminalen Deletion von 450 AS innerhalb der extrazellulären Region voll funktionstüchtig. Da diese Msb2-Variante, die stromabwärts von Msb2 agierende MAP Kinase Cek1 möglicherweise konstitutiv aktiviert, könnte der deletierte Bereich vermutlich eine Regulationsfunktion haben und eine aktivierende Msb2-Region in Abhängigkeit von seinem Glykosylierungsstatus verdecken und regulieren.

Im Rahmen einer normalen Immunantwort des Menschen auf eine mikrobielle Infektion werden verschiedene antimikrobielle Peptide produziert, die Pathogene wie *C. albicans* abtöten können. Überraschend zeigte sich, dass die sekretierte extrazelluläre Msb2-Domäne als Schutzprotein gegen das antimikrobielle Peptid Histatin 5 fungiert. In Gegenwart des Histatin 5 stieg die Lebensfähigkeit der Zellen stark an, wenn die gereinigte extrazelluläre Msb2-Domäne zugegeben wurde. Das Msb2-Protein übernimmt somit mehrere voneinander unabhängige Funktionen, da es zum einen die Zellwand-Integrität und die Filamentbildung steuert und zum anderen als Schutzprotein gegen antimikrobielle Peptide dient.

6 Summary

Virulence of the human fungal pathogenic *C. albicans* depends on the ability to adapt its cell structure to environmental conditions. The type I membrane protein Msb2 in the cytoplasmic membrane of *C. albicans* is responsible for hypha formation and integrity of the cell wall. Within the scope of this dissertation Msb2 was characterized biochemically and functionally focusing on its posttranslational modifications and secretion.

C. albicans strains were constructed that code for a Msb2 variant, in which the large N-terminal extracellular domain is tagged with an HA-epitope and the small C-terminal cytoplasmic domain is tagged with a V5-epitope. Analysis of the produced Msb2 protein showed that the extracellular domain was quantitatively cleaved and secreted into the media, while the cytoplasmic domain remained in the cell. Yapsin-like proteases Sap9 and Sap10 were not involved in Msb2 cleavage. By gel filtration chromatography the molecular mass of the secreted Msb2 domain was determined as 470 - 610 kDa (theoretical value 132 kDa). High serine and threonine content (43%) of the extracellular domain suggested a high level of O-glycosylation, which was removed by chemical treatment with trifluoromethanesulfonic acid and thereby confirmed. Analyses of different *C. albicans* mutants revealed that the proteinmannosyltransferase Pmt1 is partially responsible for the O-glycosylation of Msb2. Although Msb2 contains 5 potential N-glycosylation sites the protein is not or not significantly N-glycosylated.

Structure-function studies showed that the cytoplasmic Msb2 domain is not essential for the function of Msb2. In contrast, additional deletion of the transmembrane region led to a complete loss of function. Surprisingly, a Msb2 variant protein with a N-terminal deletion of 450 amino acids within the extracellular region was fully functional. Because this Msb2 variant is probably able to activate the MAP Kinase Cek1, which operates downstream of Msb2, the deleted region could have a regulatory function to regulate an activating Msb2 region depending on its state of glycosylation.

Within the scope of a normal human immune response to a microbial infection several antimicrobial peptides are produced, which kill pathogens including *C. albicans*. Unexpectedly, the secreted extracellular Msb2 domain acted as a protective protein against the antimicrobial peptide histatin 5. In the presence of the histatin 5 the viability of the cells increased strongly, if the purified extracellular Msb2 domain was added. Therefore, the Msb2 protein assumes several independent functions, because on the one hand it controls cell wall integrity and hypha formation and on the other hand it serves as a protective protein against antimicrobial peptides.

