
Das BTB-Protein Psg1 als Suppressor von *O*-Glykosylierungsdefekten in *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von Steffen Ullmann
aus Lutherstadt Eisleben

Düsseldorf 2013

Aus dem Department Biologie; Institut für molekulare Mykologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Candida albicans</i> als humanpathogener Pilz	1
1.2 Glykosylierung als Form der Proteinmodifikation.....	2
1.2.1 <i>N</i> -Glykosylierung	2
1.2.2 <i>O</i> -Glykosylierung	3
1.3 Protein <i>O</i> -Mannosyltransferasen und die Phänotypen von <i>pmt</i> -Mutanten in <i>C. albicans</i>	5
1.3.1 Phänotypen von <i>pmt</i> -Mutanten in <i>C. albicans</i>	7
1.4 Andere Mutationen, welche die <i>Pmt</i> -Mannosylierung beeinflussen.....	9
1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System	10
1.5.1 E3-Ubiquitinligasen.....	11
1.5.2 Die BTB-Domäne.....	14
1.6 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien und Enzyme	16
2.2 Stämme und Medien.....	17
2.2.1 <i>E. coli</i> Stämme	17
2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	17
2.2.3 <i>C. albicans</i> Stämme	17
2.2.4 <i>C. albicans</i> Stammkonstruktion.....	19
2.2.5 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	21
2.2.6 Medien zur Anzucht von Hefen	21
2.2.7 Medien zur Anzucht von <i>C. albicans</i>	21
2.2.8 Sensitivitätstest	22
2.2.9 Medien mit verschiedenen Substanzen	22
2.2.10 Hypheninduktion von <i>C. albicans</i>	22
2.3 Primer und Plasmide	23
2.3.1 Plasmide.....	23
2.3.2 Primer.....	26
2.3.2 Plasmidkonstruktion	28

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren	29
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen	29
2.4.3 DNA-Restriktion	29
2.4.4 Entfernen von 3'-überhängenden Enden	29
2.4.5 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	30
2.4.6 Dephosphorylierung von DNA	30
2.4.7 Ligation	30
2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.4.9 DNA-Größenstandards	30
2.4.10 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren	30
2.4.11 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse	30
2.4.11.1 Sondenmarkierung	31
2.4.11.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot	31
2.4.11.3 Hybridisierung und Detektion	31
2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.4.12.1 Kolonie-PCR	31
2.4.12.2 Quantitative RT-PCR/ Real Time-PCR	32
2.5 Transformation	35
2.5.1 Transformation von <i>E. coli</i>	35
2.5.2 Transformation von <i>C. albicans</i>	35
2.6 Proteinbiochemische Methoden	36
2.6.2 Präparation von Hefe-Rohextrakten	36
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	36
2.6.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry	36
2.6.4 PNGase F-Behandlung	37
2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.6.6 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse	37
2.7 Zellbiologische Methoden	38
2.7.1 Immunfluoreszenz	38
2.7.1.1 Fixieren von Zellen	38
2.7.1.2 Herstellen der Präparate	38
2.8 Transkriptomanalyse	39
2.8.1 DNA-Microarrays	39

2.8.2 Anzucht der Zellen für Microarrays.....	39
2.8.3 Synthese der Komplementär-DNA	39
2.8.4 Hybridisieren, Waschen und Scannen der DNA Microarrays	40
2.8.5 Normalisierung und statistische Auswertung	40
2.9 Proteinanalysen	41
2.9.1 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay-Assay“)	41
2.9.2 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („LacZ-Assay“)	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>PSG1</i>	43
3.1.1 Sequenz- und genomische Analyse von <i>PSG1</i> in <i>C. albicans</i>	43
3.1.2 Aminosäuresequenz von Psg1	45
3.1.2.1 Proteinmotive.....	45
3.1.2.2 Ubiquitinierungsstellen und Sumoylierungsstellen	46
3.1.2.3 Homologievergleich und Phylogenie des Psg1-Proteins.....	47
3.2 Disruption von <i>PSG1</i> in <i>C. albicans</i>	51
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der <i>psg1</i> -Disruptionsmutanten.....	52
3.2.1.1 Wachstum und Morphogenese der <i>psg1</i> -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp	54
3.2.1.2 Expression von <i>PSG1</i> im Wildtypstamm und der Disruptionsmutante	55
3.2.1.3 Sensitivitäten der <i>psg1</i> -Disruptionsmutanten.....	59
3.2.1.4 Virulenz einer <i>psg1</i> -Disruptionsmutante.....	60
3.3 Lokalisation von Psg1	60
3.3.1 Markierung von <i>PSG1</i> mit dem HA-Epitop	60
3.3.2 Funktionalitätstest des Psg1 ^{3xHA} -Fusionsproteins	62
3.3.3 Immunfluoreszenz der Epitop-markierten Stämme.....	62
3.4 Überexpression von <i>PSG1</i>	64
3.4.1 Überexpression von <i>PSG1</i> in <i>pmt1</i> und <i>pmt4</i> -Mutanten	64
3.4.1.1 Untersuchung der Koloniemorphologie und Aggregation der Zellen	64
3.4.1.2 Quantifizierung der Zellaggregation	65
3.4.1.3 Sensitivität gegenüber Hygromycin B.....	66
3.4.2 Die Suppression der <i>pmt1</i> -Mutante durch <i>PSG1</i> -Überexpression erfordert Dom34 ..	67
3.4.2.1 Quantifizierung der Zellaggregation	69
3.4.2.2 Sensitivität gegenüber Hygromycin B.....	70

3.5 Gegenseitige Beeinflussung der Transkriptspiegel von <i>PSG1</i> , <i>PMT</i> und <i>DOM34</i> bei Deletionen	72
3.6 Auswirkungen der <i>psg1</i> -Disruption auf Substrate der <i>N</i> - und <i>O</i> -Glykosylierung.	75
3.6.1 Msb2	75
3.6.2 Suc2	76
3.7 Genomweite Transkriptanalyse	78
3.7.1 Stark regulierte Gene in der <i>psg1</i> -Mutante.....	78
3.7.2 „Gene Ontology“ (GO)-Analyse der regulierten Gene	80
3.7.3 Vergleichende Analyse mit regulierten Genen aus <i>pmt</i> -Mutanten.....	85
3.8 Identifikation von Psg1-Interaktionspartnern mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems	87
3.8.1 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	87
3.8.2 Sequenzanalyse der Bankplasmide.....	89
3.8.3 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	91
4. Diskussion	93
4.1 Sequenzanalyse von <i>PSG1</i> in <i>C. albicans</i>	93
4.2 Phänotypen der <i>psg1</i> -Mutante.....	95
4.2.1 <i>psg1</i> -Mutanten beeinflussen indirekt die Prozesse der <i>O</i> -Glykosylierung, führen jedoch nicht zur Hypoglykosylierung einiger Zielproteine	97
4.3 Psg1 ist gleichmäßig im Bereich um den Zellkern lokalisiert und akkumuliert vereinzelt an der Zellmembran	98
4.4 Genetische Interaktion von <i>PSG1</i> , <i>PMT1</i> und <i>DOM34</i>	99
4.5 Mögliche Funktionen von Psg1	100
4.5.1 Psg1 beeinflusst Signalweg-Komponenten im Cytoplasma	100
4.5.2 Psg1 als Komponente der Ubiquitinin-vermittelten Proteolyse „puffert“ die Folgen einer mangelhaften <i>O</i> -Glykosylierung in <i>pmt</i> -Mutanten am ER.....	101
5. Zusammenfassung	106
6. Summary	107
7. Literaturverzeichnis	108
8. Abkürzungsverzeichnis	122
9. Anhang	124

1 Einleitung

1.1 *Candida albicans* als humanpathogener Pilz

Candida albicans ist ein opportunistisch pathogener Pilz, welcher als Kommensale weiträumig verbreitet ist. Bei ca. 75 % der gesamten Weltbevölkerung kann er auf den Schleimhäuten von Mund, Nase und Darm nachgewiesen werden (Ghannoum *et al.*, 2010; Calderone, 2002). *C. albicans* kann harmlose oberflächliche Mykosen verursachen. Seine hohe medizinische Relevanz ist jedoch begründet durch das Verursachen oft tödlich verlaufender systemischer Infektionen bei immunsupprimierten Menschen (Brown und Gow, 1999). Bei solchen systemischen Infektionen durch *C. albicans* kommt es zur Besiedelung lebenswichtiger Organe wie Leber oder Niere. Candidämien enden dabei durch eine Sepsis bei bis zu 65 % der Patienten tödlich. Ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* ist seine Fähigkeit zum Dimorphismus. Durch die Hefeform und die Vermehrung durch Knospung des Pilzes kommt es nach einer Infektion zu einer schnellen Verbreitung über den Blutstrom in den gesamten Organismus (Odds, 1988; Cutler, 1991). Die Penetration der Epithelzellen wird dem Pilz durch seine filamentöse Form ermöglicht (Hostetter, 1994). Die filamentöse Form des Pilzes weist eine erhöhte Adhäsion an Wirtsepithelien auf, was vermutlich auf eine veränderte Zellwandkomposition und eine Erhöhung der hydrophoben Anteile zurückzuführen ist (Odds, 1994; Cutler, 1991). Zudem ist seine Fähigkeit, als filamentöser Pilz nach der Phagozytose aus den Makrophagen herauszuwachsen, ein wichtiges Mittel der Immunevasion (Vasques-Torres und Balish, 1997). *C. albicans* Stämme, die in ihrer Morphogenese beeinträchtigt sind, bzw. keine Filamente ausbilden können, sind im Mausmodell avirulent (Lo *et al.*, 1997). Ein weiterer Virulenzfaktor ist die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen. *C. albicans* und das Bakterium *Staphylococcus aureus* bilden polymikrobielle Biofilme aus, die auch auf der Oberfläche von invasiven medizinischen Hilfsmitteln wie Venen- oder Herzkathetern auftreten können (Harriott und Noverr *et al.*, 2009). Swidergall *et al.* (2013) konnten zeigen, dass die Sekretion des Msb2-Proteins von *C. albicans* innerhalb eines Biofilms *S. aureus* vor der Wirkung antimikrobieller Peptide schützt.

Neben der Fähigkeit zum Dimorphismus ist es vor allem die hohe Anpassungsfähigkeit, die *C. albicans* zu einem der wichtigsten Vertreter innerhalb der humanpathogenen Pilze macht. Die dynamische Zellwand von *C. albicans* ist ein Grund hierfür (Bowman und Free, 2006). Im Rahmen der Veränderung der Zellwandkomposition bei der Hefe-Hyphen-Transition sind es vor allem die Mannoproteine der fungalen Zellwand, die Hydrophobizität und die Dynamik der Zellwand (Masuoka und Hazen, 1999; Hazen *et al.*, 2001) gewährleisten. Neben einer ganzen Reihe anderer Funktionen solcher Glykoproteine sind sie vor allem für die spezifische Adhäsion von *C. albicans* von Bedeutung (Hiller *et al.*, 2011). Die Relevanz dieser Glykoproteine wird anhand von *C. albicans*-Glykosylierungsmutanten deutlich. Diese sind fast immer avirulent im systemischen Mausmodell der Infektion und sie weisen zudem Defekte bezüglich der Adhäsion, Hefen-Hyphen-Transition und der ihrer Belastbarkeit bei unterschiedlichen Stresssituationen auf (Ernst *et al.*, 2001; Cutler, 2001; Poulain und Jouault, 2004).

1.2 Glykosylierung als Form der Proteinmodifikation

Glykosylierung von Proteinen ist eine weit verbreitete und vielfältige Form der post- bzw. der kotranslationalen Proteinmodifikation. Apweiler *et al.* (1999) vermuteten, dass über die Hälfte aller bekannten Proteine in irgendeiner Form glykosyliert werden. Da bei Hefen sowohl *N*- als auch *O*-Glykosylierung innerhalb der ER beginnen und im Golgi fortgeführt werden, sind die meisten glykosylierten Proteine membranständig, innerhalb der Zellwand lokalisiert oder werden von der Zelle in das umliegende Medium sezerniert. Die gebundenen Zuckerstrukturen an Glykoproteinen erfüllen, ausgehend von Lokalisation und Proteinkomponente, unterschiedliche Funktionen innerhalb des Organismus. So kann beispielsweise durch solche Protein-gebundenen Glykostrukturen die Halbwertszeit der Proteine verändert werden. Am Beispiel von Flo11 aus *S. cerevisiae* zeigte sich, dass das Protein bei intakter Glykosylierung wesentlich stabiler ist als im Hintergrund von Glykosylierungsmutanten (Meem und Cullen, 2012). Die meisten Adhäsine, welche Zell-Zell Kontakt und Oberflächenadhäsion ermöglichen, sind innerhalb der pathogenen Pilze stark *O*- und *N*-glykosyliert (Lehle *et al.*, 2006; Lommel und Strahl, 2009). Störungen in den Mechanismen der *O*- und *N*-Glykosylierung führen im ER zu einer Fehlfaltung der ins ER sezernierten Glykoproteine. Diese werden dann im Zuge des ER assoziierten Abbaus von Proteinen (ERAD) proteolytisch degradiert (Helenius und Aebi, 2001). Beim Menschen führt eine unzureichende *O*-Glykosylierung des α -Dystroglykans zur Ausbildung von Dystroglykanopathien, welche vom Walker-Warburg Syndrom bis hin zu diversen anderen Formen muskulärer Dystrophien reichen (Moore und Hewitt, 2009). Krankheiten werden auch durch eine fehlerhafte *N*-Glykosylierung hervorgerufen. Allein 17 verschiedene Krankheitstypen, ausgehend von einer genetisch basierten fehlerhaften *N*-Glykosylierung, konnten durch Cylwik *et al.* (2013) klassifiziert werden. Die Addition von Zuckerstrukturen an Proteine kann nicht nur ihre physisch-chemischen Eigenschaften ändern, sondern auch entscheidend für Halbwertszeit, zelluläre Lokalisation, Interaktion mit Liganden und andere funktionelle Aspekte sein. Für alle einzelligen Eukaryoten, bis hin zu allen multizellulären Organismen ist Glykosylierung ein essenzieller zellulärer Prozess, dessen Störung erhebliche Beeinträchtigungen der Zelle bzw. des Organismus zur Folge hat (Varki, 1993).

1.2.1 *N*-Glykosylierung

Der Prozess der *N*-glykosidischen Proteinmodifikation durch Zuckerstrukturen ist essentiell und vom einzelligen Eukaryoten bis hin zum Menschen hoch konserviert. Bei der *N*-Glykosylierung wird ein zuvor an der ER-Membran synthetisiertes Oligosaccharid auf einen Asparaginrest der ins ER-Lumen naszierenden Polypeptidkette übertragen. Dies geschieht *en bloc* über eine Oligosaccharyltransferase, welche einen Komplex mit dem Sec61-Translokon und dem Ribosom bildet (Chavan und Lennarz, 2006; Kelleher und Gilmore, 2006). Dabei bilden Asp-X-Ser oder Asp-X-Thr jeweils die Konsensussequenzen, wobei X jede Aminosäure mit Ausnahme von Prolin darstellen kann. Das übertragene Oligosaccharid besteht aus drei Glukosen, neun Mannosen und zwei *N*-Acetylglukosamin-Molekülen, welche kovalent an Dolichol-Pyrophosphat gebunden sind (Roth *et al.*, 2010). Noch im ER werden die drei endständigen Glukosereste und ein Mannoserest über die α -Glucosidasen I und II sowie durch die ER-Mannosidase wieder abgespalten. Nach der Prozessierung durch die Glucosidase I wird das monoglykosylierte Protein von den Lektinen Calnexin und

Calreticulin erkannt und gebunden (Ellgaard *et al.*, 1999; Ellgaard und Helenius, 2003). Die Bindung des endständigen Glukoserestes durch diese Lektine ist Teil eines Qualitätskontroll-Systems. Solange Calnexin und Calreticulin das Glykoprotein binden, wird es im ER zurückgehalten. Erst wenn der letzte endständige Glukoserest durch die Glucosidase II entfernt wurde, wird das Glykoprotein freigegeben. Währenddessen kommt es durch das Zusammenwirken mit einer Proteindisulfidisomerase zur Ausbildung nativer Disulfidbrücken, die für die korrekte Faltung des Proteins wichtig sind (Oliver *et al.*, 1997; 1999). Innerhalb des ER kommt es auch zu einer Qualitätskontrolle bzgl. der korrekten Faltung des Proteins. Das Enzym UDP-Glukose-Glykoprotein-Transferase gehört zu einem weiteren Qualitätskontrollsystem des ER und dient dort als Faltungssensor (Hammond und Helenius, 1994). Bei einer inkorrekten Faltung eines Proteins bindet das Enzym die ungefaltete Proteindomäne (Ritter und Helenius, 2000) und hängt erneut einen Glukoserest an das Protein. Dieses wird dann erneut von Calnexin/Calreticulin gebunden und dem Zyklus zurückgeführt. Dieser Vorgang wiederholt sich solange, bis das Protein entweder richtig gefaltet vorliegt, oder im Rahmen der ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) abgebaut wird (Plemer und Wolf, 1999). Die weitere Prozessierung der im ER angehefteten Oligosaccharid-Strukturen erfolgt durch weitere Kürzung oder durch Ergänzung mit anderen Zuckerstrukturen im Golgi-Apparat. Jedoch bestehen hierbei Unterschiede zwischen einzelligen Hefen und Säugerzellen. In Hefen wird die bestehende Zuckerstruktur ausschließlich durch Mannosen ergänzt, wohingegen bei Säugern komplexere *N*-Glykane zu finden sind (Weerapana und Imperiali, 2006). *N*-Glykosylierung stellt unter den Protein-Glykosylierungen die am weitesten verbreitete Form dar.

1.2.2 *O*-Glykosylierung

Ein nicht unerheblicher Teil der sich in der Zellwand von Pilzen befindenden Mannoproteine sind neben ihrer *N*-Glykosylierung auch stark *O*-glykosyliert (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2001). Neben ihrer Schutzfunktion besitzen solche *O*-glykosylierten Mannoproteine auch diverse andere Funktionen wie Oberflächen-Adhäsion, Signaltransduktion durch externe Stimuli, die Aufnahme von Eisen aus der Umwelt und Zell-Migration (Bowman und Free, 2006). Es ist daher nicht verwunderlich, dass pathogene Pilze mit einer defekten *O*-Glykosylierung eine verringerte Fähigkeit zur Adhäsion, zum hyphalen Wachstum und eine verminderte Virulenz aufweisen (Lengeler und Ernst, 2007). Bei der *O*-Glykosylierung kommt es zur Ausbildung einer *O*-glykosidischen Bindung von Oligosacchariden an einen Serin- oder Threoninrest der Polypeptidkette. Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung gibt es allerdings zwischen Hefen und Säugern starke Unterschiede im Ablauf und in der Struktur dieser Proteinmodifikation. Im Falle von *S. cerevisiae* und *C. albicans* sind diese Oligosaccharide nur wenig verzweigt. Zudem bestehen sie vorrangig aus Mannosen, welche durch α 1-2- und α 1-3-glykosidische Bindungen (bei *C. albicans* ausschließlich α 1-2) ausschließlich linear aneinander gereiht sind. Bei höheren Säugern konnte *O*-Mannosylierung bisher nur für eine begrenzte Anzahl an Proteinen beobachtet werden, allerdings sind die Verzweigungen und auch die Komponenten der Oligosaccharide hier zunehmend komplexer (Lommel und Strahl, 2009). Zudem erfolgt bei höheren Eukaryoten die Modifikation von Proteinen durch *O*-Glykosylketten nicht kotranslational mit Mannose als erstem Zucker im ER, sondern posttranslational mit *N*-Acetylgalactosamin (GalNac) als erstem Zucker nach dem Weitertransport im Golgi. Abb. 1.1 zeigt eine Übersicht über die Strukturen der *O*-

Mannosylierung verschiedener Spezies. Als Beispiel für höhere Säuger dient hier das humane α -Dystroglykan, welches Verzweigungen und verschiedene Zucker in den Oligosacchariden aufweist, im Vergleich zu den größtenteils geradlinigen *O*-Mannoseketten der Glykoproteine von Pilzen.

Bei Pilzen ist der erste Syntheseschritt mit der Verknüpfung eines Mannose-Restes mit der Hydroxy-Gruppe eines Serin- oder Threonin-Restes des Zielproteins gleich. Der erste Schritt der *O*-Glykosylierung erfolgt im ER-Lumen und wird von Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert. Diese Protein-*O*-Mannosyltransferasen katalysieren eine α -D-glykosidische Bindung mit dem Zielprotein (Bause und Lehle, 1979), welches vermutlich zu diesem Zeitpunkt kotranslational ins ER-Lumen sezerniert wird (Tanner und Lehle, 1987) und der Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man), welche bei dieser Reaktion als Mannose-Donor fungiert. Die Bindung wird unter Inversion der Konfiguration des Mannose-Donors auf eine Hydroxylgruppe der Serin- oder Threonin-Seitenkette des Zielproteins in α -glykosidischer Bindung übertragen. Der Mannose-Donor für diese Mannosylierung wird zunächst auf der cytosolischen Seite des ER synthetisiert. Ein Mannoserest wird dort mittels des essenziellen Enzyms Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase 1 (Dpm1) von GDP-Mannose auf das Polyisoprenoid Dolicholphosphat (Dol-P) übertragen (Orlean, 1990). Die Translokation des Mannose-Donors auf die lumenale Seite des ER erfolgt über eine Flippase (Helenius *et al.*, 2002). Im ER-Lumen übernehmen dann die Pmt's den letzten Schritt der initialen Mannosylierung des Zielproteins. Eine schematische Darstellung über die Reaktionen der *O*-Glykosylierung ist in Abb. 1.2 dargestellt.

Obwohl der erste Schritt der *O*-Glykosylierung eng mit der Translokation des Zielproteins ins ER-Lumen verbunden ist, kann diese Reaktion auch außerhalb des Translokationskanals

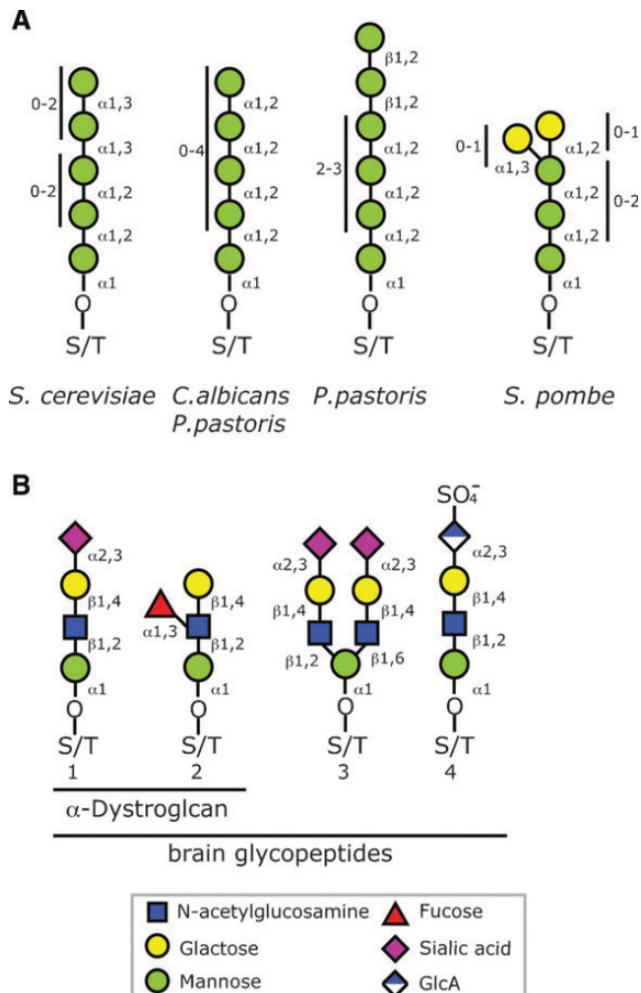


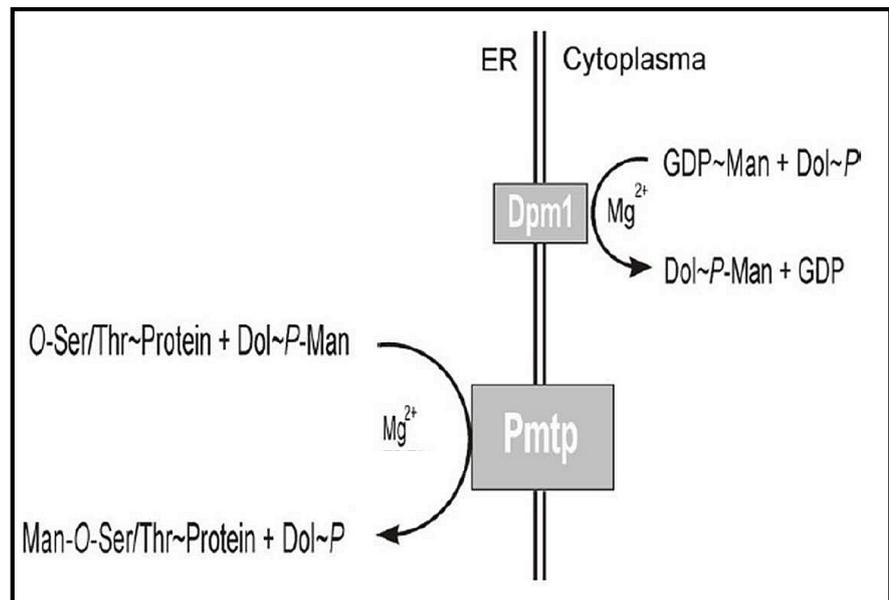
Abb. 1.1: O-Mannosylierung innerhalb verschiedener Spezies

Protein *O*-Mannosylierung beginnt in allen Organismen mit der Katalyse einer *O*-glykosidischen Bindung an einen Serin- oder Threoninrest. Bei der Kettenverlängerung gibt es zwischen Pilzen und höheren Eukaryoten große Unterschiede. A: Gezeigt sind die typisch auftretenden linearen Mannoseketten einzelliger Pilze. B: Im Vergleich dazu sind die Verzweigung und die Komponenten der Mannosylkette vom humanen α -Dystroglykan (1 und 2) aus Hirngewebe sowie von Glykopeptiden (3) und *O*-mannosylierte Glykane mit „human natural killer-1“ (HNK-1)-Epitop (4) wesentlich komplexer. Die Abbildung wurde übernommen von Lommel und Strahl (2009).

ablaufen. (Harty *et al.*, 2001). Nach der initialen Addition des ersten Mannoserestes durch die Pmt's erfolgt eine weitere Anheftung von Mannoseresten an die zuvor angeheftete Mannose.