7 Literatur

- Agrawal, B., Gendler, S.J., Longenecker, B.M. (1998) The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today* **4**: 397–403.
- Agrawal, B., Krantz, M.J., Reddish, M.A., Longenecker, B.M. (1998) Cancer-associated MUC1mucin inhibits human T-cell proliferation which is reversible by IL-2. *Nat Med* **4**: 43-9.
- Agrawal, B., Longenecker, B.M. (2005) MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. *Int Immunol* **17**: 391-9.
- Allen, A. und Carroll, N.J. (1985) Adherent and soluble mucus in the stomach and duodenum. *Dig Dis Sci* **30**: 55-62.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. und Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 4-8.
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., Cardenas, M.E. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**: 57-69.
- Bardwell, L. (2004) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **25**: 1465–1476.
- Bardwell, L. (2006) Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem Soc Trans* **34**: 837–841.
- Barry, G.D., Le, G.T., Fairlie, D.P. (2006) Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). *Curr Med Chem* **13**: 243-65.
- Barsyte-Lovejoy, D., Galanis, A., Sharrocks, A.D. (2002) Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J Biol Chem* **277**: 9896-903.
- Baruch, A., Hartmann, M., Yoeli, M., Adereth, Y., Greenstein, S., Stadler, Y., Skornik, Y., Zaretsky, J., Smorodinsky, N.I., Keydar, I., Wreschner, D.H. (1999) The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res* **59**: 1552–1561.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., Herrero, E. (2001) Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **39**: 1022–1035.
- Berk, A.J. und Sharp, P.A. (1978) Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* **14**: 695–711.
- Bhattacharyya, R.P., Remenyi, A., Yeh, B.J., Lim, W.A. (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem* **75**: 655–680.
- Bilsland-Marchesan, E., Arin˜o, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., Posas, F. (2000) Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **20**: 3887–3895.
- Birkaya, B., Maddi, A., Joshi, J., Free, S.J., Cullen, P.J. (2009) Role of the cell wall integrity and filamentous growth mitogen-activated protein kinase pathways in cell wall remodeling during filamentous growth. *Eukaryot Cell* **8**: 1118-33.
- Bland, C.E., Kimberly, P., Rand, M.D. (2003) Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J Biol Chem* **278**: 13607-10.
- Bonilla, M. und Cunningham, K.W. (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* **14**: 4296–4305.

- Bork, P. und Patthy, L. (1995) The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci* **4**: 1421–1425.
- Borneman, A.R., Gianoulis, T.A., Zhang, Z.D., Yu, H., Rozowsky, J., Seringhaus, M.R., Wang, L.Y., Gerstein, M., Snyder, M. (2007) Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**: 815–819.
- Boshell, M., Lalani, E.-N., Pemberton, L., Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J. (1992) The product of the human *MUC1* gene when secreted by mouse cells transfected with the full-length cDNA lacks the cytoplasmic tail. *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 1–8.
- Bourbonnais, Y., Larouche, C., Tremblay, G.M. (2000) Production of full-length human pre-elafin, an elastase specific inhibitor, from yeast requires the absence of a functional yapsin 1 (Yps1p) endoprotease. *Protein Expr Purif* **20**: 485 – 491.
- Bray, S. (2000) Notch. *Curr Biol* **10**: R433-5.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760–1763.
- Brewster, J.L., Gustin, M.C. (1994) Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a MAP kinase pathway. *Yeast* **10**: 425-39.
- Butty, A.C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J.E., Hofmann, K., Zwahlen, C., Peter, M. (2002) A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J* **21**: 1565-76.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., Calderone, R. (2000) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518–525.
- Cantero, P.D. (2010) Proteinglykosylierung bei *Candida albicans*: Regulatorische Signalwege und Virulenzeigenschaften. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Cantero, P.D., Ernst, J.F. (2011) Damage to the glycoshield activates *PMT*-directed O-mannosylation via the *Msb2-Cek1* pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **80**: 715-25.
- Cantero, P.D., Lengsfeld, M., Subanovic, E., Román, J. Pla, J. Ernst, J.F. (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **64**: 1115–1128.
- Carlstedt, I., Herrmann, A., Hovenberg, H., Lindell, G., Nordman, H., Wickström, C., Davies, J.R. (1995) 'Soluble' and 'insoluble' mucins-identification of distinct populations. *Biochem Soc Trans* **23**: 845-851.
- Carraway, K.L., Perez, A., Idris, N., Jepson, S., Arango, M., Komatsu, M., Haq, B., Price-Schiavi, S.A., Zhang, J., Carraway, C.A.C. (2002) Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. *Prog Nucleic Acids Res Molec Biol* **71**: 149–185.
- Carraway, K.L., Ramsauer, V.P., Haq, B., Carothers Carraway, C.A. (2003) Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* **25**: 66–71.
- Carraway KL, Ramsauer VP, Carraway CA. (2005). Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs. *J Cell Biochem* **96**: 914-26.
- Chen, R.E. und Thorner, J. (2007) Function and regulation in MAPK signalling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1311–1340.
- Cheng, J., Randall, A.Z., Sweredoski, MJ, Baldi P. (2005). SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res* **33**: W72-6.
- Choudhury, A., Moniaux, N., Winpenny, J.P., Hollingsworth, M.A., Aubert, J.P., Batra, S.K. (2000) Human MUC4 mucin cDNA and its variants in pancreatic carcinoma. *J Biochem* **128**: 233-43.

- Cohen, T.J., Mallory, M.J., Strich, R., Yao, T.-P. (2008) Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryot Cell* **7**: 1191–1199.
- Cottier, F. (2007) Roles of Msb2p and other putative sensors in environmental responses of *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., 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.
- Cullen, P.J. (2007) Signaling mucins: the new kids on the MAPK block. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**: 241-57.
- Cullen, P. J., Sabbagh, W., Jr., Graham, E., Irick, M. M., van Olden, E. K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague, G. F., Jr. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.* **18**, 1695–1708.
- Cullen, P.J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B.J., Jigami, Y., Sprague, G.F. (2000) Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005–1018.
- Cullen, P.J. und Sprague, G.F., Jr. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13619–13624.
- Davenport, K.D., Williams, K.E., Ullmann, B.D., Gustin, M.C. (1999) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathways by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**: 1091–1103.
- de Nadal, E., Alepuz, P.M., Posas, F. (2002) Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**: 735–740.
- den Hertog, A.L., van Marle, J., Veerman, E.C., Valentijn-Benz, M., Nazmi, K., Kalay, H., Grün, C.H., Van't Hof, W., Bolscher, J.G., Nieuw Amerongen, A.V. (2006) The human cathelicidin peptide LL-37 and truncated variants induce segregation of lipids and proteins in the plasma membrane of *Candida albicans*. *Biol Chem* **387**: 1495-502.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., Klis, F.M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Sit2/Mpk1 MAP kinase and in a Sit2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146**: 2121–2132.
- Dohlman, H.G. und Slessareva, J.E. (2006) Pheromone signaling pathways in yeast. *Sci STKE* **2006**: cm6.
- Dohlman, H.G. und Thorner, J.W. (2001) Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: Paradigms and principles. *Annu Rev Biochem* **70**: 703–754.
- Douglas, L.J. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30-36.
- Dwek, R.A. (1996) Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev* **96**: 683-720.
- Ecker, M., Vrsa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S., Tanner, W. (2003) O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep* **4**: 628-632.
- Edgerton, M., Koshlukova, S.E. (2000) Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res* **14**: 16-21.
- Edgerton, M., Koshlukova, S.E., Lo, T.E., Chrzan, B.G., Straubinger, R.M., Raj, P.A. (1998) Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 20438–47.

- Eisman, B., Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D., Nombela, C., Pla, J. (2006) The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347–358.
- Elion, E.A. (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 573–581.
- Enloe, B., Diamond, A., Mitchell, A.P. (2000) A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**: 5730–5736.
- Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K., Matsumoto, K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Reprod Dev* **42**: 477–485.
- Escote, X., Zapater, M., Clotet, J., Posas, F. (2004) Hog1 mediates cellcycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biol* **6**: 997–1002
- Gagnon-Arsenault, I., Tremblay, J., Bourbonnais, Y. (2006) Fungal yapsins and cell wall: a unique family of aspartic peptidases for a distinctive cellular function. *FEMS Yeast Res* **6**: 966–78.
- Gemmill, T.R. und Trimble, R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 227–237.
- Gendler, S.J., Burchell, J.M., Duhig, T., Lamport, D., White, R., Parker, M., Taylor-Papadimitriou, J. (1987) Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6060–6064.
- Gendler, S.J. und Spicer, A.P. (1995) Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* **57** : 607–634.
- Gentsch, M., und W. Tanner (1996). The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J* **15**: 5752–5759.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**: 1077–1090.
- Girrbach, V. und Strahl, S. (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyl transferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**: 12554–12562
- Goulart, L.R., Vieira, G.S., Martelli, L., Inácio, J., Goulart, I.M., Franco, J.G. Jr. (2004) Is *MUC1* polymorphism associated with female infertility? *Reprod Biomed Online* **8**: 477–82.
- Gupta, R. und Jentoft, N. (1989) Subunit structure of porcine submaxillary mucin. *Biochemistry* **28**: 6114–6121
- Hall, J.P., Cherkasova, V., Elion, E.A., Gustin, M.C., Winter, E. (1996) The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a *FUS3* mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol* **16**: 6715–6723.
- Hamdan, M., Galvani, M., Righetti, P.G. (2001) Monitoring 2-D gel-induced modifications of proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **20**: 121–41.
- Hancock, R.E.W. and Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 143–149.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**: 671–680.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364–9.
- Helmerhorst, E.J., Breeuwer, P., van't Hof, W., Walgreen-Weterings, E., Oomen, L.C., Veerman, E.C., Amerongen, A.V., Abee, T. (1999) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* **274**: 7286–91.