Abb. 1.2: Darstellung der ersten Schritte der O-Mannosylierung

Das sich in der ER-Membran befindliche Dpm1 katalysiert die Bildung von Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man). Im ER-Lumen wird dann mittels der Proteinmannosyltransferasen die initiale Reaktion der O-Glykosylierung über diesen Mannose-Donor katalysiert. Diese Abbildung wurde von Prill (2004) übernommen.



Diese Reaktionen laufen im Golgi-Apparat ab und werden durch verschiedene Mannosyltransferasen katalysiert (Lussier *et al.*, 1999, Abeijon *et al.*, 1993). Bei *S. cerevisiae* wird maximal eine Kettenverlängerung von bis zu fünf Mannoseresten, bei *C. albicans* eine Kettenverlängerung von sieben Mannoseresten erreicht. Allerdings kommen unter den O-glykosylierten Proteinen in beiden Organismen meistens einzelne Mannosen- oder Di-Mannosylketten vor (Buurmann *et al.*, 1998; Goins und Cutler, 2000).

1.3 Protein O-Mannosyltransferasen und die Phänotypen von *pmt*-Mutanten in *C. albicans*

Wie schon beschrieben katalysieren Pmt-Proteine den initialen Schritt bei der O-Mannosylierung. Die Anwesenheit von O-glykosylierten Proteinen und damit auch der Pmt-Proteine, beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Pilze oder höhere Säugenzellen. Die als „S-Layer“ bezeichneten Hüllenstrukturen der Archaea enthalten O-glykosylierte Proteine (Schäffer und Messner, 2001). Ferner finden sich Pmt-homologe Proteine in den Actinobakterium *Corynebacterium sepedonicum* und *Mycobacterium tuberculosis* (Mahne *et al.*, 2006; Van der Ven *et al.*, 2005). Die erste Proteinmannosyltransferase wurde in *S. cerevisiae* beschrieben (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). Ausgehend von der Sequenzidentität homologer Gene konnten sechs weitere Isoformen in *S. cerevisiae* identifiziert werden (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Diese Isoformen gehören zu drei Unterfamilien. Zur Pmt1-Familie gehören die Isoformen Pmt1, Pmt5 und Pmt7. Zur Pmt2-Familie gehören die Isoformen Pmt2/Pmt3 und Pmt6. Pmt4 ist in *S. cerevisiae* die einzige Isoform innerhalb der Pmt4-Familie (Girrbach *et al.*, 2000). Verschiedene Isoformen dieser Pmt-Proteine wurden auch in diversen anderen Organismen gefunden. In *S. pombe* kodieren die OMA-Gene (*OMA1*, *OMA2* und *OMA4*) jeweils für eine Isoform der Protein O-Mannosyltransferasen (Strahl *et al.*, 2005). In *Cryptococcus neoformans* wurde die Existenz bei drei Pmt-Proteinen (*PMT1*, *PMT2* und *PMT4*) nachgewiesen (Willger *et al.*, 2009). Die

homologen Isoformen der Pmt-Proteine in Säugerzellen, welche den ersten Schritt der *O*-Glykosylierung katalysieren, sind mit Pomt1 und Pomt2 Homologe der pilzlichen Pmt4- und Pmt2-Isoformen (Akasaka- Many *et al.*, 2006). Diese sind auch für den ersten Schritt der *O*-Glykosylierung des humanen α -Dystroglykans verantwortlich. Für *C. albicans* konnten Prill *et al.* (2005) fünf Isoformen identifizieren. Pmt1 und Pmt5 gehören jeweils zur Pmt1-Familie, Pmt2 und Pmt6 zur Pmt2-Familie und als einziger Vertreter der Pmt4-Familie konnte Pmt4 identifiziert werden. In Abb. 1.3 sind die Pmt-Isoformen verschiedener Organismen eingeordnet in ihren Pmt-Familien dargestellt.

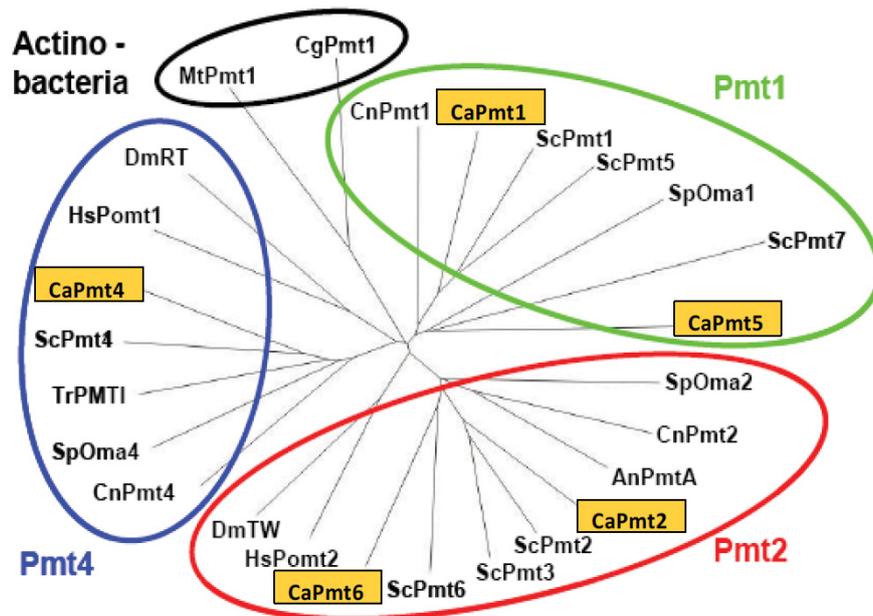


Abb. 1.3: Phylogenetischer Stammbaum der Pmt-Familien

Pmt-Proteine und ihre Einordnung in die Pmt-Unterfamilien. Eine Ausnahme bilden die Pmt-Proteine aus den Actinobacterien, welche keiner eukaryotischen Unterfamilie zugeordnet werden konnten. Aufgeführt sind Pmt-homologe Proteine aus den Organismen: An, *Aspergillus nidulans*; Ca, *Candida albicans*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Cn, *Cryptococcus neoformans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Tr, *Trichoderma reesei*. Diese Grafik wurde von Lengeler *et al.*, (2007) entnommen und durch Schmidt (2007) modifiziert.

Pmt-Proteine sind im ER-lokalisierete, membranständige Proteine, welche mit sieben Transmembrandomänen in der ER-Membran angeordnet sind. Die dabei entstehenden „loops“ sind, zumindest im Falle von Pmt1 aus *S. cerevisiae*, essenziell für die Enzymaktivität des Proteins (Girrbach *et al.*, 2000). Ferner konnte für *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Pmt4 sowohl im perinukleärem ER, als auch im kortikalem ER lokalisiert ist (Lommel und Strahl, 2009). Im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung weisen Substrate der *O*-Glykosylierung keine Konsensussequenz auf. Es ist daher denkbar, dass jede Isoform ihre eigenen Zielproteine hat und diese Zielproteine anhand ihrer Struktur erkennt. Wie genau diese Substratspezifität gewährleistet wird, konnte bisher nicht geklärt werden. Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Pir2, Kre1, Kre9, Kex2, Gas1 und Fus1 Substrate der *O*-Glykosylierung sind und dass diese Proteine spezifisch von Pmt1 und Pmt2 (Pir2, Kre1, Kre9) sowie von Pmt4 (Kex2, Gas1, Fus1) *O*-glykosyliert werden. (Gentzsch und Tanner, 1997; Proszynski *et al.*, 2004). In *C. albicans* werden die Zellwandproteine Kre9, Pir1 und Als1 von Pmt1

glykosyliert (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Zudem konnten Prill *et al.* (2005) zeigen, dass die Knospungsdeterminante Ax12 von Pmt4 glykosyliert und dadurch teilweise vor proteolytischen Abbau geschützt wird. Ein gemeinsames Zielprotein der Pmt-Isoformen Pmt1 und Pmt4 in *C. albicans* ist Sec20, ein essenzielles Protein der ER-Membran in Hefen, das als t-SNARE Komponente im retrograden Vesikel-Transport arbeitet und ohne O-Glykosylierung sehr schnell in der Zelle degradiert wird (Weber *et al.*, 2004). Ferner konnte die Bildung von Homo- und Heterodimeren von Pmt-Proteinen in *S. cerevisiae* und auch in *C. albicans* gezeigt werden (Girrbach und Strahl, 2003; Schmidt, 2007) was vermuten lässt, dass die einzelnen Protein O-Mannosyltransferasen nicht autark, sondern im Komplex mit anderen Pmt's agieren, d.h. ihre Substrate erkennen und O-mannosylieren. Zudem scheinen die Isoformen der Pmt-Proteine keine redundante Funktionen zu haben.

1.3.1 Phänotypen von *pmt*-Mutanten in *C. albicans*

Bei *C. albicans* führen Deletionen in den *PMT*-Genen zur Ausbildung unterschiedlich starker pleiotroper Phänotypen. Die Ursache für die pleiotropen Phänotypen der verschiedenen *pmt*-Mutanten ist auf die reduzierte Mannosylierung von Pmt-Zielproteinen zurückzuführen. Hierdurch kommt es zum Funktionsverlust, mangelnder Stabilität oder zur Dysfunktion solcher O-glykosylierter Proteine mit schwerwiegenden Folgen für die Zelle. Timpel *et al.* (1998) charakterisierten die *pmt1*-Mutanten in *C. albicans*. Eine homozygote *pmt1*-Mutante weist ein gestörtes Hyphenwachstum, eine erhöhte Aggregation der Zellen in Flüssigmedium und diverse Sensitivitäten gegenüber Zellwand-schädigenden Substanzen, Azolen und Hygromycin B auf. Ähnliche Phänotypen wurden auch bei der *pmt4*-Mutante und der heterozygoten *PMT2/Δpmt2*-Mutante in *C. albicans* beobachtet (Prill *et al.*, 2005). Eine *pmt1*-Mutante und eine heterozygote *PMT2/Δpmt2*-Mutante ist jeweils temperatursensitiv (Wachstum bei 42 °C). Prill *et al.* (2005) zeigten ferner, dass *PMT2* in *C. albicans* ein essentielles Gen ist, da eine Disruption beider Allele zur Letalität der Mutante führt. Einen solchen letalen Phänotyp durch Disruption einer Protein O-Mannosyltransferase konnte neben den homozygoten *pmt2*-Mutanten sonst nur für *pmt1 pmt4*-Doppelmutanten gezeigt werden (Prill *et al.*, 2005). Aufgrund der verstärkten Bildung von Aggregaten und ihrer erhöhten Hydrophobizität ist es nicht verwunderlich, dass in *pmt1* und *pmt4*-Mutanten eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand vorliegt. So konnte gezeigt werden, dass bei diesen Mutanten der Anteil an β1-3-Glukanen und Chitin stark erhöht und der Anteil an Mannoproteinen stark gesenkt ist. Für die disruptierten Stämme der anderen Pmt-Isoformen konnten lediglich schwache Phänotypen in Bezug auf hyphales Wachstum gezeigt werden. Die Virulenz jedes der fünf *pmt*-Mutanten war allerdings in unterschiedlichen Virulenztests stark eingeschränkt (Rouabhia *et al.*, 2005). In Abb. 1.4 ist das hyphale Wachstum der hetero- und homozygoten *pmt*-Mutanten im Vergleich mit einem Wildtypstamm dargestellt. Aufgrund der starken Ausprägung diverser Phänotypen ihrer Mutanten sind die Isoformen Pmt1, Pmt4 und Pmt2 entscheidend für Integrität und Lebensfähigkeit der Hefen. Anhand der *pmt*-Mutanten in *C. albicans* wurden von Cantero *et al.* (2007) genomweite Transkriptomanalysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Expression einiger Gene für die Glykolyse und die Glycerol-Produktion in den *pmt*-Mutanten stark erniedrigt war. Es wurde angenommen, dass die Zelle so den osmotischen Druck auf die geschwächte Zellwand verringert und Kompensationsreaktionen durch Glykosylierung erhöht. Ferner sind die Transkriptspiegel für Komponenten des UPR („unfolded protein response“)-Weg erhöht, was

zeigt, dass die *O*-Mannosylierung durch Pmt1 bei der Faltung von Proteinen im sekretorischen Pfad eine Rolle spielt (Cantero *et al.*, 2007).

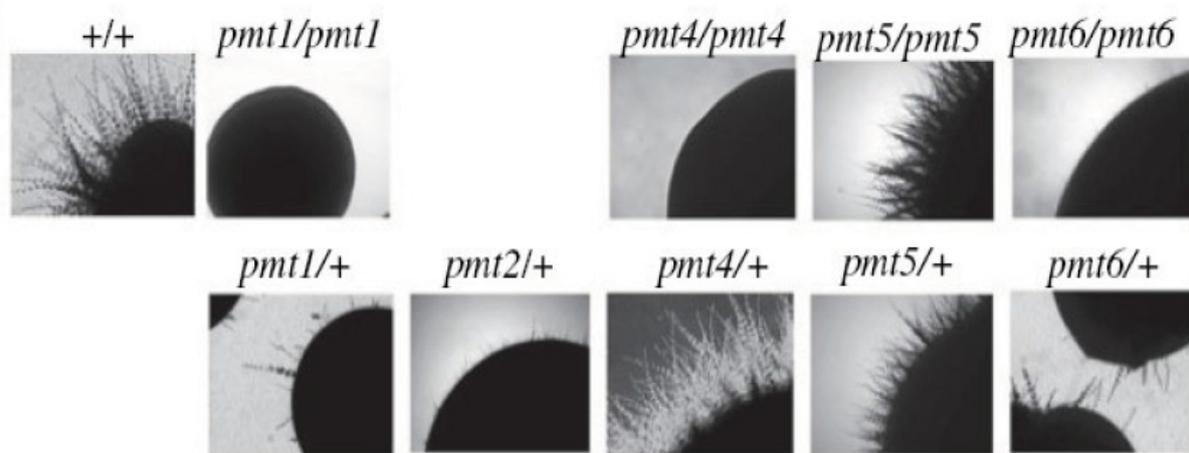


Abb. 1.4: Hyphales Wachstum der *pmt*-Mutanten auf Festmedium unter hypheninduzierenden Bedingungen

Kolonien von Wildtyp (links), heterozygoten (oberer Reihe) und homozygoten (untere Reihe) *pmt*-Mutanten auf Festmedien unter hypheninduzierenden Bedingungen. Die Abbildung wurde von Prill *et al.* (2005) entnommen.

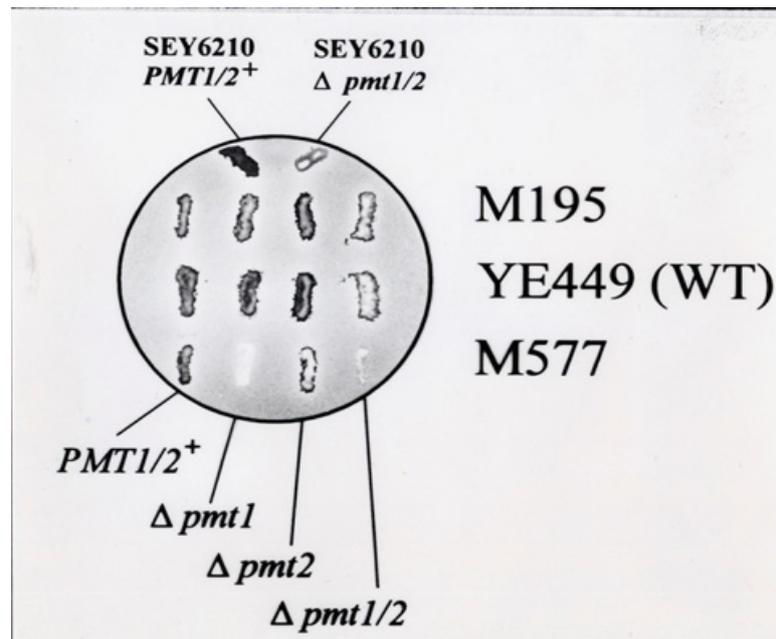
Cantero und Ernst (2011) konnten zeigen, dass die Zelle bei einer Schädigung der Zellwand sowie bei defekter *N*- und *O*-Glykosylierung mit der Aktivierung des Msb2-Cek1-Weges reagiert. In *C. albicans* ist diese Signalkaskade an Wachstum, Hyphenbildung und Zellwandbiogenese beteiligt und besteht aus den Msb2-, Sho1-, Cst20-, Ste11-, Hst7-, Cek1 (MAPK)-Proteinen und dem Cph1-Transkriptionsfaktor (Román und Pla, 2013). Msb2 ist ein Membransensor-Protein, welches auf Schäden in der Zellwand oder im Glykosylierungsstatus der Zellwandproteine mit der Signalweitergabe bis hin zur MAP-Kinase Cek1 reagiert. Im Falle einer defekten *O*-Glykosylierung, z.B. bei Deletionen in *PMT1*, *PMT2* oder *PMT4*, wird durch die Aktivierung des Msb2-Cek1-Weges die Expression der anderen Isoformen reguliert (Cantero und Ernst, 2011). So wurde zwischen einigen *Pmt*-Isoformen eine kompensatorische Regulation beobachtet, z.B. die starke Erhöhung des *PMT1*-Transkriptspiegels in einer *pmt4*-Mutante. Interessanterweise kommt es im Falle einer *pmt1* oder *pmt2*/*PMT2*-Mutante aber auch zur negativen Regulation des *PMT6*-Gens (Cantero *et al.*, 2007). Bei intakter *N*-Glykosylierung wird die *PMT1*-Transkription durch unphosphoryliertes Cek1 reprimiert. Im Falle einer defekten *N*- oder *O*-Glykosylierung sowie bei Zellwand-Schäden wird Cek1 phosphoryliert und erhöht die Expression von *PMT1* (defekte *N*-Glykosylierung), *PMT2* und *PMT4* (defekte *O*-Glykosylierung). Es wurde angenommen, dass der Cek1-Weg durch eine Interaktion zwischen Msb2, Sho1 und Cdc42 aktiviert wird (Román *et al.*, 2009). Neben seiner Funktion im Membransensor im Cek1-Weg zeigten Szafranski-Schneider *et al.* (2012) weiterhin, dass das Protein Msb2 durch Pmt1 stark *O*-glykosyliert und massiv in das umliegende Medium sezerniert wird, um die Zelle vor antimikrobiellen Peptiden zu schützen. Zellen mit unterglykosyliertem Msb2, z. B. in einer *pmt1*-Mutante sind wesentlich anfälliger gegenüber antimikrobiellen Peptiden.

1.4 Andere Mutationen, welche die Pmt-Mannosylierung beeinflussen

Im Rahmen einer Untersuchung zu *O*-Glykosylierungsdefekten von heterolog exprimiertem „human insulin-like growth factor 1“ (hIGF1) in *S. cerevisiae* wurden von Finck *et al.* (1996) zwei Mutanten (M195 und M577) isoliert. Da die Mutanten außer einer verringerten hIGF-1 *O*-Mannosylierung keine Phänotypen zeigten, wurde nach synthetischen Phänotypen im Hintergrund einer *pmt1*- und *pmt2*-Deletion gesucht. Dabei wurde getestet, inwieweit die Stämme resistent gegenüber dem K1-Killertoxin sind. Eine erhöhte Resistenz gegenüber K1-Killertoxin ist oftmals ein Hinweis auf eine defekte Glykosylierung in *S. cerevisiae* (Häusler *et al.*, 1992). In Abbildung 1.5 ist ein solcher Test aus der Dissertation von Wickert (1998) dargestellt.

Abb. 1.5: Test auf Sensitivität gegenüber K1-Killertoxin

Stämme mit defekter *O*-Glykosylierung des heterolog exprimierten hIGF-1 (M195 und M577) sowie der Wildtypstamm YE449 tragen zusätzlich die angegebenen *pmt1*- und *pmt2*-Deletionen und wurden auf Indikator-Platten mit einem Rasen eines K1-Killertoxin-produzierenden Hefestammes ausgestrichen. Im Falle einer Sensitivität sterben die Zellen und die Kolonien färben sich dunkel. Als Kontrolle wurde der Stamm SEY6210 mit intakten *PMT1/2*-Genen (links) und im Hintergrund einer *pmt1*- und *pmt2*-Deletion (rechts) verwendet. Abbildung übernommen von Wickert (1998)



Während Wildtypstämme, die Mutanten M195 und M577 sowie die *pmt1*- und *pmt2*-Deletionen keine Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin zeigten, wies die Mutante M577 mit einer zusätzlichen *pmt1*- und teilweise mit einer *pmt2*-Deletion eine erhöhte Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin auf. Wickert (1998) zeigte damit, dass die bis dahin unbekannte Mutation im Stamm M577 in Kombination mit einer *pmt1*-Mutante einen synthetischen Phänotyp aufwies. Im Stamm M195 dagegen konnte kein synthetischer Phänotyp in Kombination mit *pmt1*- oder *pmt2*-Mutationen verzeichnet werden. Die Mutante M577 mit der zusätzlichen *pmt1*-Deletion wurde daraufhin mit einer genomischen Bank transformiert und auf Transformanten untersucht die den synthetischen Phänotyp komplementieren konnten (d.h. die zu K1-Killertoxin-Sensitivität führten). Aus 17 Transformanten, welche die erhöhte Resistenz gegenüber K1-Killertoxin aufheben konnten, wurden anhand von überlappenden Gensequenzen zwei kodierende genomische Bereiche identifiziert. Einer dieser Bereiche befand sich auf Chromosom XIV (*DOM34*), der andere auf Chromosom IX (*YIL001w*); beide Gene waren jeweils in Nähe des Centromers lokalisiert. Daraufhin wurden *dom34 pmt1*- und *yil001w pmt1*-Doppelmutanten hergestellt und auf ihre Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin getestet. Wie sich zeigte, wies nur die *dom34 pmt1*-

Doppelmutate, jedoch nicht die *yil001w pmt1*-Doppelmutante, eine erhöhte Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hygromycin B auf (Wickert, 1998). In *S. cerevisiae* konnte der Phänotyp der *dom34 pmt1*-Doppelmutate nicht nur durch eine Überexpression von *DOM34*, sondern auch durch eine Überexpression von *YIL001w* unterdrückt werden. Diese Ergebnisse lassen einen engen funktionellen Zusammenhang der Proteine Pmt1, Dom34 und Yil001w in *S. cerevisiae* vermuten. Das *DOM34*-Homolog (*ORF19.2419*) wurde daraufhin auch in *C. albicans* untersucht. Hilbig (2010) zeigte für *CaDOM34* ebenso eine genetische Interaktion mit *CaPMT1*. Bislang gab es keinerlei Untersuchungen zu dem zu *YIL001w*-homologen Gen aus *C. albicans* (*PSG1/ORF19.7010*), welches Thema dieser Arbeit ist.

1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Da sich im Verlauf dieser Arbeit zeigte, dass Psg1 eine sehr hohe Homologie zum Btb3-Protein aus *S. pombe* aufweist und Btb3 ein Substratadaptor für einen Ubiquitinligase-Komplex ist, wird an dieser Stelle auf das Ubiquitin-Proteasom-System eingegangen. Ein Beispiel für die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems ist die Erkennung und Degradierung fehlgefalteter Proteine, welche im Zuge des UPR-Weges über ERAD aus dem ER herausgeschleust werden. Die Degradierung von Proteinen ist ein wichtiger Prozess für die Zelle und erfolgt vorwiegend über das Ubiquitin-Proteasom-System (Ciechanover *et al.*, 1984; Rock *et al.*, 1994). Hierbei wird Ubiquitin kovalent durch eine Kaskade von Enzymen an das Lysin eines Zielproteins übertragen. Die Ubiquitinierung eines Zielproteins läuft in mehreren Schritten unter Beteiligung diverser Enzyme ab. Der erste Schritt innerhalb dieser Kaskade ist die ATP-abhängige Aktivierung des Ubiquitins. Dieser erfolgt durch das E1-Enzym oder auch Ubiquitin-aktivierendes Enzym. Das so entstandene E1-Ubiquitin-Konjugat weist eine erhöhte Affinität zum E2-Enzym oder Ubiquitin-konjugierendem Enzym auf, welches den Transfer des Ubiquitins auf ein Cystein im aktiven Zentrum des E2-Enzyms unter Bildung einer neuen Thioesterbindung katalysiert. Das E2-Enzym interagiert im letzten Schritt mit der E3 Ubiquitinligase, wodurch es zur Ausbildung einer Isopeptidbindung des Ubiquitins mit dem an der E3-Ubiquitinligase gebundenen Zielproteins kommt. Diese Vorgänge wiederholen sich nun und führen zur Entstehung einer Ubiquitinkette an einem Lysinrest des Zielproteins. Li *et al.* (2007) zeigten, dass diese Ubiquitinkette in einigen Fällen auch komplett am E2-Enzym zusammengebaut wird und dann „en bloc“ auf das Zielprotein überertragen wird. Durch den Aufbau und Anhängen einer Ubiquitinkette wird das zu degradierende Protein markiert und abgebaut. Ferner dient Monoubiquitinierung am Lys48 als Signal zum proteolytischen Abbau durch Internalisation Membran-gebundener Proteine in Vakuolen, dem Äquivalent des Lysosoms aus Säugern (Galan und Hagenauer-Tsapis, 1997). Dies konnte in *S. cerevisiae* am Beispiel des G-Protein gekoppelten Rezeptors Ste2 gezeigt werden (Terrel *et al.*, 1998).

Ubiquitin wurde schon 1974 als Protein isoliert (Goldstein, 1974) und galt kurze Zeit in Säugerzellen als allgegenwärtig (ubiquitär) exprimiertes Protein, was auch zum Namen führte. Das Protein besteht aus 76 Aminosäuren und ist innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert. Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, dass Ubiquitin und ubiquitin-ähnliche Proteine wie SUMO, neben dem proteolytischen Abbau von Proteinen an einer Vielzahl

anderer zellulärer Prozessen, wie z.B. DNA-Reparatur, Zellzyklus-Kontrolle und Signaltransduktion, beteiligt sind. (Spence *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2000; Barriere *et al.*, 2007; Panier und Durocher 2009). Dabei spielen die Lysinreste, mit denen die Ubiquitine innerhalb einer solchen Ubiquitinkette miteinander verbunden sind, eine entscheidende Rolle. Ubiquitinierung an Lysinresten wurde bisher an sieben bekannten Stellen beobachtet (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63), wobei die Auswirkungen von Ubiquitinierungen entsprechend ihrer Positionen stark variieren können. Zudem variieren neben den möglichen Positionen auch die Typen der Ubiquitinaddition. So kommt es neben geradliniger Mono- und Polyubiquitinierung auch zur Ausbildung verzweigter Strukturen (Kulathu und Komander, 2012). Ubiquitinierungen an den Positionen K48 und K63 sind bisher am besten untersucht. Im Falle des proteolytischen Abbaus von Proteinen sind die Ubiquitinketten am Lys48 miteinander verbunden und markieren Zielproteine für den Abbau im Proteasom (Chau *et al.*, 1989). Neben der Polyubiquitinierung am Lys48, als Markierung für den proteolytischen Abbau, fungiert eine Ubiquitinierung am Lys63 als molekularer Schalter für verschiedene Funktionen, wie Aktivierung von Kinasen, DNA-Reparatur und Chromatin-Modulation (Chen und Sun, 2009).

1.5.1 E3-Ubiquitinligasen

E3-Ubiquitinligasen sind oftmals membranständige Proteine, die für die Rekrutierung des E2-Enzyms und mithilfe ihrer Substratadaptoren für die Substraterkennung verantwortlich sind (Buso und Kipreos, 2008). Zusammen mit anderen Proteinen bilden sie meist Multiproteinkomplexe, die das aktivierte Ubiquitin zum jeweiligen Zielprotein transferieren (Liu und Xue, 2011). Generell werden E3-Ubiquitinligasen in zwei strukturelle Klassen unterteilt: Die HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus)-Proteine und die RING (really interesting new gene)-Proteine. HECT-E3 Ligasen bilden dabei einen großen monomeren, katalytischen Komplex, der direkt mit dem E2-Enzym und dem Zielprotein interagiert und somit die Ubiquitinierung vermittelt (Abb. 1.6 A). Dies geschieht mittels eines konservierten Cysteins, auf welches das aktivierte Ubiquitin vom E2-Enzym auf die E3-Ubiquitinligase übertragen wird. Im Anschluss wird dieses Ubiquitin mit einem Lysinrest des Zielproteins verbunden (Rotin und Kumar, 2009). Im Gegensatz zu den HECT-E3 Ligasen vermitteln die RING-E3 Ligasen die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym zum Substrat direkt und ohne vorherige Übertragung des Ubiquitins auf das E3-Enzym (Abb. 1.6 B). Dabei fungieren RING-E3 Ligasen wie Gerüstproteine („scaffolds“), die dafür sorgen, dass das Zielprotein und das E2-Enzym in räumliche Nähe gebracht werden, um die direkte Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf das Zielprotein zu gewährleisten. Die RING-Domäne dieser E3-Enzyme enthält eine erhöhte Anzahl an Cystein- und Histidinreste. Diese sind wichtig für die Koordination zweier Zinkionen, wodurch die globuläre Struktur der RING-Domäne aufrecht erhalten werden und das E2-Enzym gebunden werden kann (Deshaies und Joazeiro, 2009). Nach Bindung des E2-Enzyms erfolgt die direkte Übertragung des gebundenen Ubiquitins vom E2-Enzym auf den Lysinrest des Substrats, welches ebenfalls am E3-Enzym gebunden ist. Die RING-E3 Ligasen lassen sich zudem noch in monomere RING-Ligasen und multimere RING-Ligasen, welche in Multikomponenten-Komplexen vorliegen, unterteilen (Abb. 1.6 C).

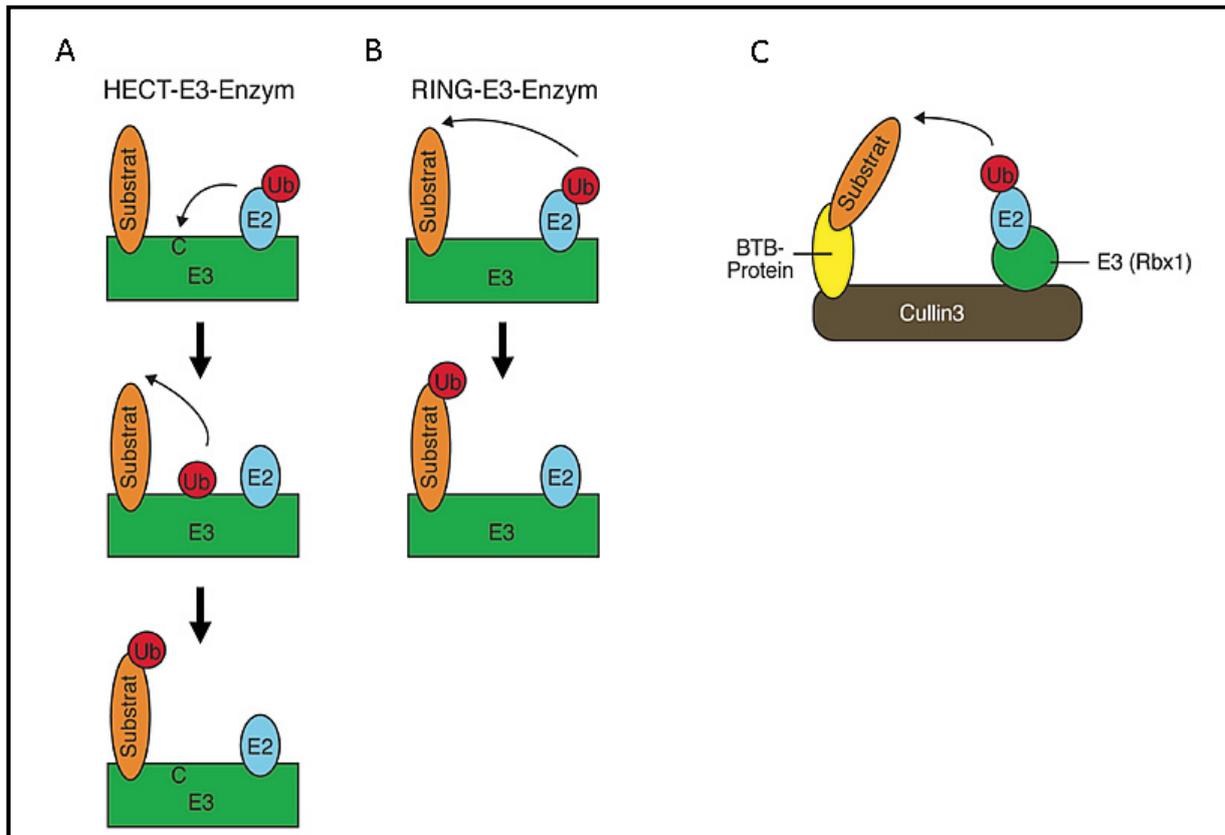


Abb. 1.6: Katalysemechanismus von HECT- und RING-E3-Enzymen

A) HECT E3-Enzyme verknüpfen das Ubiquitin vom E2-Enzym mit ihrem konservierten Cystein. Von dort aus erfolgt der Transfer des Ubiquitin vom E3-Enzym zum Substrat. B) RING E3-Enzyme vermitteln den direkten Transfer des Ubiquitin vom E2 zum Substrat ohne das Ubiquitin auf das E3-Enzym transferieren zu müssen. C) Oftmals sind solche RING E3-Ubiquitinligasen Bestandteile multimerer Proteinkomplexe, wie dies am Beispiel eines Cullin 3 Ubiquitinligase-Komplexes verdeutlicht ist. Cullin 3 Ubiquitinligase-Komplexe bestehen aus Cullin3, einem BTB-Protein und der RING E3-Ubiquitinligase Rbx1. Das Substrat wird spezifisch durch das BTB-Protein gebunden und durch das Cullin 3, welches hier als Gerüstprotein fungiert, in räumliche Nähe zum E2-Enzym gebracht, welches durch die RING-Domäne von Rbx1 gebunden ist und die Ubiquitinierung des Substrats vermittelt. Übernommen von Deshaies und Joazeiro (2009), modifiziert von Steffen (2010)

Im Gegensatz zu den monomeren RING-Ligasen werden bei multimeren RING-Ligasen das RING-Enzym sowie andere Faktoren an ein Gerüstprotein gebunden wodurch sich ein Multikomponenten-Komplex ausbildet. Beispiele hierfür sind die SCF-Familie (Skp1/Cullin/F-box/Rbx1/2), die auch in *C. albicans* bereits charakterisiert werden konnten (Trunk *et al.*, 2011), oder die Cullin 3-basierten Ubiquitinligase-Komplexe. Diese Komplexe bestehen aus einer RING-Finger E3-Ligase in verschiedenen Kombinationen mit einem Cullin-Protein, einem Adaptor (Skp1, Elongin) und einem Substrat-bindendem Protein (F-Box, SOCS). Eine Ausnahme bilden Cullin 3-basierte Ubiquitinligase-Komplexe. Hier übernehmen Proteine mit BTB-Domänen die Rolle von Adaptorprotein und Substrat-bindendem Protein. Unter den Multikomponenten-Komplexen der RING E3-Ubiquitinligasen ist die Gruppe der Cullin-RING-Ubiquitinligasen (CRL) am größten (Buso und Kipreos, 2008). Wie auch schon für die Multikomplex-E3-Ligasen beschrieben, bestehen CRL-Komplexe aus einem Cullin, einem RING H2-finger Protein, einer Substraterkennungs-Untereinheit ("substrate-recognition subunit"-SRS) und, mit Ausnahme von Cul3-basierten CRL-Komplexen, aus einer Adaptor-Untereinheit, welche die Substraterkennungs-

Untereinheit mit dem Komplex verbindet (Buso und Kipreos, 2008). CRL-Komplexe gibt es in vielen verschiedenen Zusammensetzungen, weswegen eine Unterteilung dieser Komplexe anhand der Cullin-Komponente erfolgte. In mehrzelligen Organismen konnten bisher fünf Typen von Cullin-Proteinen beschrieben werden (Cul1-5). Buso und Kipreos (2008) unterteilten die CRL-Komplexe ausgehend von ihren Cullin-Proteinen in fünf Subklassen (Abb. 1.7). Nicht berücksichtigt ist hierbei Cul7, welches mit anderen Komponenten vermutlich einen Vertebraten-spezifischen Multiproteinkomplex bildet (Skaar *et al.*, 2007).

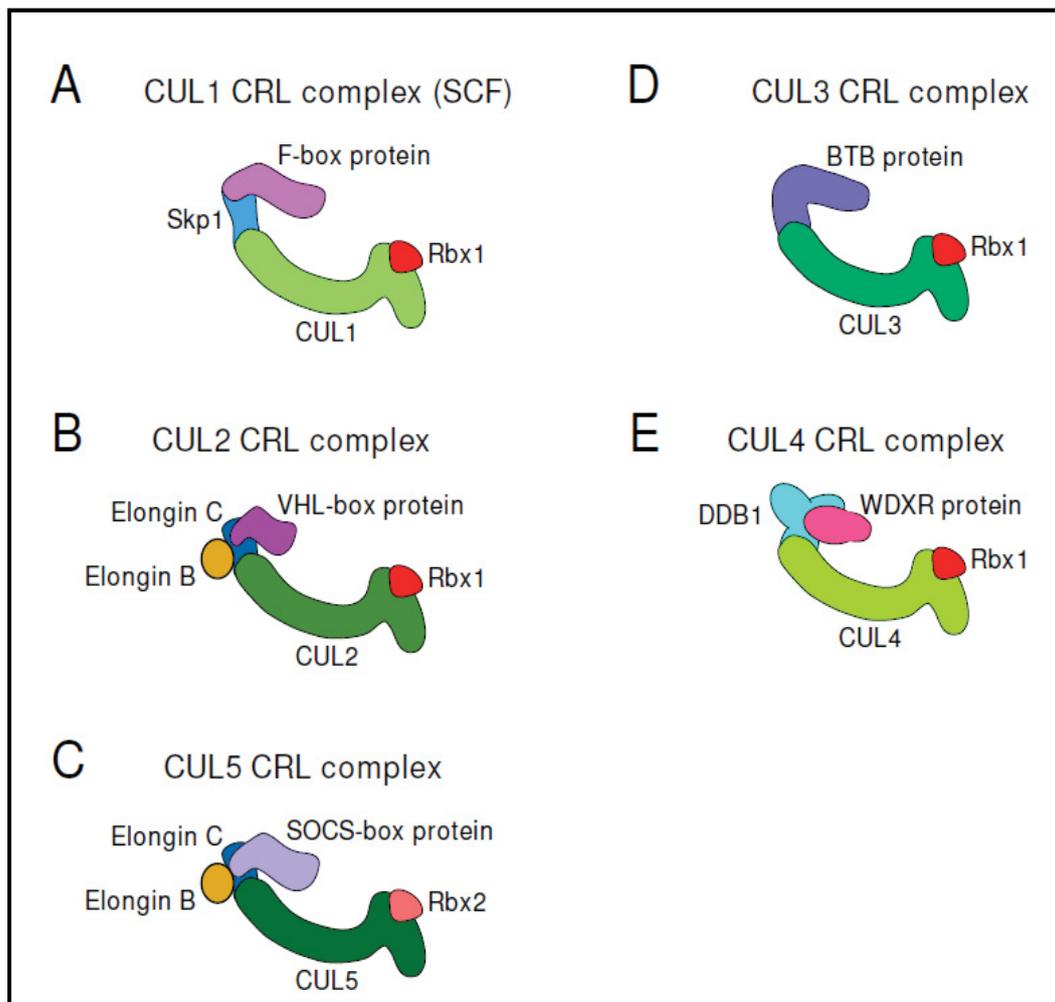


Abb.: 1.7 Struktur der verschiedenen CRL-Komplexe

Die Strukturen der einzelnen CRL-Komplexe mit ihren jeweiligen Komponenten sind hier schematisch dargestellt. Die Abbildung wurde von Bosu und Kipreos (2009) übernommen.

Für *S. cerevisiae* wurden von Lee *et al.* (2008) alle Enzyme und Substrate, die eine Rolle im Prozess der Ubiquitinierung innerhalb der Bäckerhefe spielten, in einer Datenbank (SCUD: „*Saccharomyces Cerevisiae* Ubiquitination Database“) aufgelistet. Neben der Unterteilung in RING- und HECT-Familie werden RING E3-Ubiquitinligasen, ausgehend von ihrer Zusammensetzung, noch in mehrere Subkategorien unterteilt: Die SPRF („single protein Ring Finger)-Subkategorie, die SCF (Skp1, Cdc53 und F-Box)-Subkategorie, die ECS (Elc1, Cul3 und SOCS/BC-Box)-Subkategorie, die U-Box-Subkategorie sowie den APC („anaphase promoting complex“). In *C. albicans* konnte bisher der neben dem APC (Barford, 2009), der Cullin 1-basierte SCF-Komplex mit einigen F-Box Adapterproteinen ausführlich untersucht

werden (Li *et al.*, 2011; Sela *et al.*, 2011). In *S. cerevisiae* katalysiert der SCF, neben der Ubiquitin-abhängigen Degradierung von Proteinen, die Phosphorylierungs-abhängige Ubiquitinierung von G1-Cyklinen und Cdk-Inhibitoren. Weiterhin spielt der SCF eine Rolle in der Regulation einiger Transkriptionsfaktoren, welche in der Regulation der G2 und M-Phase involviert sind.

1.5.2 Die BTB-Domäne

Die BTB-Domäne ist ein, in Eukaryoten weit verbreitetes, konserviertes Bindemotiv und agiert primär als Protein-Protein Interaktionsdomäne. Namensgebend war das gemeinsame Vorkommen bei Transkriptionsregulatoren in *D. melanogaster* (Broad-Complex, Tramtrack, Bric à brac) (Bardwell und Treisman, 1994). Da das Motiv auch in Proteinen von Poxviren in Kombination mit Zinkfingerstrukturen gefunden wurde, wird es stellenweise auch als POZ-Domäne (poxvirus and zinc finger) bezeichnet. Mittlerweile geht man bei der BTB-Domäne von einer konservierten Basisstruktur aus, welche trotz Unterschiede in der Aminosäuresequenz einiger BTB-Proteine zu einer Faltungsstruktur in ihrem Kern konserviert ist (Stogios *et al.*, 2005). Diese konservierte BTB-Faltung umfasst lediglich 95 Aminosäurereste und besteht aus fünf dicht gepackten, alternierenden α -Helices und drei kurzen β -Faltblättern. In den meisten Fällen agiert die BTB-Domäne als Protein-Protein Interaktionsdomäne sowohl bei Interaktionen mit anderen BTB-Proteinen, wie auch bei Interaktionen mit Proteinen ohne BTB-Domäne. Oftmals weisen Proteine mit BTB-Domänen ein zweites Strukturmotiv auf, wie z. B. die BTB-Zinkfinger, BTB-MATH und BTB-KELCH Proteine. Ausgehend von diesen zusätzlichen Strukturmotiven variiert auch die funktionellen Aufgabe der BTB-Domäne. Einige dieser funktionellen Aufgaben von BTB-Domänen umfassen Transkription, Zytoskelett-Regulation sowie Tetramerisierung und Regulation von Ionenkanälen (Stogios *et al.*, 2005). Weiterhin konnte in *S. pombe* und *C. elegans* Cullin 3 als Interaktionspartner von Proteinen mit BTB-Domänen identifiziert werden. (Xu, *et al.*, 2003; Furukawa *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2003).

1.6 Zielsetzung

O-Glykosylierung hat für die Virulenz von *C. albicans* eine wichtige Bedeutung. Die Identifizierung neuer Gene, deren Produkte an der *O*-Glykosylierung von Glykoproteinen beteiligt sind, hat daher aus medizinischer Sicht eine hohe Relevanz, da sie Zielpunkte neuer Antimykotika darstellen könnten. In *S. cerevisiae* wurde das Gen *YIL001w* als potenzieller Faktor für die *O*-Glykosylierung identifiziert, daher sollte das homologe Gen *PSG1* in *C. albicans* ebenfalls untersucht werden.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Gen *PSG1* („Pmt-Suppressor-Gene 1“) ist ein bisher nicht charakterisiertes Gen in *C. albicans* und eines von insgesamt zwei Genen in mit BTB-Domänen. Aufgrund dieser Domäne und der Funktion homologer Gene könnte *PSG1* für den Substratadaptor einer Cullin 3-basierten E3-Ubiquitinligase kodieren. Ferner zeigen Untersuchungen mit dem homologen Gen *YIL001w* aus *S. cerevisiae*, dass Deletionen die *O*-Glykosylierung von heterolog exprimiertem hIGF-1 beeinflussen. Da zwischen *O*-Glykosylierung und dem Ubiquitin-basiertem Abbau fehlgefalteter Proteine aufgrund der räumlichen Nähe beider Prozesse eine wechselseitige Beeinflussung denkbar ist, könnte *Psg1* an dieser Wechselwirkung beteiligt sein.

In dieser Arbeit sollten neben einer umfassenden bioinformatischen Analyse der Nukleotid- sowie der Aminosäuresequenz des Gens bzw. des Genprodukts, zunächst *psg1*-Disruptionsmutanten von *C. albicans* hergestellt und auf ihre Phänotypen untersucht werden. Mittels einer Epitop-Markierung sollte versucht werden, das Psg1-Protein nachzuweisen und über Immunfluoreszenz in der Zelle zu lokalisieren. Zudem sollte herausgefunden werden, ob Psg1 an der *O*-Glykosylierung in *C. albicans* beteiligt ist und welchen Einfluss eine Überexpression des *PSG1*-Gens auf verschiedene *pmt*-Mutanten hat. Um weitere Aussagen über eine Funktion des Proteins machen zu können, wurde eine genomweite Transkriptanalyse an *psg1*-Mutanten sowie eine Suche nach potenziellen Interaktoren mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid-Bisacrylamid, BCIP, Glasperlen, Glycerin, KCl, NBT, PEG, Roti-Phenol, (Roth)
Agarose (Gibco BRL)
Ampicillin, BSA, Ethidiumbromid, SDS (Serva)
Bromphenol Blau (Janssen)
DNA Purification Kit, Gel Extraction Kit (Machery-Nagel)
Glukose (Caesar & Lorentz GmbH)
Heringssperma-DNA, Trizol (Invitrogen)
Hybond N (Amersham/Pharmacia)
Hygromycin B (Calbiochem)
ImmobilonP-Membran (Millipore)
Isopropanol, Maleinsäure (Fluka)
Klenow-Polymerase, Blocking-Reagenz, DIG-UTP-Labeling and Detection-Kit (Roche)
Magermilchpulver, HEPES (Applichem)
Natriumchlorid, Isopropanol (J. T. Baker)
Proteinase-Inhibitoren, „Complete Mini EDTA-free“ (Roche)
Restriktionsenzyme, PNGaseF (NE Biolabs)
Proteinmarker (Fermentas, Invitrogen)
Plasmid Purification Kit, (Qiagen)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)
Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification, Tunicamycin (Sigma-Aldrich)
YNB w/o amino acids, Casamino acids, Hefeextrakt, Pepton (Difco Laboratories)
Zymolyase (Seikagaku Kogyo Co. Ltd.)
X-GAL (Biotech Trade & Service GmbH)

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

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

Tab 2.1: verwendete *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Quelle
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80(<i>lacZ</i> ΔM15) Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
DH5_F'	F ⁻ [Φ80Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA1 relA</i>	(Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

2.2.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab 2.2: verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Name	Genotyp	Quelle
pJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4</i> Δ <i>gal80</i> Δ <i>LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

2.2.3 *C. albicans*-Stämme

Tab 2.3: verwendete *C. albicans* Stämme

Name	Genotyp	Quelle
SC5314	prototroph	Gillum <i>et al.</i> , (1984)
BWP17	<i>ura3</i> Δ:: <i>imm434/ura3</i> Δ:: <i>imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG arg4::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , (1999)
CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin (1993)
CAF2-1	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin (1993)
CAP1-3121	wie CAI4, aber <i>pmt1</i> Δ:: <i>hisG/pmt1</i> Δ:: <i>hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> (1998)
P2-22	wie CAI4, aber <i>PMT2/pmt2</i> Δ:: <i>hisG</i>	Prill <i>et al.</i> (2005)

Name	Genotyp	Quelle
CAP4-2164	wie CAI4, aber <i>pmt4Δ::hisG/pmt4Δ::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> (2005)
P5-5744	wie CAI4, aber <i>pmt5Δ::hisG/pmt5Δ::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> (2005)
SK47	wie CAI4, aber <i>dom34::FRT/dom34::FRT</i>	Kluge (2006)
SK24	wie CAI4, aber <i>pmt1::hisG/pmt1::hisG</i> <i>dom34::FRT/dom34::FRT</i>	Kluge (2006)

Tab 2.4: In dieser Arbeit hergestellte *C. albicans* Stämme

Name	Genotyp	Quelle
CSU2	wie BWP17 aber <i>PSG1/psg1Δ⁸⁻³⁵¹::ARG4</i>	Diese Arbeit
CSU3	wie BWP17 aber <i>psg1Δ⁸⁻³⁵¹::ARG4/psg1Δ⁸⁻³⁵¹::HIS1</i>	Diese Arbeit
CSU4	wie CSU3	Diese Arbeit
CSU5	wie CSU2, aber <i>PSG1^{3xHA}::URA3</i>	Diese Arbeit
CSU6	wie CSU5	Diese Arbeit
CSU7	wie CSU5	Diese Arbeit
CSU8	wie CAI4, aber mit Plasmid pDS-YIL [S-5]; frei replizierend	Diese Arbeit
CSU11	Wie CSU3, aber mit Plasmid pDS-YIL [S-5]; frei replizierend	Diese Arbeit
CSU12	Wie CSU4, aber mit Plasmid pDS-YIL [S-5]; frei replizierend	Diese Arbeit
CSU13	Wie CSU3, aber mit Plasmid pDS1044-1 frei replizierend	Diese Arbeit

CAI4+pBI-1	Wie CAI4 aber mit Plasmid pBI-1	Diese Arbeit
CAI4+pDS1044-1	Wie CAI4 aber mit Plasmid pDS1044-1	Diese Arbeit

2.2.4 *C. albicans* Stammkonstruktion

Für die Konstruktion des Stammes CSU2 (*PSG1*/Δ*psg1*) wurde durch PCR mit dem Plasmid pRS-ARG4 (Wilson *et al.*, 1999) als Template und den Primern oSU5 und oSU12 ein 2,76 kb Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt eine *ARG4*-Kassette und homologe Überhänge zum N-terminalen Bereich des Leserasters *orf19.7010* aus *C. albicans*. Dieses PCR-Produkt wurde in den Stamm BWP17 transformiert. Transformanten wurden auf Histidin- und Uridin-haltigen SD-Platten selektiert. Über Kolonie-PCR mit den Primern oSU16 und oSU18 wurde ermittelt, ob der Leseraster durch die *ARG4*-Kassette disruptiert wurde. Bei positiven Transformanten konnte ein 1 kb-langes Fragment amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ferner wurden positive Transformanten über eine Southern-Analyse verifiziert (Abschnitt 2.4.11). Die genomische DNA aus den Transformanten wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Zur Hybridisierung wurden zwei Sonden eingesetzt. Eine Sonde hybridisiert mit dem *ARG4*-Gen, die andere Sonde hybridisiert mit dem N-terminalen Bereich des *PSG1*-Gens. Bei einer positiven Insertion der *ARG4*-Kassette konnte eine Bande in Höhe von 2,9 kb detektiert werden. Die Bande des Wildtypstammes hatte eine Größe von 4,4 kb (Abb. 2.1).