- Hersen, P., McClean, M.N., Mahadevan, L., Ramanathan, S. (2008) Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7165-7170.
- Hiller, E., Heine, S., Brunner, H., Rupp, S. (2007) *Candida albicans* Sun41p, a putative glycosidase, is involved in morphogenesis, cell wall biogenesis, and biofilm formation. *Eukaryot Cell* **6**: 2056-2065.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Hollingsworth, M.A. und Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**: 45-60.
- Hukill, P.B. und Vidone, R.A. (1965) Histochemistry of mucus and other polysaccharides in tumors. I. Carcinoma of the bladder. *Lab Invest* **14**: 1624-1635.
- Hutzler, J., Schmid, M., Bernard, T., Henrissat, B., Strahl, S. (2007) Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7827-7832
- Imai K, Noda Y, Adachi H, Yoda K. (2005). A novel endoplasmic reticulum membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 8275-84
- Ingvarsson, P.K. (2007) Gene expression and protein length influence codon usage and rates of sequence evolution in *Populus tremula*. *Mol Biol Evol* **24**: 836-844.
- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A.G., Mattison, C., Ota, I. (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* **272**: 17749-17755.
- Jansen, G., Buhning, F., Hollenberg, C. P. and Ramezani Rad, M. (2001) Mutations in the SAM domain of *STE50* differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genom* **265**: 102-117.
- Jin, Y., Weining, S., Nevo, E. (2005) A MAPK gene from Dead Sea fungus confers stress tolerance to lithium salt and freezing-thawing: Prospects for saline agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18992-18997.
- Johnson, D.I. (1999) Cdc 42, An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 54-105.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994a) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10340-4.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994b) Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J* **13**: 2686-98.
- Karnoub, A.E., Worthyake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J., Der, C.J. (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol* **8**: 1037-41.
- Kirkbride, H.J., Bolscher, J.G., Nazmi, K., Vinall, L.E., Nash, M.W., Moss, F.M., Mitchell, D.M., Swallow, D.M. (2001) Genetic polymorphism of *MUC7*: allele frequencies and association with asthma. *Eur J Hum Genet* **9**: 347-54.
- Klis, F.M., Sosinska, G.J., de Groot, P.W., Brul, S. (2009) Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res* **9**: 1013-1028.
- Kojic, E.M., Darouiche, R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-67.
- Komatsu, M., Arango, M.E., Carraway, K.L. (2002) Synthesis and secretion of Muc4/sialomucin complex: implication of intracellular proteolysis. *Biochem J* **368**: 41-8.

- Komatsu, M., Jepson, S., Arango, M.E., Carothers Carraway, C.A., Carraway, K.L. (2001) Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene* **20**: 461–470.
- Komatsu, T., Salih, E., Helmerhorst, E.J., Offner, G.D., Oppenheim, F.G. (2011) Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *Proteome Res* **10**: 646-55
- Komatsu, M., Yee, L., Carraway, K.L. (1999) Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* **59**: 2229–2236.
- Kondo, S., Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Horikawa, T., Muroso, S., Jang, K.L., Joab, I., Furukawa, M., Pagano, J.S. (2007) MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *J Virol* **81**: 1554-62.
- Koshlukova, S.E., Lloyd, T.L., Araujo, M.W., Edgerton, M. (1999) Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J Biol Chem* **274**: 18872-9.
- Krysan, D.J., Ting, E.L., Abeijon, C., Kroos, L., Fuller, R.S. (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1364-74.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., Francois, J. (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 20345–20357.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E., Thomas, D.Y. (1997) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* **16**: 83–97.
- Lee, B.N. und Elion, E.A. (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12679–12684
- Lee, S.A., Wormsley, S., Kamoun, S. (2003) An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast* **20**: 595–610.
- Lengeler, K.B., Tielker, D., Ernst, J.F. (2008) Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci* **65**: 528-44.
- Lev, R. (1965) The mucin histochemistry of normal and neoplastic gastric mucosa. *Lab Invest* **14**: 2080–2100.
- Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262–291.
- Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., Smorodinsky, N.I., Rubinstein, D.B., Wreschner, D.H. (2005) The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* **280**: 33374-86.
- Li, Y.D., Liang, H., Gu, Z., Lin, Z., Guan, W., Zhou, L., Li, Y.Q., Li, W.H. (2009) Detecting positive selection in the budding yeast genome. *J Evol Biol* **22**: 2430-2437.
- Li, X., Wang, L., Nunes, D.P., Troxler, R.F., Offner, G.D. (2005) Suppression of MUC1 synthesis downregulates expression of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Biol Ther* **4**: 968-73.
- Li, D., Williams, D., Lowman, D., Monteiro, M.A., Tan, X., Kruppa, M., Fonzi, W., Román, E., Pla, J., Calderone, R. (2009) The *Candida albicans* histidine kinase Chk1p: signaling and cell wall mannan. *Fungal Genet Biol* **46**: 731-741.
- Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H., Vignon, F. (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* **237**: 167–179.