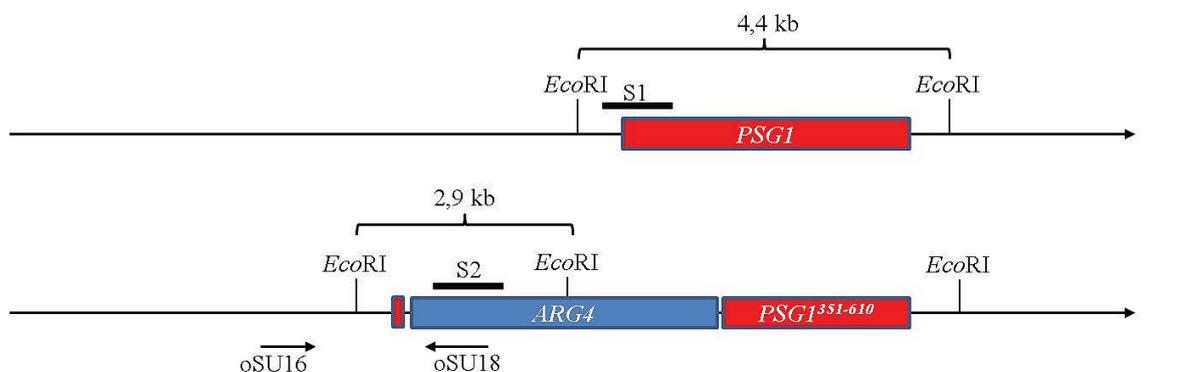
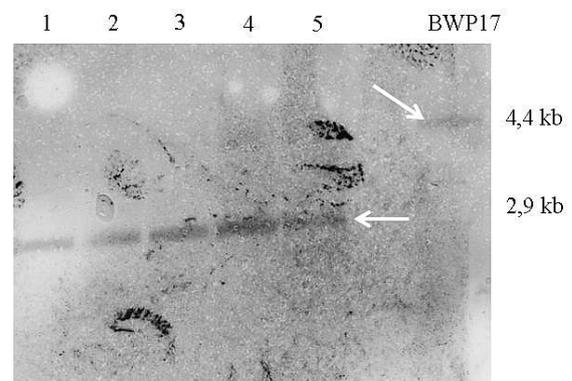


Abb. 2.1: Schematische Darstellung und Auswertung der Southernblot-Analyse bei der Konstruktion von CSU2

Im oberen Bild ist der *PSG1*-Locus nach der Integration der *ARG4*-Kassette schematisch dargestellt. Die schwarzen Balken (S1 und S2) kennzeichnen jeweils die Hybridisierung der verwendeten Sonden. Des Weiteren sind mit Pfeilen die, für die Kolonie-PCR verwendeten Primer (oSU16 und oSU18) an ihren Bindestellen dargestellt. Im unteren Bild ist die Aufnahme des entwickelten Southern-Blots dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen die Banden der Transformanten (1-5) und die des Ausgangsstammes (BWP17).



Für die Konstruktion der Stämme CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) und CSU4 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) wurde mit dem Plasmid pGEM-HIS1 und den Primern oSU13 und oSU26 ein 2,5 kb-großes Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt eine *HIS1*-Kassette und homologe Überhänge zum N-terminalen Bereich des Leserasters *orf19.7010* aus *C. albicans*. Dieses PCR-Produkt wurde in den Stamm CSU2 (*PSG1/psg1* $\Delta^{8-351}::ARG4$) transformiert. Transformanten wurden auf Uridin-haltigen SD-Platten selektiert. Über Kolonie-PCR mit den Primern oSU3 und oSU11 wurde zudem ermittelt, ob das verbleibende *PSG1*-Allel durch die *HIS1*-Kassette disruptiert wurde. Bei positiven Transformanten konnte ein 1,2 kb-großes Fragment amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ferner wurden positive Transformanten über eine Southern-Analyse verifiziert (Abschnitt 2.4.11) Hierfür wurde genomische DNA aus den Transformanten mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnitten. Eine weitere Sonde wurde durch PCR mit den Primern oSU6 (bindet in *HIS1*-Gen) und oSU3 (bindet in *HIS1*-Gen) hergestellt. Als Template DNA diente die gDNA der Transformanten. Bei einer positiven Insertion der *HIS1*-Kassette konnte in der Southern-Analyse eine Bande in Höhe von 3,4 kb detektiert werden. Als Kontrolle diente die ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnittene gDNA des Stamms CSU2. Die verwendete Sonde kann hier, wie in Abb. 2.2 gezeigt, nicht spezifisch binden.

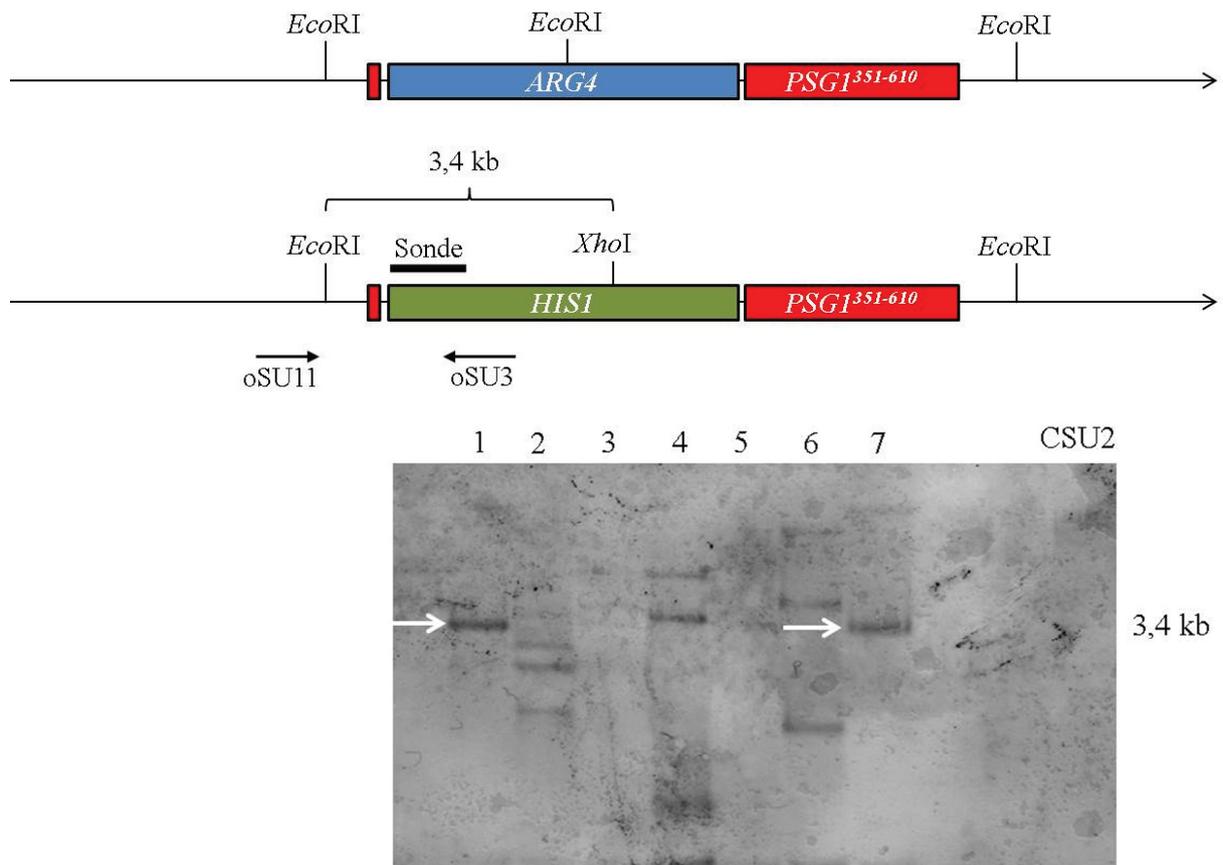


Abb. 2.2: Schematische Darstellung und Auswertung der Southernblot-Analyse bei der Konstruktion von CSU3 und CSU4

Im oberen Bild ist die Situation im *PSG1*-Lokus nach der Integration der *HIS1*-Kassette schematisch dargestellt. Im unteren Bild ist die Aufnahme des entwickelten Southern-Blots. Die gDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnitten. Durch schwarze Pfeile sind die Bindestellen der für die Kolonie-PCR verwendeten Primer oSU11 und oSU3 dargestellt. Die weißen Pfeile zeigen die Banden bei korrekter Insertion des PCR-Produktes der Transformanten (1-7).

2.2.5 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Medium (Luria *et al.*, 1960): 1 % Trypton (Pepton 140), 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl. Die Selektion in *E. coli* erfolgte durch Zugabe von Ampicillin auf eine Konzentration von 100 µg/ml. Festes Medium wurde durch Zugabe von 1,5 % Agar hergestellt. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C.

2.2.6 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD (Vollmedium):

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

SD (Minimalmedium):

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat), 2 % Glukose-Monohydrat

Zur Herstellung fester Medien wurde 2 % (w/v) Agar zugegeben. Die Sterilisation des Mediums erfolgte durch Autoklavieren. Im Anschluss wurden Zusätze, wie Glukose, aus sterilen Stocklösungen hinzugegeben. Aminosäuren, nach Zimmermann (1975), wurden ebenfalls ausgehend von einer sterilen Stocklösung hinzugefügt. Von diesem Aminosäure-Mix wurden 50 ml pro 1 l Medium zugesetzt. Das Wachstum der Hefen erfolgte bei 30 °C.

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

Adenin 0,28 g	Threonin 0,0375 g
Arginin 0,48 g	Methionin 0,024 g
Tyrosin 0,0375 g	Uracil 0,024 g
Isoleucin 0,072 g	Leucin 0,042 g
Lysin 0,0375 g	Tryptophan 0,024 g
Phenylalanin 0,06 g	Histidin 0,024 g
Valin 0,0375 g	

2.2.7 Medien zur Anzucht von *C. albicans*

YPD (Vollmedium):

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

YPM (Vollmedium):

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Mannitol

SD (Minimalmedium):

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammoniumsulfat), 2 % Glukose
pH 6,9 mit NaOH eingestellt

SCAA:

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammoniumsulfat), 4 %
Casaminosäuren

Serum-Medium:

10 % Pferde-Serum

Spider-Medium (Liu *et al.*, 1994):

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

Zur Herstellung fester Medien wurde 2 % Agar zugegeben. Jedes Medium wurde autoklaviert. Im Anschluss an das Autoklavieren wurden Zusätze, wie Serum und Glukose, aus sterilen Stocklösungen hinzugegeben. Die Anzucht der *C. albicans* Stämme erfolgte bei 30 °C oder bei 37 °C.

2.2.8 Sensitivitätstest

Die zu untersuchenden Stämme werden bei 30 °C über Nacht wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte und Einstellung von 1 ml Kultur auf OD₆₀₀ = 1. Mit dieser Kultur wurde eine Verdünnungsreihe 1/10 in 5 Schritten hergestellt, so dass die letzte Verdünnung eine OD₆₀₀ von 0,0001 aufwies. 5 µl jeder Verdünnung wurden auf die Platten mit den entsprechenden Zusätzen aufgetragen. Anschließend wurden die Platten bei 30 °C 24, 48, 72 oder 96 Stunden inkubiert und fotografiert.

2.2.9 Medien mit verschiedenen Substanzen

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

Hygromycin B:	200 µg/ml, 100 µg/ml, 80 µg/ml
Phloxin B:	5 µg/ml
Kongorot:	100 µ/ml
Caspofungin:	125 ng/ml
Pmt1 Inhibitor:	4 µg/ml
Tunicamycin:	2 µg/ml

2.2.10 Hypheninduktion von *C. albicans*

Die Hypheninduktion erfolgte auf Serum-haltigen (10 %) sowie auf Mannitol-haltigen YP-Platten, bei 37 °C für 3 Tage. Die Induktion des Hyphenwachstums auf Mangelmedium erfolgte durch Spider-Medium (Festmedium). Hierbei wurden die Stämme ebenfalls bei 37 °C für 3 Tage inkubiert. Für die Hypheninduktion in Flüssigmedium wurden Übernachtskulturen der Stämme in YP-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und mit 10 % Serum versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C.

2.3 Primer und Plasmide

2.3.1 Plasmide

Tab. 2.5: verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pBI-1	<i>PCK1</i> -Promotor in pRC2312; <i>URA3</i> , <i>CaARS</i> ,	Stoldt <i>et al.</i> (1997)
pDS1044-1	<i>CaARS</i> , <i>ACT1p-SAT1</i> , <i>URA3</i> , <i>LEU2</i> , <i>ori</i> ,	D. Sanglard
p3HA- URA3	3xHA- <i>URA3</i> -Fragment zur C-terminalen Markierung mit dem dreifachen HA-Epitop; <i>URA3</i> ,	Prill <i>et al.</i> (2005)
pES11a	wie pDS1044-1; <i>MSB2^{HA-V5}</i> integriert in Restriktionsschnittstelle <i>XhoI</i>	Szafranski-Schneider <i>et al.</i> (2012)
pGEM- URA3	<i>URA3</i> integriert in den Vektor pGEM-T (Invitrogen)	Wilson <i>et al.</i> (1999)
pGEM-HIS1	<i>HIS1</i> integriert in den Vektor pGEM-T (Invitrogen)	Wilson <i>et al.</i> (1999)
pRS-ARG4	<i>ARG4</i> -Fragment integriert in pRS314	Wilson <i>et al.</i> (1999)
pJB34	<i>DOM34</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors; <i>URA3</i> , <i>LEU2</i> , <i>CaARS</i> ,	Hilbig (2010)
pDS1044- hDG6SS	pDS1044 mit <i>MSB2^{SS}</i> -hDG6 ^{MYC-6xHIS} unter Kontrolle das <i>ACT1</i> -Promotors	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie
pET22b- hDG6	pET22b mit hDG6 ^{Myc-6xHis} <i>E. coli</i> Expressionsvector.	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie
pBI-SM [K12]	<i>SUC2^{MYC}</i> unter Kontrolle des <i>PCK1</i> -Promotors amplifiziert aus dem Vektor pSUC-Myc [P7], integriert in pBI-1; <i>URA3</i>	Plasmidsammlung Molekulare Mykologie
pSE1111	Two-Hybrid Vektor, <i>SNF4</i> an die Aktivierungsdomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator. <i>LEU2</i>	Durfee <i>et al.</i> , 1993
pSE1112	Two-Hybrid Vektor, <i>SNF1</i> an die Bindedomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator. <i>TRP1</i>	Durfee <i>et al.</i> , 1993
pGAD-C1	<i>ADHIp-GAL4</i> -Aktivierungsdomäne (AD); <i>LEU2</i> -Marker	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pGBD-C1	<i>ADH1p-GAL4</i> -Bindedomänedomäne (BD); <i>TRP1</i> -Marker	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pDYC-C1	Amp ^R , <i>LEU2</i> DYC-C1- <i>GAL4</i> -AD-Fusion in pGAD-C1: Genomische Two-Hybrid Gen-Bank aus dem <i>C. albicans</i> -Stamm CAI4. Genomische DNA mit <i>TaqI</i> , <i>MaeII</i> , <i>HinfI</i> , <i>AciI</i> und <i>MspI</i> in Fragmente zwischen 0,5 und 3 kb geschnitten und an die Aktivierungsdomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und Terminator	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pDYC-C2	wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von einer Base	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pDYC-C3	wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von zwei Basen	C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlicht
pACT-II	<i>Gal4::AD LEU2</i>	Plasmidsammlung Mol. Mykologie
pYIL-A	<i>PSG1</i> amplifiziert (oSU38/oSU39) aus CAI4 und integriert in pMOSBLue	Diese Arbeit
pDS-YIL [S-5]	<i>PSG1</i> mit <i>XhoI</i> aus pYIL-A ausgeschnitten und in pDS1044-1 (linearisiert mit <i>XhoI</i>) integriert. <i>PSG1</i> steht unter Kontrolle des <i>ACT1</i> -Promotors. <i>LEU2 URA3</i>	Diese Arbeit
pBD-Psg1	Two-Hybrid Vektor, kompletter <i>PSG1</i> -ORF an die Bindedomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADH1</i> -Promotor und Terminator. <i>TRP1</i>	Diese Arbeit
p1-1GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C.</i> <i>albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-2GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C.</i> <i>albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-4GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C.</i> <i>albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-5GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C.</i> <i>albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Quelle
p1-6GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-7GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-8GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p1-9GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-0GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-1GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-2GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-3#1GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-4GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-5GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-6GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p2-7GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Quelle
p2-8GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit
p4-7GAD	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an die Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. <i>LEU2</i>	Diese Arbeit

2.3.2 Primer

Tab. 2.6: verwendete Primer

Primer	Nummer	Sequenz 5' - 3'
His1 forw	oSU3	CCTGGAGGATGAGGAGACAGAAG
Yil 1kb - 5' rev	oSU4	GATCAGATGTCTTTGAAATTTCC
YIL ko arg4 forw	oSU5	CTTTCAAAGTCAATAAAATTTCAATCAATTATTAATTT CAAATGCTTACGCTTTCATTATGTCTTCAGACCCTGCA AGACCAGATCTAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
HIS1 rev	oSU6	CACCGACATATCTGATATTAGTAG
Arg4 forw	oSU7	GTGTGTATACTTTAGTACCAGTTAAATCAGCATC
His forw 02	oSU8	GGGTGCCGTCAGATACTTTAATTC
ARG forw 02	oSU9	GGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC
YIL forw	oSU10	GTATACTGAAACCCTTGATAATATTG
YIL rev	oSU11	CAGCATCTGCAGCTAAAGGAGCTG
YIL ds nt arg4 rev	oSU12	CATAGTATCAAATACTCAGATCGAGCAATTATTGAT TTGTTACAGGATAATAAATAACAGCCTGATTCTGTG GATAACCGTATTAC

Primer	Nummer	Sequenz 5' - 3'
YIL ds nt his1 rev	oSU13	CATAGTATCAAAATACTCAGATCGAGCAATTATTGAT TTGTTACAGGATAATAAATAACAGCAAGAAACCAG ATGGAAATGCTATTGCC
Arg4 probe forw1	oSU15	CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGC
Arg4 probe rev 1	oSU16	GGGAAAAGTGGTAGAGTATTTGGTCAG
Yil probe rev	oSU17	GCTTAAATTGAAAACCACGTCTG
Yil probe forw	oSU18	GGAATATTTTGCCTGCTGAGAAC
His KO new forw	oSU26	CATTATGTCTTCAGACCCTGCAAGACCAGATCTAGAT GTTCCATAGATCTGATTTTCTCTATAAGTCACCAATT GGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
ne ARG FL forw	oSU30	CTTCAAAGTCAATAAAATTTCAATC
ne ARG NT rev	oSU32	CATAGTATCAAAATACTCAGATCGAGC
1.DSYIL arg rev	oSU33	CAATTAACACAGAGATACCTTGAC
2.DSYIL his rev	oSU34	CTGTATATCGGCACCACTCAA
Ura3 rev	oSU35	GTGACACCATGAGCATTAGTAATATCTGCCCAAC
yilc 3xHA forw	oSU41	CAAAACTGCATTGCTTCAGTATGAAAAGGACGTTGAA ATTATAGACTATTTATTAGACCAATTGCATTTAGATGC AAGAGGTGGTGGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
yilc 3xHA rev	oSU42	CACAAAATCACATATCACGTGAACAACAATTTCTTT AAGTTACCAACTTACATTCAACATATACAAAGAATAA ATATCGACTAGAAGGACCACCTTTGATTG
yilc check for	oSU43	GAAATTGAGCACGGACATGGAC

Primer	Nummer	Sequenz 5' - 3'
YilTH- <i>EcoRI</i> fwd	oSU49	G TTCATCGTGGAAATCCAGATGTCTTCAGACCCTGCA AGACCAG
YilTH- <i>EcoRI</i> rev	oSU50	CTTGGAATTCCTCGATTGAATCATGCATCTAAATGCA ATTGGTC

Tab. 2.6: verwendete Primer für quantitative RT-PCR

Primer	Sequenz 5' - 3'
ACT1(RT)-r	TGGACAAATGGTTGGTCAAG
ACT1(RT)-f	TTGGATTCTGGTGATGGTGT
PMT1-RT-f	GCTGCTGAACCTGTTGAAGA
PMT1-RT-r	CATCAGCAACTTGTGGGTCT
DOM34-RT-(f)	GTTGAATGATGACGACGGAA
DOM34-RT-(r)	CGTCGCTTCTAAACAAAGCA
YIL1(RT3)-r	TTGCTGCTGACGAATTGTTT
YIL1(RT3)-f	TGCTCGGATCAAATCATAGG
YIL1(RT6)-r	TGCAGAAGAAGACTTGCCAT
YIL1(RT6)-f	TGATTGGCAGTACTTGTGGAA

2.3.2 Plasmidkonstruktion

pYIL-A:

Für das Plasmid pYIL-A wurde, ausgehend von gDNA des Stammes CAI4 der *orf19.70.10*, mit den Primern oSU10 und oSU11 amplifiziert (2049 bp) und anschließend in den Vektor pMOSBLue integriert. Die Verifizierung des Plasmids erfolgte über Restriktionsanalysen und Sequenzierung.

pDS-YIL [S-5]:

Aus dem Plasmid pYIL-A wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* ein 2037 bp großes Fragment, welches den *orf19.7010* enthielt, herausgeschnitten und in den mit *XhoI* linearisierten Vektor pDS1044-1 integriert. Die Verifizierung des Plasmids erfolgte über Restriktionsanalysen und Sequenzierung.

pBD-Psg1:

Mit den Primern oSU49 und oSU50 wurde aus dem Plasmid pYIL-A als „Template“ das Gen *PSGI* amplifiziert. Wie das Plasmid pGBD-C1 haben auch die verwendeten Primer jeweils eine *EcoRI*-Schnittstelle. Das PCR-Produkt und das Plasmid pGBD-C1 wurden mit *EcoRI* geschnitten und das PCR-Produkt wurde hinter die *GAL4*-Aktivierungsdomäne integriert. Dabei sind die *GAL4*-Aktivierungsdomäne und das integrierte *PSGI*-Gen im selben Leseraster.

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

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

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

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

2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen

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

2.4.3 DNA-Restriktion

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

2.4.4 Entfernen von 3'-überhängenden Enden

Die zu behandelnden Fragmente wurden mit 2,5 U T4-Polymerase (Roche), je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in Anwesenheit des entsprechenden Puffers für 20 min bei 16 °C

inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Nach einer Phenol/ Chloroform-Extraktion wurden die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und isoliert.

2.4.5 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

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

2.4.6 Dephosphorylierung von DNA

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

2.4.7 Ligation

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

2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.4.9 DNA-Größenstandards

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

2.4.10 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz: $A_{260} \cdot \epsilon = c$ [ng/µl]

Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA, sowie 33 µg/ml Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993). Die Messung und automatische Auswertung der Werte erfolgte über NanoDrop.

2.4.11 Nachweis spezifischer Sequenzen über Southernblot-Analyse

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

2.4.11.1 Sondenmarkierung

Zur Markierung von DNA-Fragmenten wurde das Prinzip des "random priming" verwendet (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem "DIG DNA Labeling and Detection Kit non radioactive" der Firma Roche. In einem Reaktionsansatz wurden 100-500 ng DNA über Nacht markiert. Die Konzentration der Sonde wurde vor der Hybridisierung im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit markierter Kontroll-DNA abgeschätzt.

2.4.11.2 Transfer auf eine Nylonmembran durch Vacuum-Blot

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

2.4.11.3 Hybridisierung und Detektion

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

2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

2.4.12.1 Kolonie-PCR

Zur Verifikation von Transformanten wurde die PCR auf ganzen Zellen einzelner Kolonien durchgeführt. Dazu wurde etwas Zellmaterial einer Kolonie in 40 µl 0,02 M NaOH

resuspendiert und 10 min bei 95 °C inkubiert. Für die Kolonie-PCR wurde Taq-Polymerase von NEB mit dem dazugehörigen PCR-Puffer mit MgCl₂ verwendet und 2 µl der Zellsuspension eingesetzt. Die übrigen Komponenten wurden, wie in 2.4..1 beschrieben, eingesetzt, wobei eine Amplifikation in 35 Zyklen erfolgte.