- Ligtenberg, M.J., Kruijshaar, L., Buijs, F., van Meijer, M., Litvinov, S.V., Hilkens, J. (1992) Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* **267**: 6171-7.
- Liu, H., Styles, C.A., und Fink, G.R. (1993) Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741–1744.
- Liu, Y.L., Liu, Y.F., Xie, J.P. (2007) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* secreted proteins. *Yi Chuan* **29**: 250–256.
- Lommel, M., Bagnat, M., Strahl, S. (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol* **24**: 46–57.
- Lussier, M., Gentzsch, M., Sdicu, A. M., Bussey, H. Tanner, W. (1995) Protein O-glycosylation in yeast. The *PMT2* gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity. *J Biol Chem* **270**: 2770-2775.
- Macao, B., Johansson, D.G., Hansson, G.C., Härd, T. (2006) Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 71-6.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242–245.
- Maeda, T., Takekawa, M., Saito, H. (1995) Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554–558.
- Madhani, H.D., und Fink, G.R. (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314–1317.
- Madhani, H.D., Galitski, T., Lander, E.S., Fink, G.R. (1999) Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12530–12535.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., Fink, G.R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673–684.
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J. (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* **8**: 29.
- McClellan, M.N., Mody, A., Broach, J.R., Ramanathan, S. (2007) Crosstalk and decision making in MAP kinase pathways. *Nat Genet* **39**: 409–414.
- Meri, S. und Baumann, M. (2001) Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomol Eng* **18**: 213-20.
- Monge, R.A., Román, E., Nombela, C., Pla, J. (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**: 905-12.
- Moniaux, N., Escande, F., Batra, S.K., Porchet, N., Laine, A., Aubert, J.-P. (2000) Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins. *Eur J Biochem* **267**: 4536–4544.
- Murphy, L.O., und Blenis, J. (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**: 268–275.
- Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V.P., Saraste, M. (1992) SH3--an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* **307**: 55-61.
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R., Saraste, M. (1992) Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* **359**: 851-5.

- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 915-26.
- Navarro-Garcia, F., Eisman, B., Román, E., Nombela, C., Pla, J. (2001) Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**: 87–100.
- Orchard, M.G., Neuss, J.C., Galley, C.M.S., Carr, A., Porter, D.W., Smith, P., Scopes, D.I.C., Haydon, D., Vousden, K., Stubberfield, C.R., Young, K., Page, M. (2004) Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioinorg Med Chem Lett* **14**: 3975-3978.
- O'Rourke, S.M., und Herskowitz, I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874–2886.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I. (2002) A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* **22**: 4739–4749.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I. (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell* **15**: 532-542.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., O'Shea, E.K. (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Gene.* **18**: 405–412.
- Palmi-Pallag, T., Khodabukus, N., Kinarsky, L., Leir, S.H., Sherman, S., Hollingsworth, M.A., Harris, A. (2005) The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *FEBS J* **272**: 2901-11.
- Pandy, P., Kharbanda, S., Kufe, D. (1995) Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res* **18**: 4000– 4003.
- Parry, S., Silverman, H.S., McDermott, K., Willis, A., Hollingsworth, M.A., Harris, A. (2001) Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 715–720.
- Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., Hill, R.L. (1996) Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* **271**: 9845-50.
- Peschel, A., Sahl, H.G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* **2006** **4**: 529-36.
- Peter, M., Neiman, A. M., Park, H. O., van Lohuizen, M., Herskowitz, I. (1996) Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* **15** : 7046–7059.
- Philip, B. und Levin, D.E. (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271–280.
- Pino, V., Ramsauer, V.P., Salas, P., Carothers Carraway, C.A., Carraway, K.L. (2006) Membrane mucin Muc4 induces density-dependent changes in ERK activation in mammary epithelial and tumor cells: role in reversal of contact inhibition. *J Biol Chem* **281**: 29411-20.
- Pitoniak, A., Birkaya, B., Dionne, H.M., Vadaie, N., Cullen, P.J. (2009) The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Mol Biol Cell* **20**: 3101–31.
- Popolo, L., Gualtieri, T., Ragni, E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39**: 111–121.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 'two component' osmosensor. *Cell* **86**: 865–875.