2.4.12.2 Quantitative RT-PCR/ Real Time-PCR

Die Analyse der Expression einzelner Gene erfolgte mit Hilfe der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bzw. Real Time-PCR. Die Real Time-PCR ermöglicht im Gegensatz zur Endpunktbestimmung der konventionellen PCR eine Verfolgung der Amplifikation der DNA in Echtzeit („Real Time“) und somit eine Quantifizierung der Ausgangskopienzahl. Die Messung der Amplifikation der DNA wird dabei durch fluoreszierende Reportermoleküle ermöglicht, die an das gebildete Produkt binden und dessen Zunahme so in Echtzeit sichtbar machen. In dieser Arbeit wurden SYBR Green und Eva Green verwendet, das sequenzunspezifisch, aber spezifisch nur in doppelsträngige DNA interkaliert. SYBR Green und Eva Green wird jeweils bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm, wobei die Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs 200-fach höher ist als die des freien Farbstoffs. Diese Eigenschaften ermöglichen nach der Amplifikation eine Überprüfung auf Nebenprodukte, wie sie beispielsweise durch Kontamination, Primer-Dimere oder Falschanlagerung der Primer entstehen können. Im Anschluss an den PCR-Lauf wird eine Schmelzkurve des Produkts erstellt, indem der Reaktionsansatz langsam erhitzt wird. Bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des Produkts ist dieses zu 50 % zu Einzelsträngen denaturiert, so dass ein drastischer Fluoreszenzabfall durch eine Freisetzung des zuvor gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs gemessen wird. Hierbei sollte nur ein Produkt mit einer spezifischen Schmelztemperatur detektiert werden, jedes Nebenprodukt tritt als weiterer „peak“ mit einer anderen Schmelztemperatur auf. Die Ermittlung der Ausgangskopienzahl der eingesetzten DNA und somit der Expressionsrate eines Gens erfolgt bei der Real Time-PCR nicht absolut, sondern als relative Größe in Relation zu einem Referenzgen, das unter den untersuchten Bedingungen unverändert exprimiert wird (relativer Transkriptspiegel). In dieser Arbeit wurde das Actin-Gen *ACT1* als Referenzgen für *C. albicans* verwendet, da es als housekeeping-Gen in den untersuchten Stämmen nicht reguliert ist. Für die Berechnung des relativen Transkriptspiegels eines Gens (RTL, relative transcript level) wird der Ct-Wert (threshold cycle) des Gens ermittelt. Dabei handelt es sich um den Amplifikationszyklus, bei dem die Fluoreszenz des betreffenden Produkts einen bestimmten Grenzwert (threshold) überschreitet. Die Berechnung des RTL erfolgt dabei unter Berücksichtigung der Effizienz der jeweiligen Amplifikation, da diese das Ergebnis stark beeinflussen kann. Theoretisch beträgt die Amplifikationsrate oder Effizienz bei einer PCR 2, das heißt es findet eine Verdoppelung der DNA innerhalb eines Zyklus statt. In der Praxis kann dieser Wert jedoch abweichen und muss daher für jedes Gen ermittelt werden. Dazu wird eine Standardkurve für jedes Gen erstellt, bei der fünf Verdünnungen derselben DNA gemessen werden. Aus der Steigung (slope) der Standardkurve kann die Effizienz (E) mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt werden: $E = 10^{-[1 / \text{Steigung}]}$

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

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

Präparation von RNA aus *C. albicans*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellen einer 50 ml Kultur bei einer $OD_{600} = 0,5$ geerntet (5 min, 3500 Upm) und nach Abgießen des Überstands im verbliebenen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam so in flüssigen Stickstoff getropft, dass gefrorene Zellkügelchen entstanden. Die Zelltropfen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Der Zellaufschluss der gefrorenen Kugeln erfolgte in einem Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) mit einer 7 mm Carbid-Kugel im Stickstoff-gekühlten Teflon-Gefäß 2 min bei 2600 Upm. Das entstandene Zellpulver wurde noch gefroren möglichst zügig in 1 ml Trizol® (Invitrogen) resuspendiert und nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) 1 min kräftig geschüttelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 13000 Upm) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 400 µl Chloroform zugesetzt, die Proben für 15 sec geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 Upm) wurde die obere, farblose Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde zunächst durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und dann pelletiert (10 min, 13000 Upm). Das RNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol (verdünnt in DEPC-dH₂O) gewaschen (vortexen; 10 min, 13000 Upm) und danach luftgetrocknet. Die RNA wurde in 500 µl DEPC-dH₂O resuspendiert (vortexen; 10 min, 37 °C) und nach Zugabe von 500 µl LiCl-Puffer (4 M LiCl; 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA) erneut mindestens 1 h oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach dem Auftauen wurde die RNA pelletiert (30 min, 13000 Upm) und zweimal mit 1 ml bzw. 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (s.o.). Das Pellet wurde 15 min getrocknet und die RNA in 50- 100 µl DEPC-dH₂O aufgenommen

Synthese der Komplementär-DNA

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

(I) DNase-Behandlung

8 µg RNA

2 µl 10x DNase I-Puffer

1 µl DNase I

auffüllen mit dH₂O auf 20 µl Reaktionsvolumen, Inkubation 30 min, 37 °C. Nach der DNase-Reaktion erfolgte eine Aufreinigung der RNA mit einem RNA Clean-up Kit (R1015 von Zymo research) nach Herstellerangaben.

(II) Reverse Transkription

1-2 µg RNA

2 µl Oligo (dT)

auffüllen mit Nuklease-freiem dH₂O auf 12 µl Gesamtvolumen, 3 min bei 70 °C denaturieren, Danach auf Eis inkubieren. Danach erfolgte die Zugabe von:

2 µl 10x RT Puffer

4 µl dNTP Mix

1 µl RNase-Inhibitor

1 µl SuperScriptTM II ReverseTranskriptase

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 42 °C inkubiert und danach die Reverse Transkriptase 10 min bei 95 °C inaktiviert. Um das Auftreten kontaminierender DNA in den für die quantitativen RT-PCR Messungen verwendeten RNA-Proben auszuschließen, wurde für jede untersuchte Probe zusätzlich eine so genannte „NoRT“-Kontrolle angesetzt. Dazu wurde parallel eine zweite Probe der DNase behandelten RNA nach der Denaturierung mit Oligo (dT) nicht mit Reverser Transkriptase versetzt, sondern nur mit dH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und später ebenfalls in die quantitative RT-PCR eingesetzt.

quantitative RT-PCR Analyse

Für die quantitative RT-PCR Reaktion wurde das SYBR Green Kit von Invitrogen (Platinum[®] SYBR[®] EDTA; 0,01 % Tween-20) bzw. EvaGreen[®] (von Biotium) als ein passiver Referenzfarbstoff eingesetzt, um leichte Volumenschwankungen in den einzelnen Reaktionsansätzen durch Berücksichtigung der Fluoreszenz des Referenzfarbstoffs rechnerisch auszugleichen zu können. Dazu wurden zu 1,2 ml Platinum Green qPCR SuperMix UDG Kit, (Invitrogen) und EvaGreen[®] (Biotium) verwendet. In diesem System wird ROX (25 3M 5-carboxy-X-rhodamin in 10 mM Tris/HCl, pH 8.6; 0,1 mM SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG 5 µl ROX) gemischt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 mit dH₂O verdünnt in die quantitative RT-PCR eingesetzt. Jede Reaktion wurde in einem Ansatz mit 25 µl Gesamtvolumen und folgenden Komponenten durchgeführt:

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

Jede Messung wurde mindestens als Zweifachbestimmung (Duplikate) oder als Dreifachbestimmung (Triplikate) durchgeführt. Die Bestimmung der Effizienz für jedes Gen

erfolgte durch die Erstellung einer Standardkurve aus fünf Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:10000 derselben cDNA. Für die Bestimmung des relativen Transkriptspiegels eines Gens wurden mindestens zwei Messungen von unabhängigen RNA-Präparationen durchgeführt (biologisches Replicate). Die Primer für die quantitative RT-PCR wurden mit Hilfe des Programms „Real-time PCR Design“ (www.genscript.com/ssl-bin/app/primer) ausgewählt. Wichtige Kriterien bei der Auswahl waren dabei eine Länge von 18-30 bp, ein GC-Gehalt von 40-60 %, eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur des Primerpaars sowie das Vermeiden von Hairpinstrukturen, Dimerbildung und anderen Strukturen, die zu Problemen bei der Amplifikation führen könnten. Von jedem in der quantitativen RT-PCR verwendeten Primerpaar wurde außerdem eine Kontrolle ohne cDNA (ersetzt durch 10 µl dH₂O) amplifiziert, um Primer-bedingte Nebenprodukte auszuschließen. Die quantitative RT-PCR wurde in einem ABI PRISM® 7000 mit folgendem Programm durchgeführt:

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

Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Abschnitt 2.4.12.4 erläutert.

2.5 Transformation

2.5.1 Transformation von *E. coli*

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

2.5.2 Transformation von *C. albicans*

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

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Antikörper

Tab 2.7 verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Quelle
Anti-HA	Monoklonal, Ratte	1:1000	Roche
Anti-MYC	Monoklonal, Maus	1:2000	Millipore

Tab 2.8 verwendete primäre Antikörper

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

2.6.2 Präparation von Hefe-Rohextrakten

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis ausgeführt. 20- 50 ml einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,6 - 0,8$) wurden geerntet (5 min, 3500 Upm), einmal mit 20 ml dH₂O gewaschen und das Zellpellet über Nacht bei -20 °C eingefroren. Das aufgetaute Pellet wurde in 200µl -500µl Lysis-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton X 100) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit 2/3 Volumen Glasperlen für zweimal 10 min auf dem Vibrax (IKA) bei 2200 Upm mit einer 10 minütigen Pause. Es folgte eine Abtrennung der Glasperlen (2 min, 2000 Upm) und der Zelltrümmer (5min, 3500 Upm). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Rohextrakt für eine Western-Analyse bei -70 °C eingefroren bzw. direkt in die Koimmunoprecipitation eingesetzt.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue G250“ sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Es wurden 1-15 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit Wasser verdünnt und mit 0,2 ml „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei RT inkubiert und die Messung erfolgte in einem Photometer bei 595 nm. Als Standard wurde eine Eichkurve mit 1-15 µg BSA erstellt.

2.6.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Als Alternative zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde das „Total Protein Kit, Micro Lowry“ von Sigma verwendet. Dabei wurde zur Leerprobe, den Proben

und den zum Kit gehörenden Standard-Proben Lowry Reagenz Lösung hinzugefügt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit Phenol Reagenz Lösung versetzt und erneut für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 500-800 nm gemessen und an Hand der Eichkurve (Standard-Proben) die Proteinkonzentration ermittelt.

2.6.4 PNGase F-Behandlung

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

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Hierzu wurden denaturierende SDS- Gele verwendet, deren Polyacrylamid- Konzentration zwischen 8 und 12 % variierte. Zunächst wurde das untere Trenngel [0,375 M Tris (pH 8,8); 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 8-12 % Acrylamid] gegossen, welches sofort nach dem Gießen mit Wasser Isopropanol überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wurde das Isopropanol herausgegossen und eventuelle Reste mit einem Papiertuch herausgesaugt. Das Sammelgel [0,125 M Tris (pH 6,7), 0,1 % SDS, 0,8 % APS, 0,1 % TEMED, 5 % Acrylamid] über das Trenngel gegossen. Zum Gießen der Gele wurde eine Apparatur von Hoefer Scientific verwendet. Alternativ wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit 8-10 %igen SDS-Gelen der Firma Invitrogen bzw. Pierce verwendet. Für die selbstgegossenen sowie für die Gele der Firma Invitrogen wurde der klassische Lämmli-Laufpuffer verwendet [200 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl; 0,1 % SDS (w/v)], für die Gele der Firma Pierce ein HEPES-Laufpuffer [100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % SDS (w/v)]. Die Proben wurden mit ½ Vol. 3 x Lämmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C, bzw. 20 min bei 70 °C inkubiert. Es wurden 40 µg Protein-Rohextrakte eingesetzt.

2.6.6 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran von Millipore) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde mit Methanol vorbehandelt. Der Proteintransfer erfolgte mit dem „XCell Blot Module“ 90 min bei 40 V bzw. über Nacht bei 10 V. Potenzielle unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran wurden für 2 h bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C in 5 % Milchpulver in TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten

Antikörper unter leichtem Schütteln in der gleichen Blockierungslösung für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Membran dreimal für 15 min bei RT in TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper (1 h, RT). Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der Peroxidase mit Hilfe des Chemilumineszenz-Substrates „SuperSignal® West Dura“ (Pierce) laut Herstellerangaben am LAS 1000 (Fujifilm).

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Immunfluoreszenz

2.7.1.1 Fixieren von Zellen

Zellen einer exponentiellen Kultur ($OD_{600} = 0,5- 0,8$) wurden 30- 90 min mit 4 % Formaldehyd bei 30 °C auf dem Schüttler fixiert. 5 ml der Kultur wurden geerntet (5 min, 3500 Upm) und einmal in 5 ml S-Puffer (50 mM HEPES; 1,2 M Sorbitol; pH 7,5) gewaschen (5 min, 3500 Upm). Die Zellen wurden in 1 ml S-Puffer resuspendiert und konnten so bis zu einer Woche bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert werden.

2.7.1.2 Herstellen der Präparate

Für eine Immunfluoreszenz der Zellen mussten diese zunächst sphäroplastiert werden. Dazu wurden Zymolyase T100 (2,5 mg/ml, 40 µl für 1 ml Zellsuspension eingesetzt) und -Glucuronidase (30 µl) sowie 10 mM DTT (10 µl 1M DTT) zugegeben und die fixierten Zellen 45 min bei 30 °C inkubiert. Nach diesem Schritt mussten die Sphäroplasten sehr vorsichtig behandelt werden. Nach der Sphäroplastierung wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 5000 Upm), in 1 ml S-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und 5 min bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (2 min, 5000 Upm) und in 200 µl S-Puffer aufgenommen. Für die Fluoreszenzmikroskopie der Zellen wurden Poly-Lysin beschichtete Objektträger verwendet. Dazu wurde in jedes Well eines 10-Well-Objektträgers 15 µl einer 0,1 %igen Poly-Lysinlösung gegeben und 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und nach dem Trocknen die Poly-Lysinschicht dreimal mit dH_2O gewaschen. Zur Fixierung der Zellen auf der Poly-Lysin-Matrix wurden 20 µl der Zellsuspension aufgetropft und 5 Minuten inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden viermal durch tropfenweise Zugabe von PBS und anschließendes Neigen des Objektträgers gewaschen und mussten dabei stets von Puffer benetzt bleiben. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte durch 15 minütige Inkubation der Zellen mit 2 % Milchpulver in PBS. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit 40 µl des primären Antikörpers (Anti-HA aus der Ratte), 1:100 in der Blockierungslösung verdünnt, inkubiert. Der sekundäre, Fluorophorgekoppelte Antikörper (Anti-Ratte, FITC-konjugiert,) wurde nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS für 90 min, 1:100 verdünnt in 0,2 % Milchpulver/PBS, in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Zur Fluoreszenzfärbung des Kerns wurde nach dem Waschen mit PBS 20 µl DAPI (1 µg/ml) zugegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Flüssigkeit gründlich entfernt und Anti-Fade (Pro-Long Gold Anti-Fade von Sigma) in die Wells gegeben das laut Herstellerangaben aushärten gelassen wurde. Vor der Mikroskopie des Präparats wurde das Deckglas vollständig luftdicht mit Nagellack versiegelt und konnte so auch längere Zeit im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.8 Transkriptomanalyse

2.8.1 DNA-Microarrays

Mit Hilfe von DNA-Microarrays können genomweite Genexpressionsprofile verglichen werden. Es können Gene identifiziert werden, welche nur unter bestimmten Bedingungen reguliert sind. Dazu wird aus der Gesamt-RNA mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion eine mit den Fluorochromen Cy3 und Cy5 markierte Komplementär-DNA (cDNA) hergestellt. Die unterschiedlich markierte cDNA zweier zu vergleichenden Proben wird vereinigt und zur Hybridisierung auf einen DNA-Chip gegeben. Dort bindet die markierte cDNA an komplementäre Sequenzen. Nach dem Scannen mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (Cy3: 532 nm und Cy5: 640 nm) erfolgt eine Quantifizierung der hybridisierten cDNA. Der Vergleich der Signalintensitäten der beiden Wellenlängen liefert eine Aussage über die Expression jedes einzelnen Gens. Die DNA-Arrays wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Diese bestehen aus einem Aldehyd beschichteten Glaträger, auf dem kurze DNA-Sequenzen der 5.907 *C. albicans* Gene sowie diverse Kontrollen (*C. albicans* mitochondriale Gene, *S. cerevisiae* und bakterielle Gene) punktgenau aufgebracht sind.

2.8.2 Anzucht der Zellen für Microarrays

Für den Vergleich von Deletionsmutanten mit dem Wildtyp, wurden die Stämme ausgehend von einer Übernachtskultur in 50 ml frisches YPD-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft. Die Zellen wurden dann bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ wachsen gelassen und durch Zentrifugation geerntet (5 Minuten, 3.500 Upm). Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte wie in Abschnitt 2.4.12.3 beschrieben

2.8.3 Synthese der Komplementär-DNA

Die Präparation der Gesamt-RNA aus *C. albicans* erfolgte wie in Abschnitt 2.4.12.3 beschrieben. Anschließend wurde mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase-Reaktion und Fluorochrom-modifizierten Nukleotiden (Cy3- und Cy5- dCTP) eine farblich markierte cDNA aus der Gesamt-RNA hergestellt. Da die verwendeten Fluorochrome lichtempfindlich sind, wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend für 5 min bei 42 °C abgekühlt, mit je 3 µl RNasin (Promega) und Superscript II RT (Invitrogen) versetzt und für 2 Stunden bei 42 °C inkubiert. Nach 60 Minuten wurden erneut 3 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Nach weiteren 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl EDTA (50 mM, pH 8,0) gestoppt. Zur Degradation der RNA wurde der Ansatz mit 10 µl 10 M NaOH-Lösung versetzt und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach Neutralisierung des Ansatzes mit 20 µl Essigsäure (5M) wurde die cDNA mit Hilfe des Qia-quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der cDNA von der Säule erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll mit 2 x 50 µl 42 °C warmen Wassers. Nach Vereinigung der zwei Eluate wurden diesen mit Hilfe von Microcon-YM30 Säulen (Milipore) auf ein Volumen von 10 µl konzentriert.

Tab. 2.9 Reaktionsansatz zur Herstellung von markierter cDNA aus Gesamt-RNA

Komponente	Volumen (μl)
5 x Erststrang Puffer	24
<i>C. albicans</i> specific primer mix (0,1 pmol/ μl)	3
AncT mRNA primer (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	3
Oligo dT18-21 (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	6
10 mM dNTP-dCTP	18
1 mM dCTP	3
1 mM Cy3- oder Cy5-dCTP	4,5
0,1 M DTT	12
RNasin	3
<hr/>	
eingesetzte Gesamt-RNA	30 μg
ad H_2O	120 μl

2.8.4 Hybridisieren, Waschen und Scannen der DNA Microarrays

Für die Hybridisierung der markierten cDNA wurden die Objektträger mit einem Deckglas mit seitlichen Rändern bedeckt (Imölen GmbH, München). Durch die Ränder entstand ein Hohlraum zwischen Deckglas und Objektträger. Je 10 μl der markierten cDNA (Cy3 und Cy5) wurden zusammen mit 10 μl Heringsperma-DNA (10 mg/ml) für 2 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Probe wurde anschließend mit 60 μl Hybridisierungspuffer (Roche) versetzt und seitlich in den Zwischenraum von Deckglas und Objektträger pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Hybridisierungslösung gleichmäßig unter das Deckglas gezogen. Der Objektträger wurde dann in eine Hybridisierungskammer gelegt (Corning) und am Rand mit zweimal 10 μl Wasser versehen. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad für 24 Stunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Objektträger aus der Hybridisierungskammer entnommen und je zweimal für 10 min mit Waschlösung I (30 mM NaCl, 3 mM Citrat, 0,1 % SDS) und Waschlösung II (30 mM NaCl, 3 mM Citrat) unter leichtem Schwenken gewaschen. Zum Schluss wurden sie in Falcon-Gefäßen durch Zentrifugation (5 min, 550 Upm) getrocknet. Restliche Tropfen der Waschlösung wurden mit Druckluft vorsichtig getrocknet. Gescannt wurden die Arrays bei den Wellenlängen 532 nm (Cy3) und 640 nm (Cy5). Für den Scanvorgang und der Erstellung einer gpr-Datei wurde das Programm GenePix 6.3 verwendet.

2.8.5 Normalisierung und statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mithilfe eines Konvertierungsprogramms (Sascha Brunke: persönliche Mitteilung) in ein kompatibles gpr.-Format konvertiert und im Anschluss mit Hilfe des Programmes GeneSpring 12.3 (Agilent, USA) ausgewertet. Die vier gpr-Dateien wurden über den LOWESS-Algorithmus normalisiert und anschließend in das Programm Excel (Microsoft) exportiert. Da auf den verwendeten Arrays jedes Gen vierfach aufgetragen ist und pro Versuch mindestens vier Replikate durchgeführt wurden, ergaben sich so für jedes Gen mindestens sechzehn Signalintensitätsverhältnisse (Intensität Experiment im Verhältnis zu Intensität Referenz). Als reguliert wurden die Gene bezeichnet, deren Mittelwert den

Replikaten (berechnet durch GeneSpring 12.3) eine mindestens zweifache Änderung zeigte. Als reguliert wurden die Gene eines Arrays bezeichnet, deren Mittelwert aus den vier Einzelwerten (berechnet durch GeneSpring 12.3) eine mindestens zweifache Änderung zur Referenz zeigten. Des Weiteren müssen die normalisierten Werte pro Gen aus 3 von 4 Replikaten dieselbe Tendenz haben und in ihren Mittelwert ebenso zweifach reguliert sein. Nicht auswertbare Bereiche einzelner Arrays wurden manuell aussortiert.

2.9 Proteinanalysen

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

Eine qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in den transformierten Hefezellen (Hefe Zwei-Hybrid Experimente) erfolgte durch ein „X-Gal Overlay-Assay“ (Suckow und Hollenberg, 1998). Dazu wurden Übernachtskulturen der transformierten Hefestämme auf Selektivplatten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurden 0,1 g Agarose mit 10 ml H₂O sowie 10 ml eines 1 M Natrium-Phosphat-Puffers (pH 7,0) in der Mikrowelle erhitzt und anschließend zusammengeführt. Zu dieser Lösung wurden 400 μ l SDS-Lösung (10 %) sowie 400 μ l X-Gal/DMF-Lösung (40 mg/ml) pipettiert. Jede Platte wurde mit 10 ml der heißen Lösung überschichtet und nach Erkalten einige Minuten bis einige Stunden bei 37 °C inkubiert. Blaufärbungen der Kolonien wurden fotografisch dokumentiert.

2.9.2 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („LacZ-Assay“)

Zur quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde der „LacZ-Assay“ nach James *et al.*, 1996 durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die OD₆₀₀ einer Übernachtskultur bestimmt und anschließend 1 ml der Kultur abzentrifugiert (2 min, 13000 rpm). Das Pellet wurde in 100 μ l Lyse-Puffer (0,1 M Tris/Acetat pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) resuspendiert und für mindestens 2 h bei -70 °C eingefroren. Das Auftauen der Proben erfolgt e bei 30 °C im Wasserbad. Durch Zugabe von 750 μ l Z/ONPG-Puffer (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 1 mg/ml O-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Anschließend wurden die Proben bis zur deutlichen Gelbfärbung der Referenzproben im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Das farblose ONPG wird enzymatisch in das gelb gefärbte *ortho*-Nitrophenol umgewandelt, dessen Konzentration wiederum photometrisch bei 420 nm bestimmt werden kann. Da ONPG, ein Substrat der β -Galaktosidase, im Überschuss eingesetzt wird, ist die optischen Dichte und somit die Menge des gebildeten Farbstoffs nur abhängig von der vorhandenen β -Galaktosidase-Konzentration. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und die Inkubationszeit notiert. Das Na₂CO₃ verschiebt den pH-Wert in den basischen Bereich, wodurch die β -Galaktosidase nicht mehr enzymatisch aktiv ist. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden die Proben 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert und die OD₄₂₀ des Überstands gemessen. Von jeder Transformante wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel (Golemis und Khazak, 1994; Miller, 1972):

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

3. Ergebnisse

Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung eines bisher uncharakterisierten Gens in *C. albicans*, dessen ORF sich auf Chromosom 7 zwischen den Basenpaaren (bp) 220611 und 218779 befindet. Ein dazu homologes Gen wurde erstmals anhand von Glykosylierungsmutanten in *S. cerevisiae* (*YIL001w*) als potenzieller Faktor für *O*-Glykosylierung beschrieben. Im Rahmen einer Untersuchung zu *O*-Glykosylierungsdefekten von heterolog exprimiertem hIGF-1 in *S. cerevisiae* (Finck *et al.*, 1996) wurden zwei Mutanten, M195 und M577, isoliert. Komplementationsanalysen der Mutante M577 führten wiederum zur Isolation zweier Gene (*YIL001w* und *DOM34*), deren Mutationen in Bezug auf ihre Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin, mit *pmt1*- und *pmt2*-Mutanten einen synthetischen Phänotyp aufwiesen (Wickert, 1998). Das homologe Gen von *C. albicans* ist in der „Candida Genome Database“ (www.candidagenome.org) als *ORF19.7010* und ohne bekannte Funktion annotiert. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieses Gen aufgrund seiner Fähigkeit, Phänotypen von *pmt*-Mutanten in *S. cerevisiae* und *C. albicans* zu supprimieren, als *PSG1* (Pmt-Suppressor-Gene 1) bezeichnet.

Da das *PSG1*-Gen in *C. albicans*, wie auch *YIL001w* in *S. cerevisiae*, weitgehend uncharakterisiert ist, sollten zunächst die Nukleotid- und Aminosäuresequenz auf konservierte Motive und Besonderheiten hin analysiert werden. Durch die Herstellung von *psg1*-Disruptionsmutanten in *C. albicans* sollte untersucht werden, inwiefern die Abwesenheit des *PSG1*-Gens zur Ausbildung von Phänotypen führt. Ferner sollte eine genomweite Transkriptomanalyse von *psg1*-Disruptionsmutanten Aufschluss über die Funktion des *PSG1*-Gens geben. Eine Untersuchung des Psg1-Proteins sollte außerdem durch die endogene Markierung mit dem HA-Epitop in einem der *PSG1*-Allele ermöglicht werden. Zudem wurde beabsichtigt, das epitopmarkierte Psg1-Protein in der Zelle über Immunfluoreszenz zu lokalisieren. Weiterhin wurde überprüft, ob durch die Überexpression von *PSG1* einige Phänotypen der *pmt*-Mutanten supprimiert werden können und ob das Dom34-Protein daran beteiligt ist. Am Ende sollten durch Interaktionsanalysen mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems potenzielle Interaktionspartner von Psg1 identifiziert werden.