- Posas, F. und Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702–1705.
- Posas, F. und Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**: 1385–1394.
- Posas, F., Witten, E.A., Saito, H. (1998) Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18**: 5788–5796.
- Price-Schiavi, S.A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P.S., Yee, L., Carraway, K.L. (2002) Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* **99**: 783–791.
- Prill, S.K.-H. (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-O-Mannosyltransferase des humanpathogen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Prill, S.K.-H., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C.A., Schroppel, K., Ernst, J.F. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560
- Qi, M., und Elion, E. A. (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**: 3569–3572.
- Raitt, D. C., Posas, F., Saito, H. (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* **19**: 4623–4631.
- Raj, P.A., Edgerton, M., Levine, M.J. (1990) Salivary histatin 5-dependence of sequence, chain length and helical conformation for candidacidal activity. *J Biol Chem* **265**: 3898-3905.
- Reiser, V., Raitt, D.C., Saito, H. (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* **161**: 1035–1040.
- Reiser, V., Salah, S. M., Ammerer, G. (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**: 620–627.
- Rieger, M., Brückner, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S. (1997) Sequence analysis of 203 kilobases from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Yeast* **13**: 1077-90.
- Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., Yang, M., Beffa, R., Brakhage, A.A., Gow, N.A., Kahmann, R., Lebrun, M.H., Lenasi, H., Perez-Martin, J., Talbot, N.J., Wendland, J., Di Pietro, A. (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **46**: 287-98.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C., Friend, S.H. (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**: 873–880.
- Roberts, R.L., und Fink, G.R. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974–2985.
- Rodicio, R. und Heinisch, J.J. (2010) Together we are strong — cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* **27**: 531–540.
- Rodriguez-Viciano, P., Tetsu, O., Oda, K., Okada, J., Rauen, K., McCormick, F. (2005) Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 461-7.
- Román, E., Cottier, F., Ernst, J.F., Pla, J. (2009) Msb2 signalling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.

- Román, E., C. Nombela, J. Pla. (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611–10627.
- Rosenfeld, Y., Papo, N., Shai, Y. (2006) Endotoxin (LPS) neutralization by innate immunity host-defense peptides: peptides' properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* **281**: 1636–1643.
- Rossi, E.A., McNeer, R., Price-Schiavi, S.A., Komatsu, M., Van den Brande, J.M.H., Thompson, J.F., Carraway, C.A.C., Fregien, N.L., Carraway, K.L. (1996) Sialomucin complex, a heterodimeric glycoprotein complex: Expression as a soluble, secretable form in lactating mammary gland and colon. *J Biol Chem* **271**: 33476–33485.
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**: W321-6.
- Schmidt, I. (2007) Interaktion der Protein-O-Mannosyltransferasen aus *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Schwartz, M. A., und Madhani, H. D. (2004) Principles of map kinase signalling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **38**: 725–748.
- Schweisguth, F. (2004) Notch signaling activity. *Curr Biol* **14**: R129 – R138 .
- Silverman, H.S., Sutton-Smith, M., McDermott, K., Heal, P., Leir, S.H., Morris, H.R., Hollingsworth, M.A., Dell, A., Harris, A. (2003) The contribution of tandem repeat number to the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* **13**: 265-77.
- Singh, P.K. und Hollingsworth, M.A. (2006) Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* **16**: 467–476.
- Singh, A.H., Wolf, D.M., Wang, P., Arkin, A.P. (2008) Modularity of stress response evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7500-7505.
- Sorgo, A.G., Heilmann, C.J., Dekker, H.L., Brul, S., de Koster, C.G., Klis, F.M. (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast* **27**: 661-72.
- Soscia, S.J., Kirby, J.E., Washicosky, K.J., Tucker, S.M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M.A., Goldstein, L.E., Duong, S., Tanzi, R.E., Moir, R.D. (2010) The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**: e9505.
- Spiro, R.G. (1973) Glycoproteins. *Adv Protein Chem* **27**: 349-467.
- Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**: 43R-56R.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5187-92.
- Stichternoth, C. (2009) Hypoxische Adaptation des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Stichternoth, C., Ernst, J.F. (2009) Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3663-72.
- Straede, A., Corran, A., Bundy, J., Heinisch, J.J. (2007) The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast* **24**: 321–334.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. Tanner, W. (1993) *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8164-8168.

- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. Tanner, W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307.
- Swaim, C.L., Anton, B.P., Sharma, S.S. (2008) Physical and computational analysis of the yeast *Kluyveromyces lactis* secreted proteome. *Proteomics* **8**: 2714–2723.
- Tanaka, T., Fillmore, D., Sun, S.T., Nishio, I., Swislow, G., Shah, A. (1980) Phase transitions in ionic gels. *Phys Rev Lett* **45**: 1636–1639.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H. Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., Saito, H. (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**: 3521–3533.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., Saito, H. (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* **25**: 3033–3044.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., Ammerer, G. (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5625–5630.
- Thompson, E.J., Shanmugam, K., Hattrup, C.L., Kotlarczyk, K.L., Gutierrez, A., Bradley, J.M., Mukherjee, P., Gendler, S.J. (2006) Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappaB pathways. *Mol Cancer Res* **4**: 489-97.
- Torres, S.R., Garzino-Demo, A., Meiller, T.F., Meeks, V., Jabra-Rizk, M.A. (2009) Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals. *Mycoses* **52**: 11-5.
- Truckses, D. M., Bloomekatz, J. E., Thorner, J. (2006) The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 912–928.
- Tsutsumida, H., Swanson, B.J., Singh, P.K., Caffrey, T.C., Kitajima, S., Goto, M., Yonezawa, S., Hollingsworth, M.A. (2006) RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* **12**: 2976-87.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D. S., Nickerson, S. R., Krysan, D. J., Cullen, P. J. (2008) Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J Cell Biol* **181**: 1073–1081.
- Van't Hof, W., Veerman, E.C.I., Helmerhorst, E.J., and Nieuw Amerongen, A.V. (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* **382**: 597–619.
- Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**: 383-387.
- Wen, Y., Caffrey, T.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hollingsworth, M.A. (2003) Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *J Biol Chem* **278**: 38029-39.
- Westfall, P.J., Ballou, D.R., Thorner, J. (2004) When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* **306**: 1511–1512.
- Wey, S.B., Mori, M., Pfaller, M.A., Woolson, R.F., Wenzel, R.P. (1988) Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* **148**: 2642-5.
- Williams, C.J., Wreschner, D.H., Tanaka, A., Tsarfaty, I., Keydar, I., Dion, A.S. (1990) Multiple protein forms of the human breast tumor-associated epithelial membrane antigen (EMA) are generated by alternative splicing and induced by hormonal stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 1331–1338.
- Wolf, M.Y., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2008) Comparable contributions of structural-functional constraints and expression level to the rate of protein sequence evolution. *Biol Direct* **3**: 40.

- Wreschner, D.H., McGuckin, M.A., Williams, S.J., Baruch, A., Yoeli, M., Ziv, R., Okun, L., Zaretsky, J., Smorodinsky, N., Keydar, I., Neophytou, P., Stacey, M., Lin, H.H., Gordon, S. (2002) Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci* **11**: 698-706.
- Wreschner, D.H., Zrihan-Licht, S., Baruch, A., Sagiv, D., Hartman, M.L., Smorodinsky, N., Keydar, I. (1994) Does a novel form of the breast cancer marker protein, MUC1, act as a receptor molecule that modulates signal transduction? *Adv Exp Med Biol* **353**: 17-26.
- Wu, C., Jansen, G., Zhang, J., Thomas, D.Y., Whiteway, M. (2006) Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* **20**: 734-746.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Saito, H. (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **17**: 1289-1297.
- Xu, T.S., Levitz, M., Diamond, R.D., Oppenheim, F.G. (1991) Anticandidal activity of major salivary histatins. *Infect Immun* **70**: 2549-2554.
- Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., Kufe, D. (1997) Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* **272**: 12492-12494.
- Yang, H.Y., Tatebayashim, K., Yamamoto, K., Saito, H. (2009) Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO J* **28**: 1380-91.
- Yang, X., Klein, R., Tian, X., Cheng, H.T., Kopan, R., Shen, J. (2004) Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol* **269**: 81-94.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., Lim, W.A., (2004) Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol Cell* **14**: 825-832.
- Zarrinpar, A., Park, S.H., Lim, W.A. (2003) Optimization of specificity in a cellular protein interaction network by negative selection. *Nature* **426**: 676-80.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R., Young, R.A. (2003) Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**: 395-404.
- Zhan, X.-L. und Guan, K.L. (1999) A specific protein-protein interaction accounts for the in vivo substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. *Genes Dev* **13**: 2811-2827.