3.1 Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *PSG1*

3.1.1 Sequenz- und genomische Analyse von *PSG1* in *C. albicans*

Innerhalb der digitalen Genom-Datenbank von *C. albicans* (www.candidagenome.org) ist *PSG1* als uncharakterisierter ORF (*ORF19.7010*) ohne bekannte Funktion annotiert. In *S. cerevisiae* ist das zu *PSG1* homologe Gen *YIL001w* ebenfalls ohne Funktion annotiert. Das Genom von *C. albicans* weist eine Gesamtgröße von 15,6 Megabasenpaaren verteilt auf acht Chromosomen auf. Unter diesen ist das Chromosom 7 eines der am besten untersuchten Chromosomen (Chibana *et al.*, 2005). Hier befindet sich der Leseraster von *PSG1* (*ORF19.7010*) zwischen den Basenpaaren 220611 und 218779. Das *PSG1*-Gen hat somit eine Größe von 1833 Basenpaaren und besitzt zudem keine Introns. Der *PSG1*-Lokus mit seinen benachbarten Genen ist zwischen der 17. und der 32. Kilobase (kb) von Chromosom 7 in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

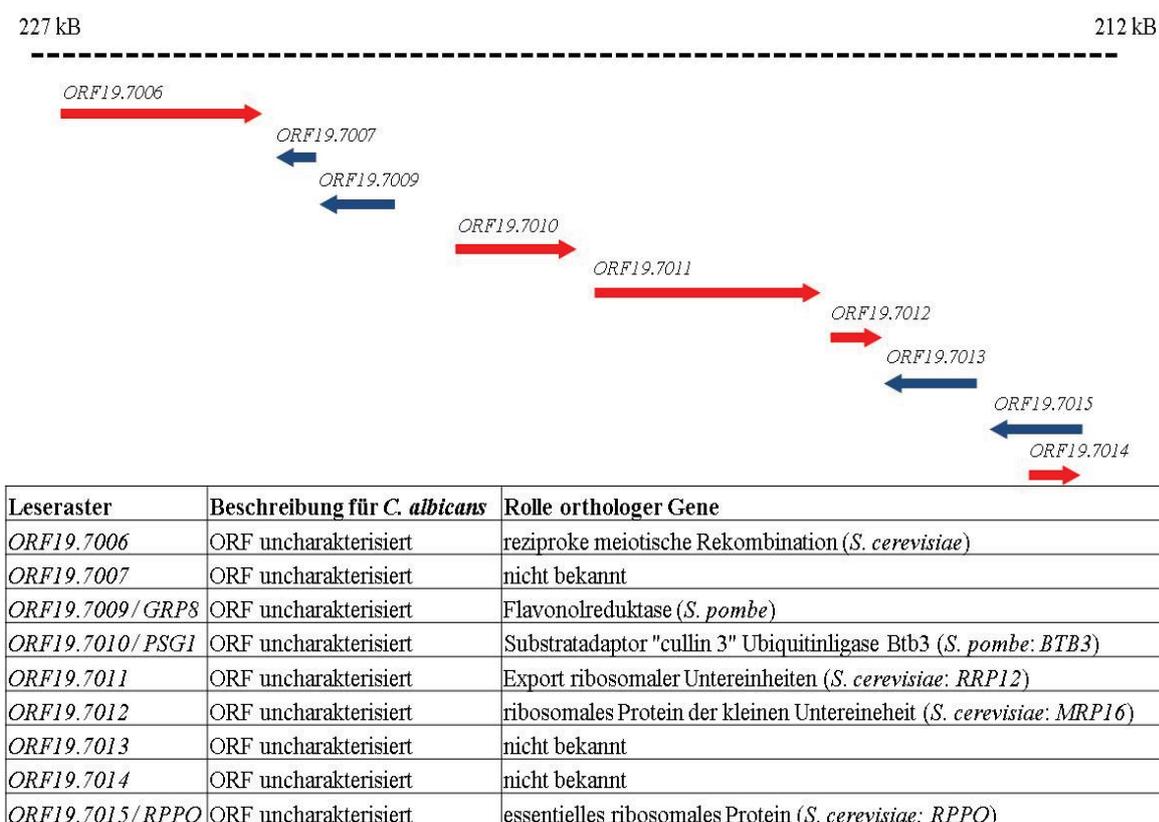


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des *PSG1*-Genlokus und Beschreibung der benachbarten Gene

Die Abbildung zeigt den Bereich von Chromosom 7 zwischen Position 227 kb und 212 kb. Innerhalb dieses Bereichs sind die potenziellen offenen Leseraster abhängig von ihrer Ausrichtung rot oder blau dargestellt. Im unteren Abschnitt sind die Gene tabellarisch mit Namen, Funktion und Rolle orthologer Gene aufgelistet.

Bisher wurde keines der benachbarten Gene von *PSG1* in *C. albicans* auf ihre Funktion charakterisiert. Lediglich die Funktion einiger orthologer Gene aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* ist bekannt. Es befinden sich stromabwärts die Gene *ORF19.7011* und *ORF19.7012*, deren Orthologe für den Export ribosomaler Untereinheiten (*S. cerevisiae: RRP12*) verantwortlich und essenziell sind sowie Gene für ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit in Mitochondrien (*S. cerevisiae: MRP16*). Stromaufwärts befindet sich zwischen den Genen

ORF19.7009 und *PSG1* ein ca. 1 kb-langer nicht-kodierender Bereich. Das Ortholog für *ORF19.7009* in *S. pombe* kodiert für eine Flavonol-Reduktase. Für *PSG1* selbst gibt es orthologe Gene aus *S. pombe* und *C. dublinensis*, die eine Funktion als Substratadaptor für Ubiquitinligasen inne haben. Wie aus Abb. 3.1 deutlich wird, sind die angrenzenden Gene von *PSG1* in *C. albicans* weitgehend uncharakterisiert. Um zu überprüfen, ob neben dem konservierten *PSG1* auch die Anordnung der benachbarten Gene konserviert ist, wurde mit dem Programm „Candida Gene Order Browser“ ein Orthologiecluster von *PSG1* erstellt (Abb. 3.2).

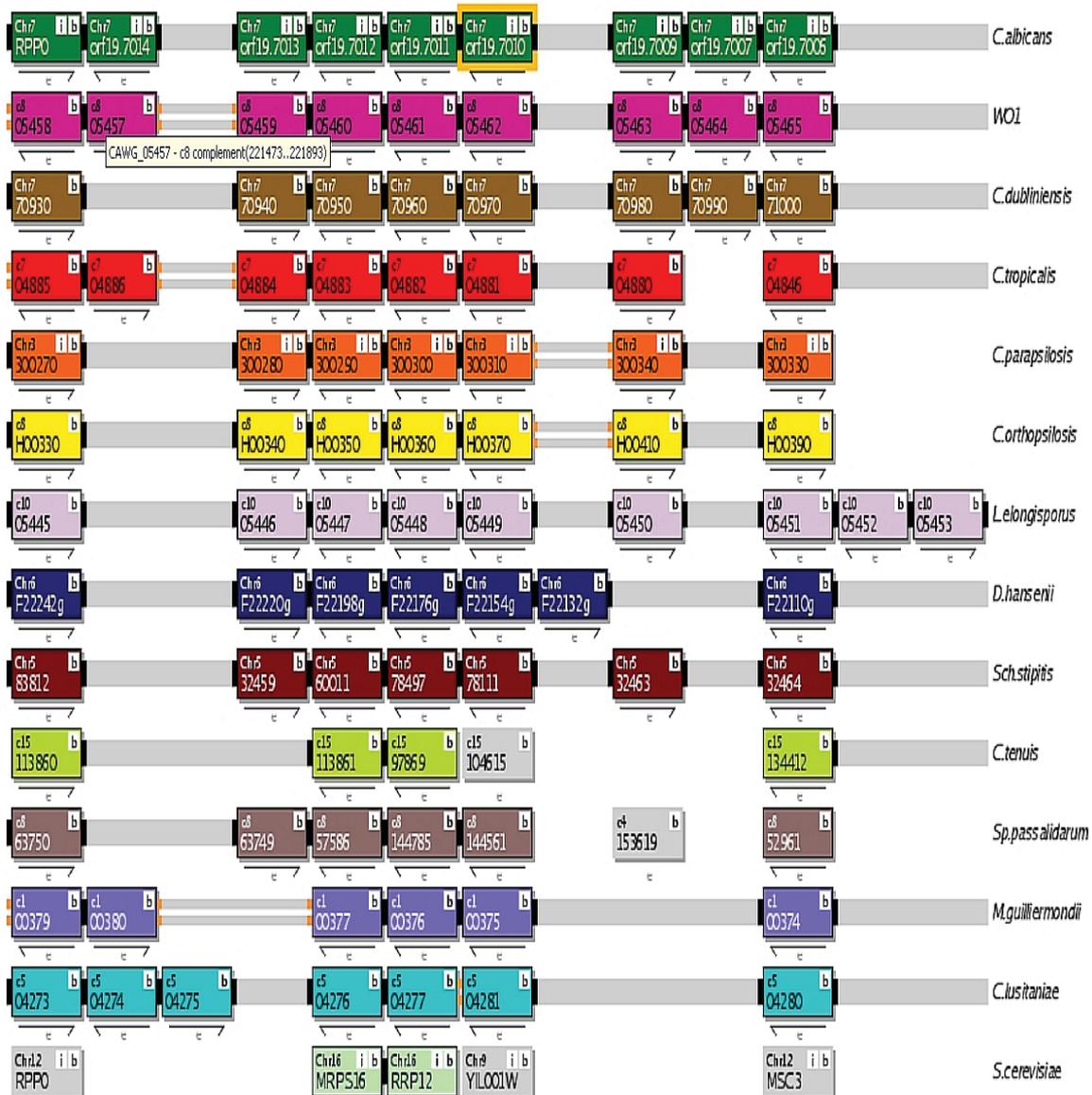


Abb. 3.2: Orthologiecluster des *PSG1*(*ORF19.7010*)-Genlokus

Gezeigt ist die Anordnung von *PSG1* (gelb umrandet) und seiner benachbarten Gene. Hierbei sind die Gene ausschließlich mit ihren systematischen Bezeichnungen aufgeführt. Berücksichtigt dabei sind die Ausrichtung der Gene (Pfeile unter den Kästen) sowie das Chromosom, auf dem sich diese Gene befinden. Die Abbildung zeigt die Anordnung der zu *PSG1* homologen- sowie der benachbarten Gene. Untereinander stehende Gene gelten als ortholog zueinander. Graue Linien zwischen den Bereichen verdeutlichen homologe intergene Sequenzen zwischen den ORFs.

Die abgebildeten orthologen Gene entstammen den Organismen *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *L. elongisporis*, *D. hansenii*, *S. stipitis*, *C. tenuis*, *S. pasalidarum*, *M. guilliermondii*, *C. lusitaniae* sowie *S. cerevisiae*. Im Falle des mit WO1-bezeichneten Genlokus handelt es sich um einen alternativen Stamm von *C. albicans* zum häufig verwendeten Stamm SC5314 (Gillum *et al.*, 1984; Slutzky *et al.*, 1987). Aus dem Orthologiecluster geht hervor, dass bei engerer Verwandtschaft der Organismen die Anordnung der benachbarten Gene gleich ist. Dies gilt für Gene und intergene Sequenzen in nächster Nachbarschaft für *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *L. elongisporis*, *S. stipitis*, *M. guilliermondii* und *C. lusitaniae*. Im Falle von *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* liegt dieser homologe Genlokus sogar auf demselben Chromosom (Chromosom 7). Auffällig ist, dass in fast allen aufgeführten Organismen die jeweils zwei benachbarten Gene stromabwärts auch homolog zu den benachbarten Genen von *PSG1* in *C. albicans* sind. Eine Ausnahme ist der *YIL001w*-Lokus in *S. cerevisiae*. Die Gene *RRP12* (Homolog zu *ORF19.7011*) und *MRPS16* (Homolog zu *ORF19.7009*) liegen jeweils auf dem 16. Chromosom, während *YIL001w* auf dem Chromosom 9 zu finden ist. Dennoch lässt sich sagen, dass der Bereich um den *PSG1*-Lokus innerhalb artverwandter Spezies ebenfalls konserviert zu sein scheint.

3.1.2 Aminosäuresequenz von Psg1

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des Psg1-Proteins treffen zu können, wurde die Aminosäuresequenz näher untersucht. Dabei bildeten die Identifizierung von Proteinmotiven, Ubiquitinierungsstellen und Sumoylierungsstellen, der Homologie-Vergleich mit den Aminosäuresequenzen homologer Proteine sowie eine Phylogenie-Analyse des Psg1-Proteins den Schwerpunkt der Untersuchungen.

3.1.2.1 Proteinmotive

Bioinformatische Analysen mit verschiedenen Programmen (CGD; CloneManager; ExPASy ScanProsite) zeigen, dass die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins eine „ankyrin repeat“-Region sowie eine BTB-Domäne aufweist. Ferner konnte, ausgehend von der Aminosäuresequenz eine vermutliche Lokalisation innerhalb des Cytosols vorhergesagt werden. Eine schematische Darstellung des Psg1-Proteins mit den ermittelten Proteinmotiven ist in Abb. 3.3 dargestellt. „ankyrin repeat“-Regionen sind charakteristische Sequenzmotive für Protein-Protein Interaktionen. Die durch diese Bindungsmotive entstehenden Proteinkomplexe sind in viele zelluläre Prozesse involviert (Mosavi *et al.*, 2004). Die BTB-Domäne, auch als POZ-Domäne bekannt, ist ebenfalls ein vielfältiges Protein-Protein-Interaktionsmotiv, welches ebenfalls an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist (Stogios *et al.*, 2005). Die Anwesenheit von solchen BTB-Domänen ist charakteristisch für „ubiquitin targeting“-Proteine oder Adaptoren für Cul3-Ubiquitinligasen, wie beispielsweise das zu Psg1 homologe Protein Btb3 aus *S. pombe*. Oftmals spielen solche Proteine im Ubiquitin-Proteasom-System pathogener Pilze eine Rolle (Liu und Xue, 2011), jedoch wurden auch in *Homo sapiens* schon solche Substratadaptoren identifiziert. Ein solcher Substratadaptor in *H. sapiens* ist ABTB1, welcher „ankyrin repeat“-Regionen und BTB-Domänen enthält. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass das humane ABTB1 ein Adaptorprotein der E3-Ubiquitinligase Cul3 ist und, dass durch ABTB1 der Elongationsfaktor eEF1A1 ubiquitiniert und degradiert wird (Koiwai *et al.*, 2008). Im gesamten Genom von *C. albicans* weist nur die

Aminosäuresequenz eines weiteren, jedoch nicht charakterisierten Leserasters (*ORF19.7574*) BTB-Domänen wie Psg1 auf. Allerdings ist die Sequenzidentität zu Psg1, bis auf das Vorhandensein einer BTB-Domäne, sehr gering (Daten nicht gezeigt).

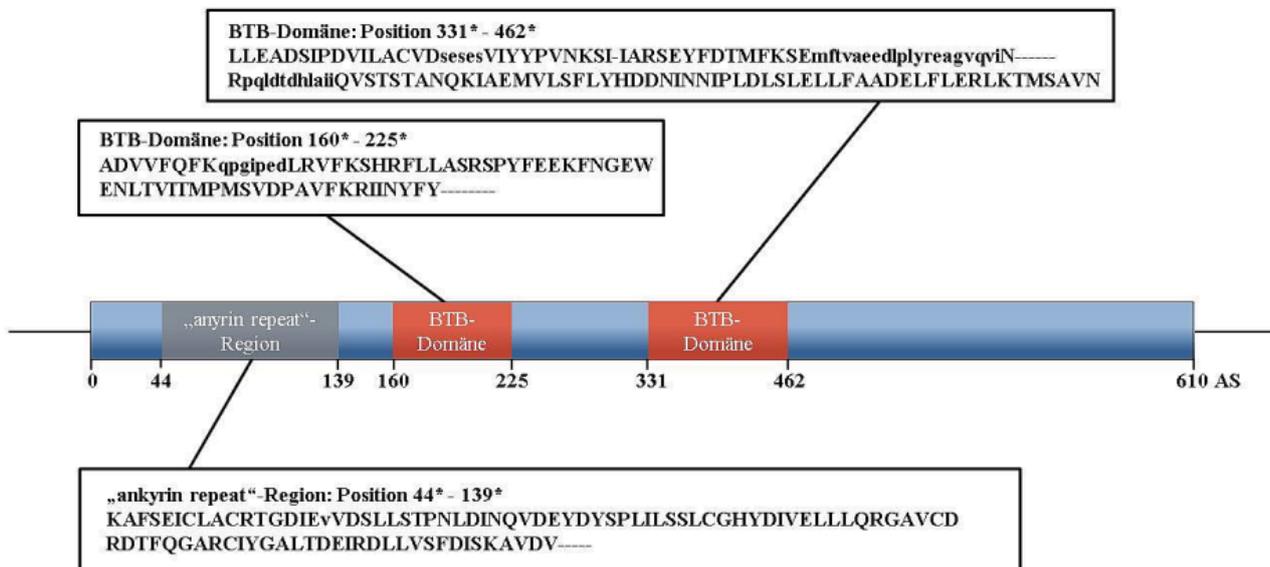


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Psg1 Proteins in *C. albicans*.

Die schematisch dargestellte Aminosäuresequenz sowie die durch die Programme CGD, CloneManager und ExPASy ScanProsite, ermittelten Domänen. Die „ankyrin repeat“-Region (grau) umfasst den Bereich von Position 44. bis 139. Die BTB-Domänen (rot) umfassen die Bereiche von der 160. bis zur 225. sowie von der 331. bis zur 462. Aminosäure (AS). Die Referenzsequenz der einzelnen Domänen ist im unteren Teil der Abbildung aufgeführt (kleine Buchstaben kennzeichnen „mismatches“; Striche kennzeichnen fehlende Aminosäuren im Vergleich zur bekannten Konsensussequenz).

3.1.2.2 Ubiquitinierungsstellen und Sumoylierungsstellen

Da bekannt ist, dass einige BTB-Proteine wie das humane ABTB1 und Btb3 aus *S. pombe* oftmals ubiquitiniert werden, wurde auch die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins auf potenzielle Ubiquitinierungsstellen überprüft. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes, regulatorisches Protein, welches in Eukaryoten hoch konserviert ist, und das unter anderem als Markierung für zu degradierende Proteine verwendet wird (Liu und Xue, 2011). Die Spezifität der Zielproteinerkennung wird hierbei von einem Substratadaptor gewährleistet. Polyubiquitinierte Substrate werden erkannt und im 26S-Proteasom degradiert. Neben einer Degradierung kann die kovalente Bindung eines einzelnen Ubiquitins auch eine Modulation der Aktivität eines Proteins zur Folge haben (Pickart, 2001). Eine andere Form der posttranslationalen Modifikation, ähnlich zur Ubiquitinierung von Proteinen, bildet die Sumoylierung. SUMO (Small Ubiqutin-like Modifier) ist ein kleines Ubiquitin-ähnliches Protein (molekulare Masse von 11 kDa) welches kovalent an Lysinresten einiger Proteine bindet und wie Ubiquitin, ebenfalls deren Aktivität modulieren kann (Leach *et al.*, 2009). In Abb. 3.4 ist die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins schematisch mitsamt der potenziellen Ubiquitinierungs- sowie Sumoylierungsstellen dargestellt. Die Analyse erfolgte mit den Programmen www.ubpred.org und www.abgent.com/sumoplot und umfasst nur Bereiche der Aminosäuresequenz, deren Wahrscheinlichkeit für eine Ubiquitinierung oder Sumoylierung höher als 68 % liegt. Zusätzlich wurden die Aminosäuren innerhalb der zuvor ermittelten

Proteinmotive („ankyrin repeat“-Region und BTB-Domänen) markiert. Wie in Abb. 3.4 zu erkennen, weist die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins vier potenzielle Ubiquitinierungsstellen und drei potenzielle Sumoylierungsstellen auf.

```

1  MSSDPARPDLDVSIDSIFSISHQLDRGTPASSTSSSNQDPEVAKAFSEICLACRTGDIEVVDSLLSTP
69  NLDINQVDEYDYSPLILSSLCGHYDIVELLQRGAVCDRDTFQGARCIYGALTDEIRDLLVSFDIS
135  KAVDVTQPFAGHIASLLNPLLGTITADVVFQFKQPGIPEDLRVFKSHRFLASRSPYFEEKFNGEW
201  ENLTVITMPMSVDPVAVFKRIINYFYLRTHAVLNDSYAIQDQLLKLARMYELDDLVDGIEEIKGIED
267  EKARAKIGHDLSFKFVEKARKDLDDFLLQKILGEKLSTDMDLKDDVDLEDIDCTEFLSDAQREA
332  LLEADSIPDVILACVDSESESVIYYPVNKSIIARSEYFDTMFKSEMFTVAEEDLPLYREAGVQVINR
399  PQLDTDHLAIQVSTSTANQKIAEMVLSFLYHDNINNIPLDLSLELLFAADELFLERLKTMSAVNIT
466  SQFQKFNQEFQSLQDKLDCNAYDLIRASWQTRCDKLEQHVTKMIAYNLSEIFNSEIERQKLSDL
532  IKESAERIKERQDQDTIELVDDVRYLYLTKKYAINEEIGSFDPFSSDKNTDDINLYKTALLQYEKDV
597  EIIDYLLDQLHLDA

```

Abb. 3.4: Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins.

Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins, dargestellt im Einbuchstabencode. Die „ankyrin repeat“-Region (grau) sowie die BTB-Domänen (orange) sind jeweils farblich unterlegt. Innerhalb der Sequenz sind die potenziellen Ubiquitinierungsstellen rot (Lysine) und die potenziellen Sumoylierungsstellen (Lysine und Erkennungssequenz) grün hervorgehoben. Für die Analyse der Aminosäuresequenz wurden dieselben Programme wie in Abb. 3.3 sowie die Programme www.ubpred.org und www.abgent.com/sumoplot verwendet

Für das Btb3-Protein aus *S. pombe* als Substratadaptor konnte gezeigt werden, dass es von einem seiner eigenen E3 Ubiquitinligase-Komplexe (Pcu3p/Pip1p) erkannt, polyubiquitiniert und somit degradiert wird (Geyer *et al.*, 2003). Da die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins ebenfalls potenzielle Ubiquitinierungsstellen aufweist, liegt es nahe, dass auch Psg1 von einem E3 Ubiquitinligase-Komplex aus *C. albicans* erkannt und ubiquitiniert werden könnte. Über eine potenzielle Sumoylierung der zu Psg1 orthologen Proteine ist bisher nichts bekannt. Jedoch ist aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit, mit der die ermittelten Lysine sumoyliert werden (K167: 74 %; K309: 91 %; K373: 85 %), die Möglichkeit dieser Art der posttranslationalen Modifikation des Psg1-Proteins gegeben.

3.1.2.3 Homologievergleich und Phylogenie des Psg1-Proteins

Eine weitere Untersuchung bei der Analyse der Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins bildete der Homologievergleich mit orthologen Proteinen artverwandter Spezies (Programm: ClustalOMEGA). In Abb. 3.5 ist dieser Homologievergleich schematisch dargestellt. Es zeigt sich, dass Psg1 in weiten Teilen hoch konserviert ist. Besonders im Bereich zwischen den Aminosäuren 100 und 210 zeigt sich bei allen Aminosäuresequenzen eine hohe Sequenzidentität. Im Vergleich zu den in Abb. 3.5 dargestellten Aminosäuresequenzen ist das Btb3-Protein aus *S. pombe* bisher das einzige zu Psg1 homologe Protein, dem eine Funktion zugeordnet werden konnte (Geyer *et al.*, 2003).

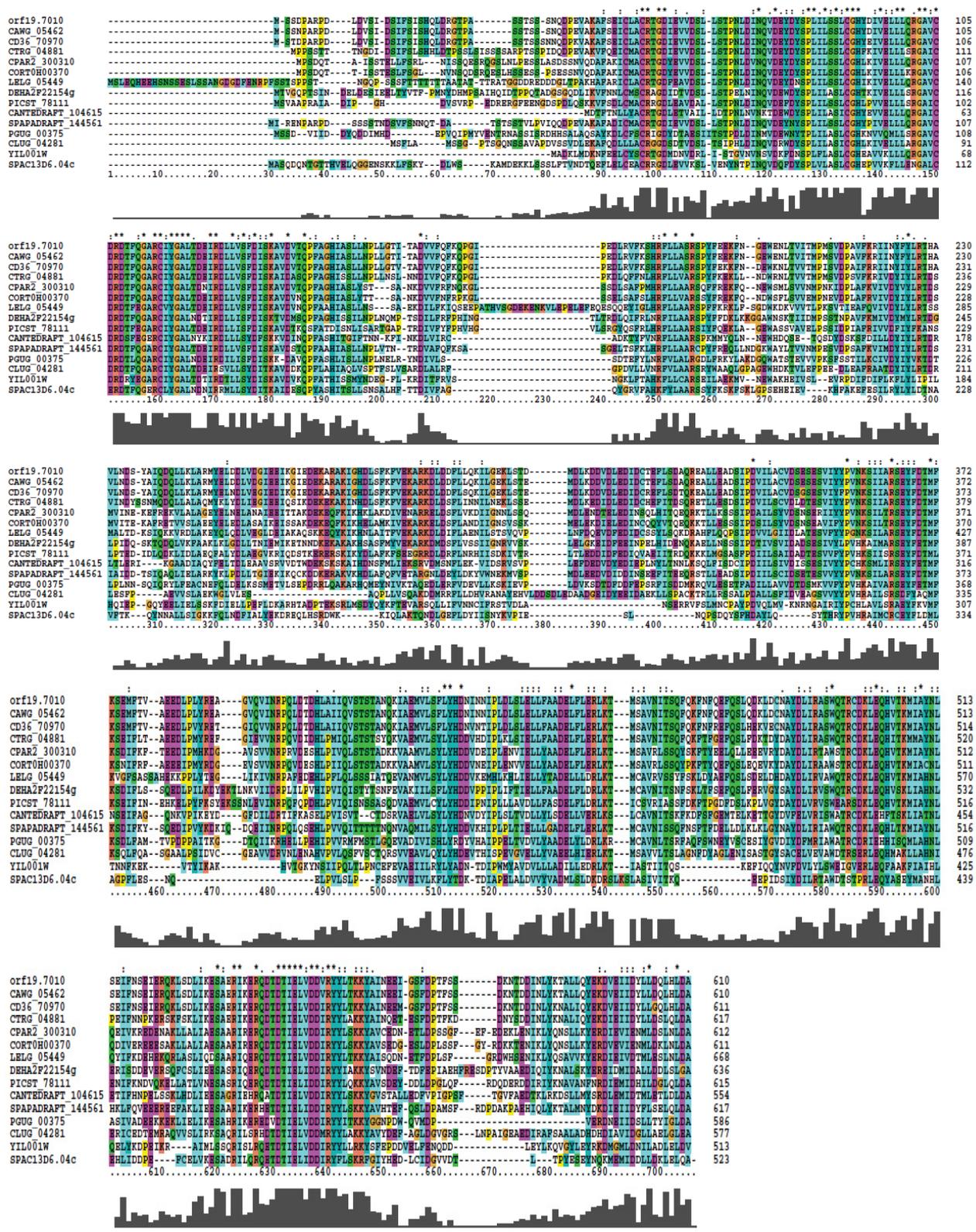


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Sequenzvergleiches von Psg1 mit homologen Proteinen
 Ausgehend von der Aminosäuresequenz des *PSG1*-Gens aus *C. albicans* (*ORF19.7010* und *CAWG_05462*) wurde via ClustalOMEGA ein „Alignment“ mit den Aminosäuresequenzen der homologen Proteine aus *C. dubliniensis* (*CD36_70970*), *C. tropicalis* (*CTRG_04881*), *C. parapsilosis* (*CPAR2_300310*), *C. orthopsilosis* (*CORT0H00370*), *L. elongisporis* (*LELG_05449*), *D. hansenii* (*DEHA2F22154g*), *Sch. stipitidis* (*PICST_78111*), *C. tenuis* (*CANTEDRAFT_104615*), *S. pasalidarum* (*SPAPADRAFT_144561*), *M. guilliermondii* (*PGUG_00375*), *C. lusitaniae* (*CLUG_04281*), *S. cerevisiae* (*YIL001w*) sowie des Btb3 Proteins aus *S. pombe* (*SPAC13D6.04c*) durchgeführt. Homologe Bereiche sind jeweils farblich unterlegt. Konservierte AS sind im jeweils oberen Teil der Sequenz mit einem Stern markiert. Im unterem Bereich der Sequenz ist die jeweilige Homologie nochmals graphisch abgebildet. Das verwendete Programm war Clustal2W.

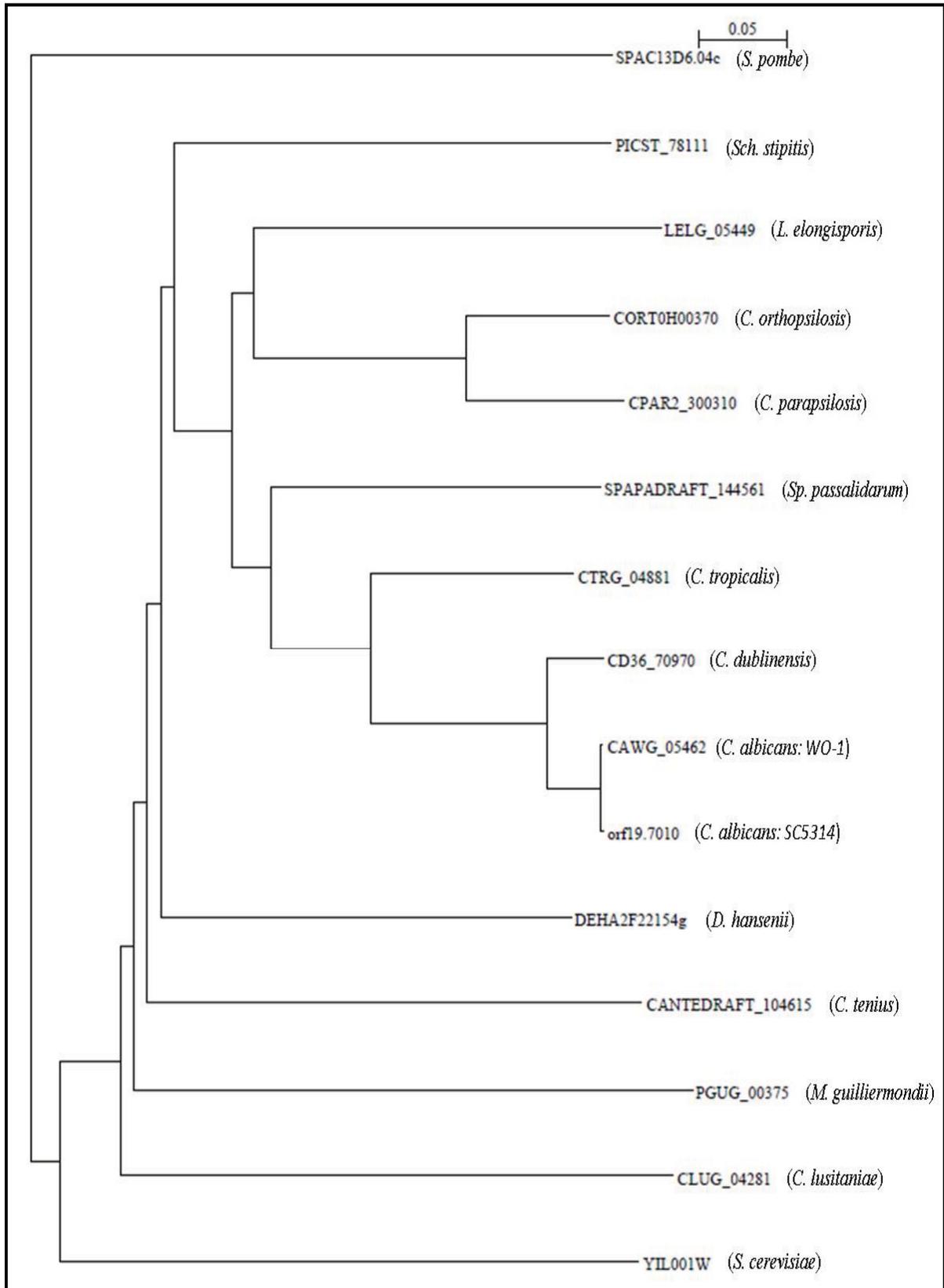


Abb. 3.6: Phylogenetischer Stammbaum von Psg1 und der zu Psg1 homologen Proteine

Ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen der zu Psg1 homologen Proteine wurde mit Clustal2W durchgeführt und mit Treeview dargestellt. Die Länge des Balkens repräsentiert eine evolutionäre Distanz von 0,05 Austauschen. Zusätzlich wurde die Aminosäuresequenz von Btb3 aus *S. pombe* hinzugefügt.

Die Aminosäuresequenz von Btb3 aus *S. pombe* weist an Positionen mit hoher Homologie zum Psg1-Protein charakteristische Sequenzmotive wie „ankyrin repeat“-Regionen (Position 85-114) und BTB-Domänen (Position 165-257 und 296-390) auf. Die Anwesenheit der BTB-Domänen sind dabei essenziell für die Funktion des Btb3-Proteins aus *S. pombe* (Geyer *et al.*, 2003). Die Anwesenheit dieser Domänen bei Psg1 und die hohe Homologie gegenüber orthologen Proteinen deutet darauf hin, dass das Psg1-Protein in *C. albicans* eine ähnliche Funktion haben könnte wie der E3 Ubiquitin-Substratadaptor Btb3 in *S. pombe* oder das humane ABTB1, welches ebenfalls als Substratadaptor fungiert. Um die phylogenetische Verwandtschaft der zu Psg1 homologen Proteine zu veranschaulichen, wurde zusätzlich mit dem Programm ClustalOMEGA ein Stammbaum erstellt (Abb. 3.6). Der Stammbaum zeigt, dass das Psg1-Protein aus *C. albicans* am nächsten zum homologen Protein aus *C. dublinensis* (Genprodukt von *CD36_70970*) steht und von den homologen Proteinen aus *S. pombe* (Btb3) und *S. cerevisiae* (Yil001w) phylogenetisch weit entfernt ist.

Fazit zu 3.1

PSG1 ist ein bisher uncharakterisiertes Gen in *C. albicans*. Es befindet sich auf Chromosom 7 zwischen den Basenpaaren 220611 und 218779. Neben dem *PSG1*-Gen ist der gesamte Genlokus mitsamt der benachbarten Gene ebenfalls weitestgehend uncharakterisiert. Der Vergleich mit homologen Genen anderer Pilze zeigt, dass der Genombereich um *PSG1* und den benachbarten Genen hoch konserviert ist. Die Aminosäuresequenz des Psg1-Proteins weist im N-terminalen Bereich typische Sequenzmotive von BTB-Domänen Proteinen (ankyrin repeat“-Region und BTB-Domänen) auf. Ferner enthält das Psg1-Protein vier potenzielle Ubiquitinierungsstellen und drei potenzielle Sumoylierungsstellen. Da Psg1 keine Signalsequenz oder Transmembrandomänen besitzt, ist eine Lokalisation innerhalb des Cytosol wahrscheinlich. Obwohl Psg1 innerhalb der Pilze ein hoch konserviertes Protein ist, konnte lediglich dem homologen Btb3-Protein aus *S. pombe* eine Funktion als Substratadaptor zugeordnet werden.

3.2 Disruption von *PSG1* in *C. albicans*

Um das Gen *PSG1* weitergehend untersuchen zu können, sollten ausgehend vom Wildtypstamm BWP17, *psg1*-Disruptionsmutanten hergestellt werden. Anders als bei der „Ura-Blaster“-Methode (Fonzi und Irwin, 1993) sollte die Disruption nach Mitchell (Wilson *et al.*, 1999) durchgeführt werden. Ausgehend hierfür war der Wildtypstamm BWP17 (*ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG*), der mit Deletionen in den Genen *URA3*, *HIS1* und *ARG4* über drei Auxotrophiemarker verfügt.

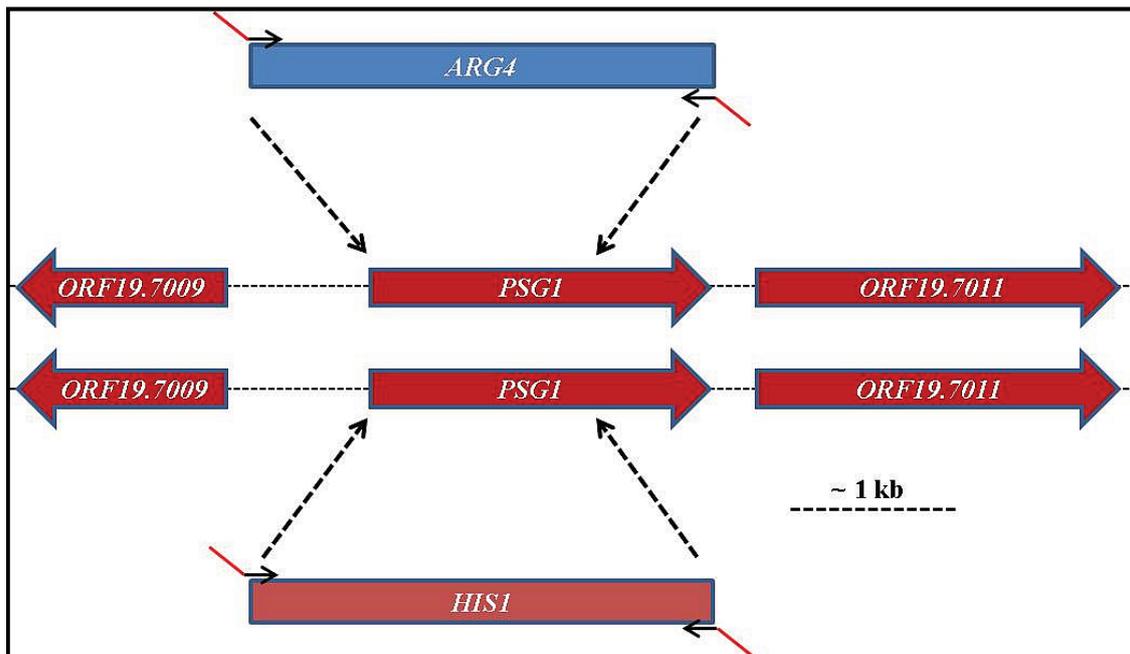


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Disruption des *PSG1* Gens in *C. albicans*. Gezeigt ist der *PSG1* Locus (dargestellt mit roten Pfeilen) mit seinen benachbarten Genen. Mittels Primerpaaren, welche 80 bp-lange Überhänge homolog zu den durch Pfeile gekennzeichneten Bereichen des *PSG1* Gens trugen, wurden die Gene *ARG4* (blauer Kasten) und *HIS1* (rosa Kasten) amplifiziert. Diese Amplifikate wurden nacheinander in den Stamm BWP17 transformiert, wodurch jeweils der N-terminale Bereich des *PSG1* Allels disruptiert wurde.

Bei dieser Methode wird der entsprechende Auxotrophiemarker mit kurzen, zum disruptierenden Gen homologen Überhängen amplifiziert. Bei einer Transformation des Amplifikates in den jeweiligen Stamm wird durch die kurzen homologen Überhänge das zu deletierende Gen durch die entsprechende Kasette (*URA3*, *HIS1* oder *ARG4*) ersetzt. In ersten Experimenten blieben Versuche, beide Allele in voller Länge zu deletieren, erfolglos. Ein möglicher Grund hierfür könnte das 400 bp-stromabwärts liegende Gen (*ORF19.7011*) sein, dessen Homolog in *S. cerevisiae* eine essenzielle Funktion hat. Eine Deletion des kompletten Leserasters von *PSG1* hätte möglicherweise zu einer Promotordeletion des benachbarten Gens führen können. Daher wurden im Falle der Disruption von *PSG1* nur die jeweiligen 5'-Bereiche beider Allele disruptiert (Abb. 3.7). Mittels der Primer oSU5 und oSU12 wurde dafür eine 2,7 kb-große *ARG4*-Disruptionskasette amplifiziert und in BWP17 transformiert. Die so hergestellten heterozygoten *psg1*-Mutanten wurden als CSU1 und CSU2 (*PSG1/psg1^{Δ8-351}::ARG4*) bezeichnet. Diese durch eine Southernanalyse verifizierten heterozygoten Mutanten (Material und Methoden: 2.2.2.1) wurden anschließend mit der 2,9 kb-großen *HIS1* Disruptionskasette, welche mittels der Primer oSU1 und oSU13 amplifiziert

wurde, transformiert und durch Southernanalyse (Material und Methoden: 2.2.2.1) verifiziert. So entstanden die Stämme CSU3 und CSU4 (*psg1* $\Delta^{8-351}::ARG4/psg1\Delta^{8-351}::HIS1$), welche weitergehend charakterisiert wurden.

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der *psg1*-Disruptionsmutanten

Aus früheren Arbeiten ging hervor, dass eine einzelne Disruption von *YIL001w* in *S. cerevisiae* kein verändertes Wachstumsverhalten oder eine Verminderung der Sensitivität gegenüber dem K1-Killertoxin zur Folge hat (Wickert, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Disruption von *PSG1* in *C. albicans* Phänotypen der Mutante zur Folge hat. Bei *S. cerevisiae* wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich diverser Sensitivitäten, wie beispielsweise gegenüber Zellwand-destabilisierender Substanzen oder morphologische Analysen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gemacht. Für die *C. albicans psg1*-Mutante erfolgte daher eine umfangreiche Suche nach etwaigen Phänotypen. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden stets zwei unabhängig voneinander konstruierte *psg1*-Mutanten (CSU3 und CSU4) mit identischen Phänotypen eingesetzt, jedoch wurde nur je eine Mutante dargestellt.

3.2.1.1 Wachstum und Morphogenese der *psg1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Die Fähigkeit zum Dimorphismus von *C. albicans* ist eine wichtige Voraussetzung für die Virulenz dieses Pilzes. Auch wenn die Kultivierung in Vollmedium nicht die Bedingungen diverser Nischen im menschlichen Körper widerspiegelt, sollte zunächst untersucht werden, inwieweit das Wachstum der *psg1*-Disruptionsmutanten mit dem eines Wildtypstammes in Vollmedium vergleichbar ist. Hierfür wurden CAI4 als Wildtypstamm, CSU2 als heterozygote und CSU3 als homozygote Disruptionsmutante verwendet. Die Vorkulturen dieser Stämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und in 2 % glucosehaltiges YPD-Medium überführt. Von diesem Zeitpunkt an wurden alle zwei Stunden die OD₆₀₀ der Kulturen ermittelt (Abb. 3.8). Im Vergleich zum Wildtypstamm wiesen beide Disruptionsmutanten keinerlei Unterschiede in Bezug auf ihre Wachstumsrate und Morphologie in YPD-Medium auf. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen auch unter hypheninduzierenden Bedingungen in Flüssigmedium getestet (Abb. 3.9). Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden. Anders verhielt es sich bei Wachstum auf Festmedien unter hypheninduzierenden Bedingungen. Abb. 3.10 zeigt das Hyphenwachstum von Wildtyp und *psg1*-Disruptionsmutanten auf verschiedenen Festmedien. Hierfür wurden verschiedene Induktoren für das hyphale Wachstum eingesetzt. Bei Spider-Medium kommt es vermutlich aufgrund der limitierten Kohlenstoff-Quelle zum hyphalen Wachstum, bei YPM ist vermutlich das im Medium enthaltene Mannitol der Induktor, während bei mit 10 % Pferdeserum versetztem YP-Medium das im Serum enthaltene Muramyl-Dipeptid für das hyphale Wachstum verantwortlich ist (Xu *et al.*, 2008). In Abb. 3.12 ist zu sehen, dass die heterozygote Mutante (CSU2) keinerlei Unterschiede zum Wildtypstamm aufwies. Bei der homozygoten *psg1*-Mutante unter verschiedenen hypheninduzierenden Bedingungen (Spider-Medium; YPM; YP+10 % Serum) auf Festmedien war jedoch kein hyphales Wachstum sichtbar. Somit führt die Disruption beider *PSG1*-Allele zum Phänotyp eines gestörten hyphalen Wachstums auf Festmedien.

Abb. 3.8: Wachstumskurve der *psg1*-Disruptionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Die Stämme CAI4 (WT), CSU2 (*PSG1/Δpsg1*) und CSU3 (*Δpsg1/Δpsg1*) wurden, ausgehend von einer YPD Übernachtskultur, auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und bei 30 °C angezogen. Die Graphen zeigen die Entwicklung der OD_{600} (y Achse) dieser Stämme in Abhängigkeit einer 24 stündigen Inkubationszeit (x Achse: zeitlicher Verlauf in Stunden).

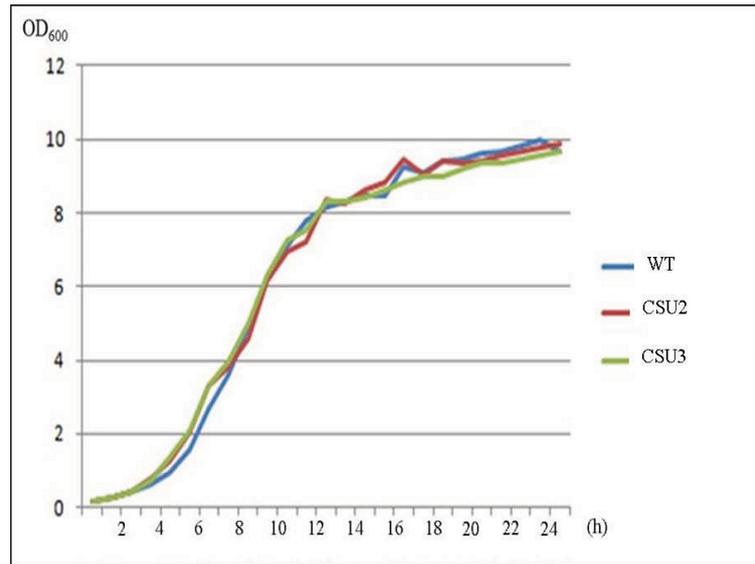


Abb. 3.9: Morphologie der *psg1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in Flüssigmedium

Die Stämme CAI4 (links), CSU2 (mittig) und CSU3 (rechts) wurden, ausgehend von einer YPD Übernachtskultur, auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt und unter hefeinduzierenden (YPD 30 °C; obere Bildreihe) und hypheninduzierenden Bedingungen (YP+10 % Serum bei 37 °C; untere Bildreihe) kultiviert. Nach 2 Stunden wurden jeweils Proben entnommen und unter 100-facher Vergrößerung mikroskopiert.

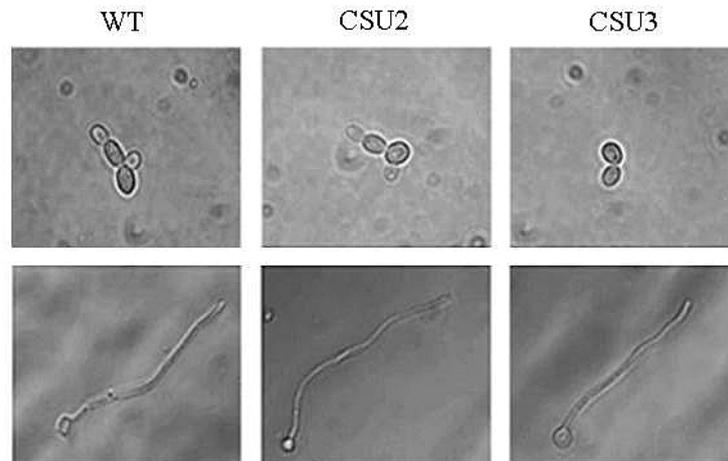
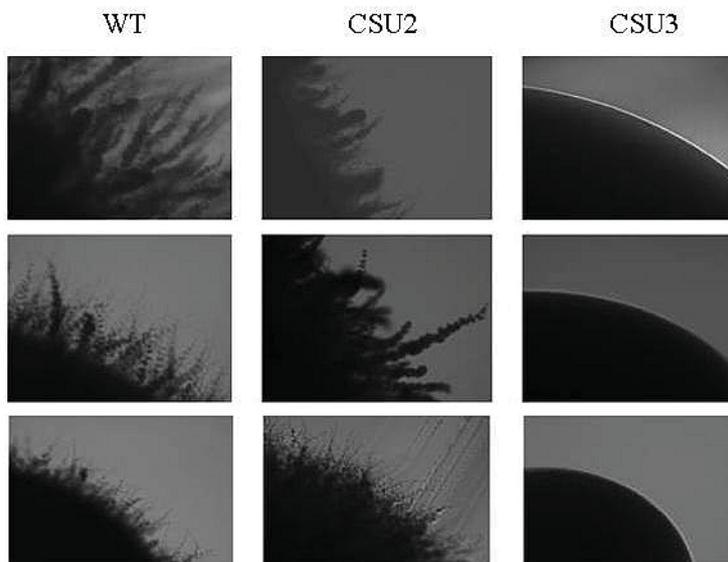


Abb. 3.10: Morphologie der *psg1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf hypheninduzierenden Festmedium

Disruptionsmutanten und Wildtyp wurden auf verschiedenen hypheninduzierenden Festmedien 2-5 Tage bei 37 °C angezogen und mikroskopisch unter 10-facher Vergrößerung auf ihr Hyphenwachstum untersucht. Obere Bildreihe: Spider-Medium. Mittlere Bildreihe YP+Mannitol. Untere Bildreihe: YP+10 % Serum.



3.2.1.2 Expression von *PSG1* im Wildtypstamm und der Disruptionsmutante

Um zu zeigen, dass der hyphale Defekt-Phänotyp der *psg1*-Disruptionsmutante tatsächlich der Disruption des *PSG1* Gens zugrunde liegt, sollte dieser Defekt durch Einbringen eines intakten *PSG1*-Allels in die Mutante komplementiert werden. Hierfür wurde das Plasmid pDS-YIL [S-5] konstruiert, welches den kompletten *PSG1*-Leseraster unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors trägt. Dieses Plasmid wurde in den Stamm CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) sowie in den wildtypischen Stamm CAI4, transformiert. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pDS1044-1 ebenfalls in die Stämme CSU3 und CAI4 transformiert. Die Transformation der Plasmide, die den chromosomalen *CaARS*-Replikator enthalten, erfolgte ohne eine Integration in das Genom der Stämme (frei replizierende Plasmide).

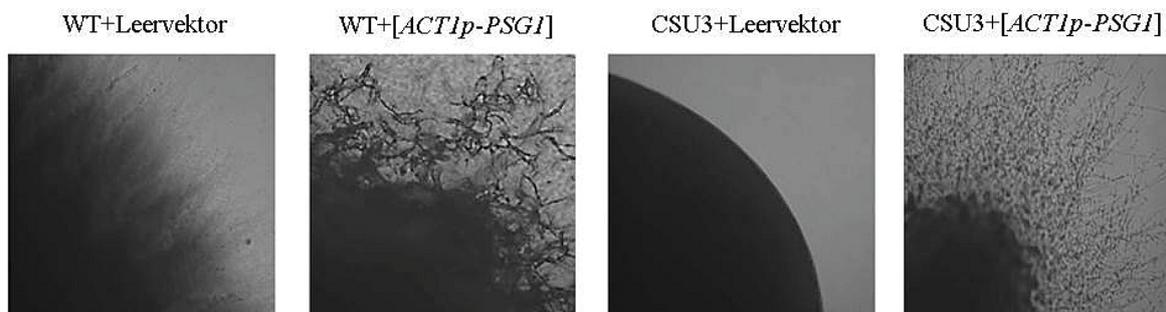


Abb. 3.11: Hyphenwachstum von Wildtyp und Mutanten unter Expression von *PSG1*

Das hyphale Wachstum von Kolonien der Stämme CAI4+pDS1044-1 (WT+Leervektor) CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CSU13 (CSU3+Leervektor) und CSU11 (CSU3+[*ACT1p-PSG1*]) wurde auf mannitolhaltigem-Medium nach 4 Tagen mikroskopisch unter 10-facher Vergrößerung dokumentiert.