8 Abkürzungen

°C	Grad Celsius	mRNA	messenger RNA
μ	mikro	MW	Molekulargewicht
A	Adenin	nm	Nanometer
Aβ	Amyloid β	N-terminal	aminoterminal
Abb.	Abbildung	OD _x	optische Dichte bei λ = x nm
Ac	Acetat	ONPG	o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid
AD	Aktivierungsdomäne	ORF	offener Leserahmen
Amp	Ampicillin	PAA	Polyacrylamid
APS	Ammoniumpersulfat	PBS	Phosphate buffered saline
ARS	Autonom replizierende Sequenz	PCK1p	PCK1-Promotor
AS	Aminosäure	PCR	'polymerase chain reaction'
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PEG	Polyethylenglycol
b (bp)	Basen (Basenpaare)	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
BD	DNA-Bindedomäne	PKC	Proteinkinase C
bidest.	bidestilliert	PNGase F	N-glycosidase F aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>)
BSA	Rinderserumalbumin	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
bzw.	beziehungsweise	RNA	Ribonukleinsäure
C	Cytosin	RNase	Ribonuklease
ca.	circa	RT	Raumtemperatur
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	s	Sekunde
CASA	Casaminosäuren	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CD	cleavage domain	SDS	Natriumdodecylsulfat
cDNA	komplementäre DNA	STR	Serin-Threonin-reich
C-terminal	carboxyterminal	β-Gal	β-Galaktosidase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	T	Thymidin
DMF	Dimethylformamid	Tab.	Tabelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	TAE	Tris-Acetat-EDTA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TE	Tris-EDTA
dNTP	Desoxinukleotid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
DTT	1,4-Dithiothreitol	TFMS	Trifluoromethansulfonsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	TM	Transmembran
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Fa.	Firma	u	units
g	Gramm	u.a.	unter anderem
G	Guanin	Upm	Umdrehungen pro Minute
ggf.	gegebenenfalls	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
h	Stunde	YNB	Yeast nitrogen base
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
HMH	Hkr1 Msb2 homolog	WT	Wildtyp
kb	Kilobasenpaare	z. B.	zum Beispiel
kDa	Kilodalton		
<i>LacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>		
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani		
log	logarithmisch		
M	Molar		
mA	Milliampere		
MAP	mitogen activated protein		
MAPK	mitogen activated protein kinase		
min	Minuten		
ml	Milliliter		
mM	Millimolar		
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure		

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Eva Szafranski-Schneider, Marc Swidergall, Fabien Cottier, Denis Tielker, Elvira Román, Jesus Pla and Joachim F. Ernst

Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides
(PLoS Pathogens)

Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken, denn Herr Prof. Dr. J. F. Ernst überließ mir das interessante Thema und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. T. Klein für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Natürlich möchte ich mich auch herzlich beim gesamten Institut bedanken, zum einen für die außergewöhnlich schöne Arbeitsatmosphäre, für die großartige Hilfsbereitschaft (die Richtigen fühlen sich bestimmt angesprochen) und zum anderen für die schönen Unternehmungen. Ein besonderer Dank geht an die Leute, die meine Arbeit kritisch durchgeschaut haben. Außerdem möchte ich mich besonders bei meinen Studenten Nadine Horak und Marc Swidergall für die Mitarbeit und die Unterstützung am Msb2-Projekt bedanken. Vielen lieben Dank auch an die Mitarbeiter, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten, die in schweren Situationen für mich da waren und die zu echten Freunden wurden.

Zum Schluss möchte ich mich an meinen Mann und insbesondere an meine Eltern wenden ...ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Ihr seid immer für mich da gewesen, zu jeder Zeit. Ihr wisst, wieviel Ihr mir bedeutet.

Erklärung

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

Düsseldorf, den 06.09.2011

(Eva Maria Szafranski-Schneider)