Die Transformanten wurden im Anschluss auf ihr hyphales Wachstum untersucht (Abb. 3.11). Die Expression des *PSG1*-Gens unter Kontrolle des Aktinpromotors hatte keinen Einfluss auf das hyphale Wachstum des Wildtypstammes, jedoch konnte seine Expression das gestörte Hyphenwachstum der homozygoten *psg1*-Mutante (CSU3) komplementieren. Eine mit dem Leerplasmid pDS1044-1 transformierte *psg1*-Mutante (CSU8) zeigte dagegen kein verändertes Hyphenwachstum im Vergleich zum Stamm CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$). Hierdurch wurde bewiesen, dass der Phänotyp des gestörten Hyphenwachstums des Stammes CSU3 allein der Disruption beider *PSG1*-Allele zugrunde liegt und nicht durch eine zufällig hervorgerufene Mutation bewirkt wurde. Ferner zeigte die zweite homozygote *psg1*-Mutante, CSU4, dieselben Phänotypen wie CSU3, was die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ereignisses weiterhin minimiert.

Der *PSG1*-Transkriptspiegel wurde in den getesteten Stämmen durch qPCR ermittelt. In Abb. 3.12 ist zu sehen, dass der *PSG1* Transkriptspiegel im Wildtypstamm CAI4, transformiert mit dem Plasmid pDS-YIL [S-5], um die doppelte Transkriptmenge gegenüber der Transformante mit dem Leervektor (CSU13) anstieg. Daher kann im Falle des Stammes CSU11 von einer Überexpression des *PSG1*-Gens gesprochen werden. In der mit dem Leervektor pDS1044-1 transformierten *psg1*-Disruptionsmutante war wie erwartet kein *PSG1*-Transkript nachweisbar. Für die *psg1*-Mutante, die das Plasmid pDS-YIL [S-5] trägt, konnte erwartungsgemäß *PSG1*-Transkript nachgewiesen werden, wenn auch nicht in der Menge des Wildtyps. Jedoch war dieser Transkriptspiegel offenbar ausreichend, um den Phänotyp des gestörten Hyphenwachstums der *psg1*-Mutante zu komplementieren.

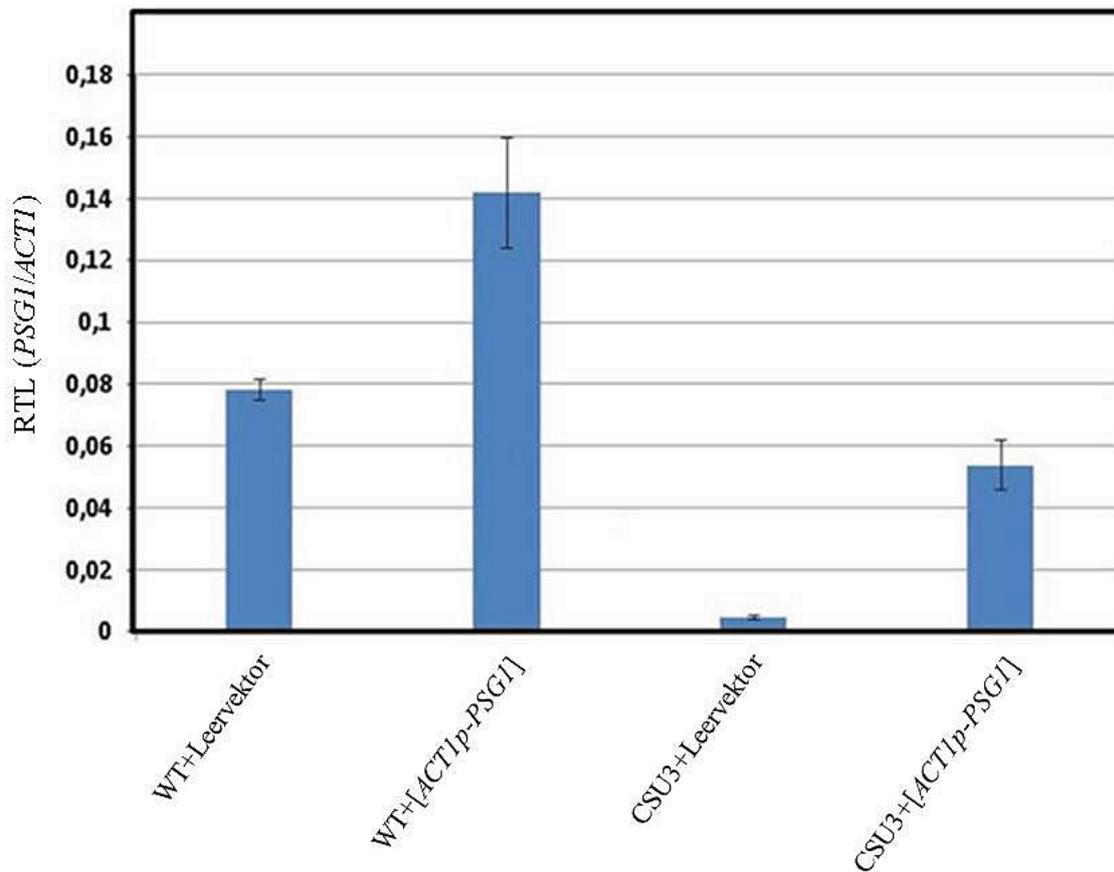


Abb. 3.12: Relativer Transkriptspiegel von *PSG1* in WT, *psg1*-Mutante und Überexpressionsstämmen
Die relativen Transkriptspiegel (RTL) von *PSG1* (*ACT1*-Transkript als Referenz) wurden in den Stämmen CAI4+pDS1044-1 (WT+Leervektor), CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CSU13 (CSU3+Leervektor) und CSU11 (CSU3+[*ACT1p-PSG1*]) durch qPCR ermittelt. Bei den Messungen wurden pro Stamm drei biologische und drei technische Replikate verwendet.

3.2.1.3 Sensitivitäten der *psg1*-Disruptionsmutanten

Bereits in früheren Arbeiten konnte für *C. albicans* gezeigt werden, dass Defekte in der *O*-Glykosylierung zu erhöhten Sensitivitäten gegenüber Zellwand-destabilisierende Substanzen, Chemotherapeutika sowie gegenüber einer Reihe anderer Substanzen zur Folge haben (Prill *et al.*, 2005). Das in *S. cerevisiae* zu *PSG1* homologe Gen *YIL001w* wurde im Rahmen einer Untersuchung zu *O*-Glykosylierungsdefekten isoliert. Es liegt also nahe, dass *PSG1* an den Prozessen der *O*-Glykosylierung beteiligt ist und demzufolge für *psg1*-Disruptionsmutanten ähnliche Sensitivitäten gegenüber diversen Substanzen zu erwarten sind. Es wurden Tropftests mit den *psg1*-Disruptionsmutanten CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) und CSU4 ($\Delta psg1/\Delta psg1$), den rekonstituierten Stämmen CSU11 und CSU12 ($\Delta psg1/\Delta psg1$ +pDS-YIL [S-5]) und dem Überexpressionsstamm CSU8 (WT+pDS-YIL [S-5]) unter Einfluss verschiedener Substanzen durchgeführt. Da bei den verwendeten Stämmen das *URA3*-Gen nicht am nativen Locus rekonstituiert wurde, diente als vergleichbarer Wildtypstamm CAI4 ($\Delta ura3/\Delta ura3$), welcher mit dem Leerplasmid pDS1044-1 transformiert wurde (CSU13). Anders als bei Prill (2004), wurde hier als Testmedium YPD benutzt. Damit die Stämme aber ihre Plasmide nicht bereits in der Vorkultur verlieren, wurde hierfür SD-Minimalmedium verwendet.

Sensitivität gegenüber Phloxin B

Phloxin B ist ein nicht-toxisches antibakterielles Färbemittel, welches eingesetzt wird um abgestorbene Zellen und Zellen, die sich in der "opaque"-Form befinden, rot anzufärben. Bei Bakterien bildet es eine nicht-toxische Alternative zur Unterscheidung Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (Rasooly, 2006). Ferner vermuteten Prill *et al.* (2005) am Beispiel einer heterozygoten *pmt2*-Mutante, dass eine Färbung von *C. albicans* durch Phloxin B Zellwanddefekte und eine erhöhte Permeabilität der Zelle implizieren könnte. Im Rahmen der Sensitivitätstests zeigte sich, dass im Falle die *psg1*-Mutante Phloxin B in die Zelle eindringen kann und es zur Färbung der Kolonien kommt (Abb. 3.13). Da weder eine verminderte Zellvitalität, noch die "opaque"-Form als primäre morphologische Form dieser Mutante (Abb. 3.9) nachgewiesen werden konnte, lässt sich vermuten, dass die Zellen eine erhöhte Permeabilität ihrer Zelloberfläche aufweisen.

Sensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierenden Substanzen

Kongorot ist ein Farbstoff, der die laterale Interaktion der Glykan-Mikrofibrillen blockiert und die Zellwand so destabilisiert (Kopecka und Gabriel, 1992). Der Test vermeintlicher Glykosylierungsmutanten auf Sensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierender Substanzen ist relevant, da ein großer Anteil an Glykoproteinen wichtige Komponenten der Zellwand sind und zu ihrer stabilisierenden sowie kommunikativen Funktion beitragen (Free, 2013). Die *psg1*-Mutanten waren gegenüber Kongorot zwar nicht sensitiv (Abb. 3.13), allerdings schienen die *psg1*-Mutanten anhand der leichten Färbung der Kolonien den Farbstoff, im Vergleich zu Wildtyp und rekonstituierten Stämmen, besser aufzunehmen. Eine weitere Zellwand-destabilisierende Substanz ist Caspofungin, ein Antimykotikum aus der Gruppe der Echinocandine, welches die β 1,3-Glukan-Synthase inhibiert und breite Anwendung bei Pilzinfektionen findet. Die *psg1*-Mutanten zeigten eine starke Sensitivität gegenüber Caspofungin, welche von den rekonstituierten Stämmen lediglich partiell komplementiert werden konnte (Abb. 3.13). Dies mag jedoch am leicht verminderten *PSG1*-Transkriptspiegel in den rekonstituierten Stämmen liegen, welcher in Abschnitt 3.2.1.2 gezeigt werden konnte.

Sensitivität gegenüber Tunicamycin

Als Struktur analog des UDP-GlcNAc führt Tunicamycin (aus *Streptomyces* sp.) zu einer Hemmung von *N*-Acetylglucosamintransferasen und somit zur Störung der *N*-Glykosylierung von Glykoproteinen (Pierce *et al.*, 2009; Dudgeon *et al.*, 2008). Tunicamycin blockiert die Entstehung von *N*-glykosidischen Bindungen, da es den Transfer von *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphat zum Dolichol-Monophosphat inhibiert. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Tunicamycin ist ein Gemisch mehrerer verwandter Substanzen, welche sich in der Komposition und Länge ihrer Fettsäuren unterscheiden (Produktinformation Sigma-Aldrich: Tunicamycin). Aufgrund der Störung der *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin erhöht sich im ER die Anzahl an ungefalteten Proteinen. Eine Folge des ER-Stresses ist die verstärkte Aktivierung des „unfolded protein response“ (UPR)-Weg (Bonilla *et al.*, 2002). Die *psg1*-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp und der rekonstituierten Stämme (CSU11 und CSU12) sensitiv gegenüber Tunicamycin (Abb. 3.14). Im Rahmen dieses Experiments wurde eine sehr geringe Konzentration an Tunicamycin im Medium verwendet, da bei vorherigen Versuchen das Wachstum des Wildtypstammes erheblich gestört wurde (Daten nicht gezeigt). Dennoch

wird durch das verminderte Wachstum der *psg1*-Mutante schon bei geringen Tunicamycin-Konzentrationen die Hypersensitivität der Mutante gegenüber Tunicamycin deutlich.

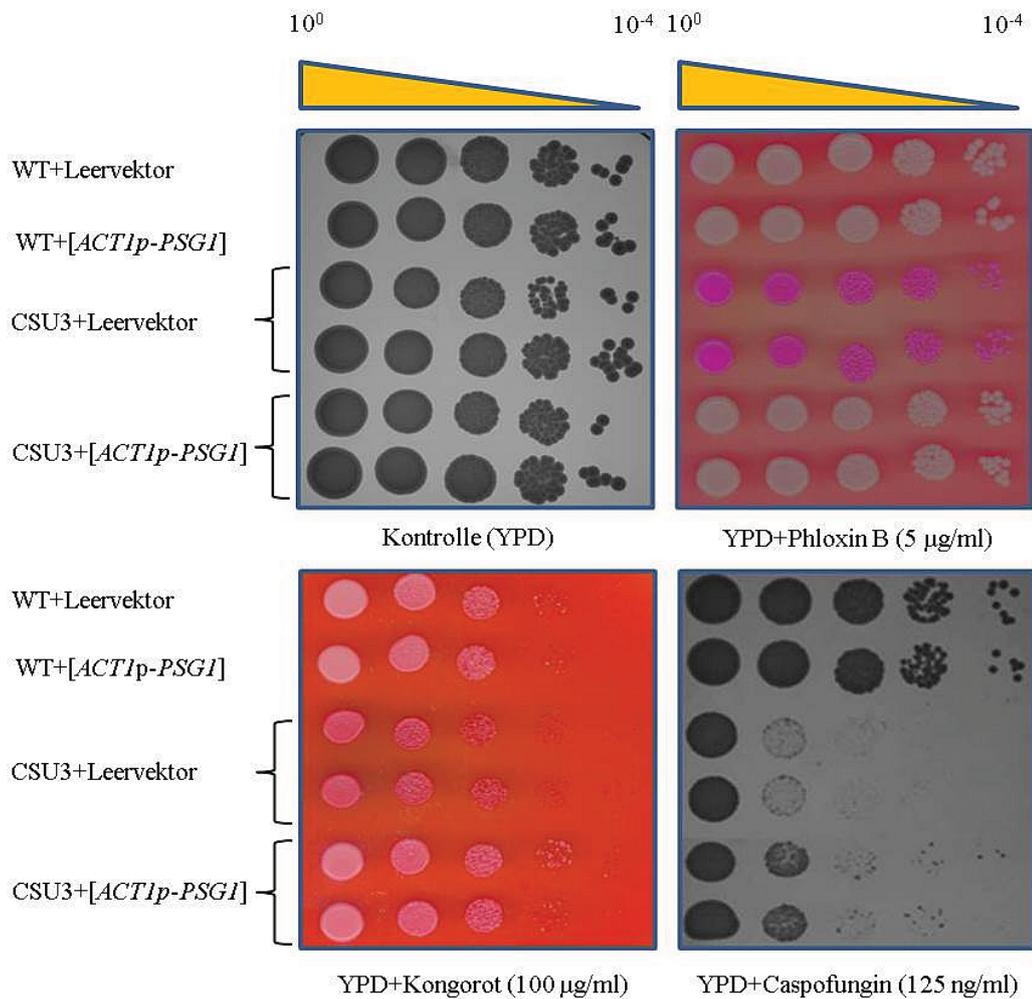


Abb. 3.13: Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen

Übernachtskulturen der Stämme CAI4+pDS1044-1 (WT+Leervektor) CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CSU13 (CSU3+Leervektor) und CSU11 (CSU3+[*ACT1p-PSG1*]) wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und seriell verdünnt. Diese Verdünnungen wurden auf verschiedenen YPD-Medien (YPD, YPD mit Phloxin B, YPD mit Kongorot, YPD mit Caspofungin) aufgetropft und bei 30 °C drei Tage inkubiert.

Sensitivität gegenüber *Pmt1*-Inhibitor

Als *Pmt1*-Inhibitoren werden Rhodamin-3-Essigsäurederivate verwendet, die zur Hemmung der *Pmt1*-Aktivität führen (Orchard *et al.*, 2004). Für *C. albicans* konnte die Wirksamkeit dieser Inhibitoren bereits nachgewiesen werden. Prill *et al.* 2005 zeigten, dass die Zugabe einiger dieser Derivate zum Wachstumsstopp von *pmt4*-Mutanten führt und somit lethal für die Zelle sind. Eine Zugabe des *Pmt1*-Inhibitors simuliert in einer *pmt4*-Mutante, durch die Unterdrückung der *Pmt1*-Aktivität, eine *pmt1 pmt4*-Doppelmutante (lethaler Phänotyp). Da für das Homolog von *PSG1* in *S. cerevisiae* ein synthetischer Phänotyp im Hintergrund einer *pmt1*-Mutante gezeigt werden konnte, war es naheliegend, dass eine *psg1*-Mutante in *C. albicans* gegenüber einer Hemmung der Protein *O*-Mannosyltransferase 1 (*Pmt1*) sensitiv sein würde. Anhand von Abb. 3.14 wurde diese Annahme bestätigt. Die *psg1*-Mutante zeigt eine

deutliche Sensitivität gegenüber dem *Pmt1*-Inhibitor. Ferner konnte dieser Phänotyp durch Expression von *PSG1* im Stamm CSU11 komplementiert werden.

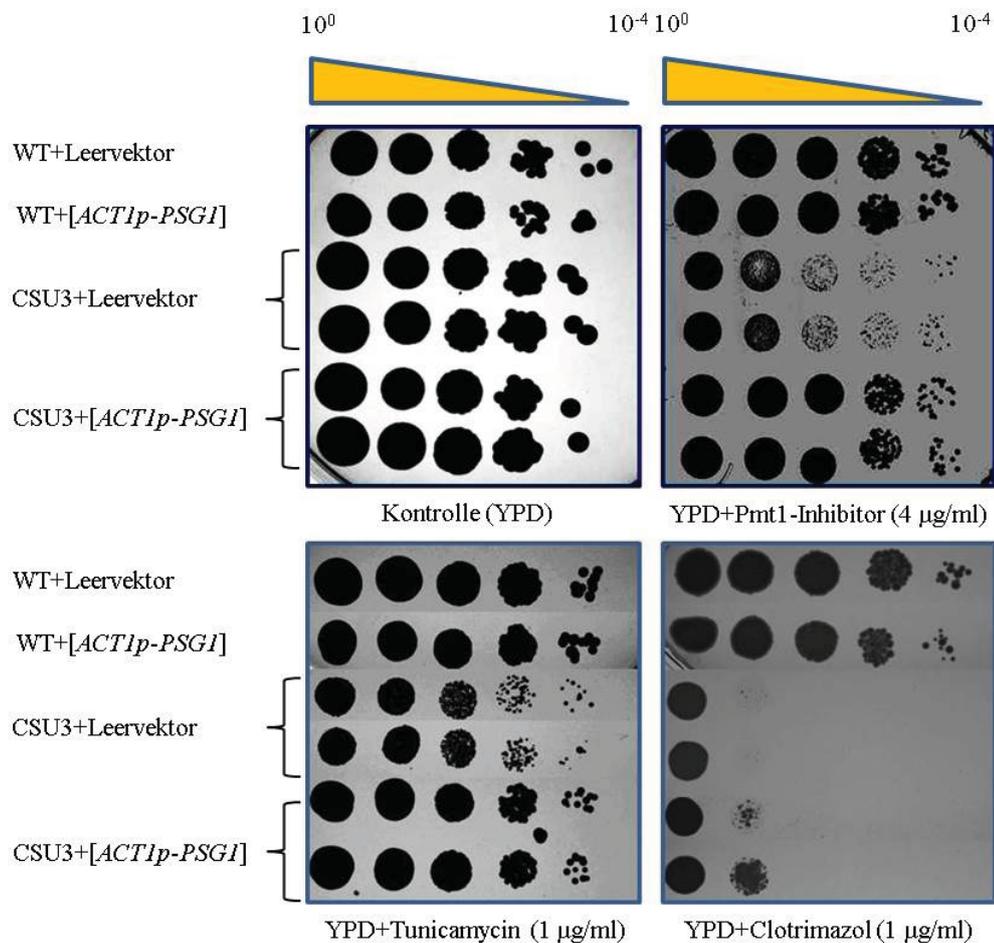


Abb. 3.14: Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen

Übernachtskulturen der Stämme CAI4+pDS1044-1 (WT+Leervektor), CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CSU13 (CSU3+Leervektor) und CSU11 (CSU3+[*ACT1p-PSG1*]) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und seriell verdünnt. Diese Verdünnungen wurden auf verschiedenen YPD-Medien (YPD, YPD mit *Pmt1*-Inhibitor, YPD mit Tunicamycin, YPD mit Clotrimazol) aufgetropft und bei 30 °C drei Tage inkubiert.

Sensitivität gegenüber Clotrimazol

Clotrimazol gehört als Imidazol zur Stoffgruppe der Azole. Azole sind heterozyklische Verbindungen, die eingesetzt als Antimykotika, gegen die Lanosterol-Demethylase innerhalb der Ergosterolsynthese gerichtet sind. Die Lanosterol-Demethylase ist ein Cytochrom P450-Enzym und besitzt ein Häm-Motiv an seinem aktiven Zentrum. Cytochrom P450a-Enzyme fungieren als Demethylasen und katalysieren die oxidative Abspaltung der 14 α -Methylgruppe von Lanosterol (White *et al.*, 1998). Azole besitzen am Stickstoff ein freies Elektronenpaar, durch das sie das Eisenatom des Häm-Motivs der Lanosterol-Demethylase binden können und die Bindung von O₂ unterdrücken (Balding *et al.*, 2008). Hierdurch werden die Demethylierung des Lanosterols und somit auch die Synthese von Ergosterol verhindert. Ergosterol ist ein wichtiger und einzigartiger Bestandteil der Membranen von Pilzzellen und hat daher Einfluss auf die Fluidität sowie die Permeabilität der fungalen Zellmembran (Berg *et al.*, 1984). Anhand von Abb. 3.14 wird deutlich, dass die *psg1*-Mutante eine sehr hohe

Sensitivität gegenüber Clotrimazol aufweist. Durch die Expression des Plasmids pDS-YIL [S-5] in der Mutante (CSU11) konnte dieser Effekt lediglich partiell komplementiert werden. Die Mutante zeigt hingegen keinerlei Sensitivität gegenüber Fluconazol (Daten nicht gezeigt), welches ebenfalls gegen dieselbe Lanosterol-Demethylase gerichtet ist.

3.2.1.4 Virulenz einer *psg1*-Disruptionsmutante

Mithilfe einer für *URA3* rekonstituierten *psg1*-Mutante (CSU3-URA3; hergestellt von Agnes Kowalski) wurde die Virulenz des Stammes bei einer systemischen Infektion in Mausmodell untersucht. Die Experimente wurden von Anna Vecchiarelli (Universität Perugia) durchgeführt und die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt (Abb. 15). Der Test zeigt, dass bei Infektion mit einer *psg1*-Mutante 100 % aller Mäuse überleben und sogar an Gewicht zulegen. Die *psg1*-Mutante ist daher völlig avirulent.

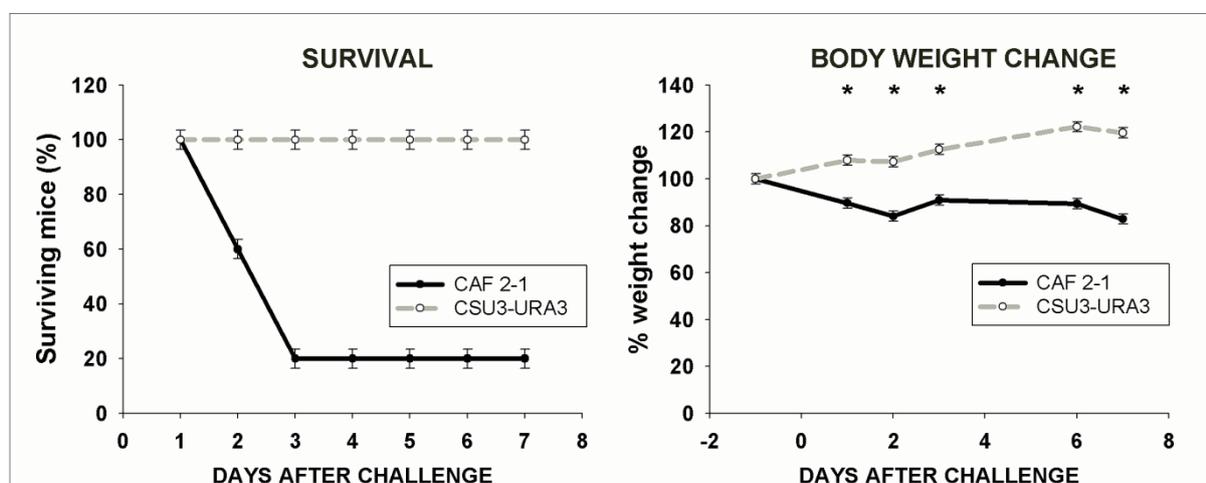


Abb. 3.15: Virulenz einer *psg1*-Mutante im Mausmodell (systemische Infektion)

Virulenz des Stammes CSU3-URA3 im Vergleich mit dem Wildtyp (CAF2-1). Im linken Bild ist die Überlebensrate infizierter Mäuse in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Im rechten Bild ist die Gewichts- oder abnahme der infizierten Mäuse im Verlauf der Infektion dargestellt.

Fazit zu 3.2

In *C. albicans* konnten zwei voneinander unabhängige *psg1*-Deletionsmutanten konstruiert werden. Dabei wurde jeweils der N-terminale Teil des *PSGI*-Leserasters durch homologe Rekombination disruptiert. Eine solche Deletion des *PSGI*-Gens führte in *C. albicans* zur Ausbildung verschiedener Phänotypen. Diese Phänotypen beinhalten ein defektes Hyphenwachstum auf Festmedien und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tunicamycin, Clotrimazol, Pmt1-Inhibitor und Caspofungin. Ferner scheint die Zelloberfläche permeabler für den Farbstoff Phloxin B zu sein. Die detektierten Defekte und Sensitivitäten der *psg1*-Mutanten ähneln teilweise denen einiger *pmt*-Mutanten in *C. albicans*. Die von Anna Vecchiarelli durchgeführten Virulenztests ergaben, dass die *psg1*-Mutante im Mausmodell (systemische Infektion) völlig avirulent ist. Alle Phänotypen (außer der Avirulenz) der *psg1*-Mutante konnten durch Transformation mit einem Plasmid, durch welches das *PSGI*-Gen unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors exprimiert wird, zumindest partiell komplementiert werden.

3.3 Lokalisation von Psg1

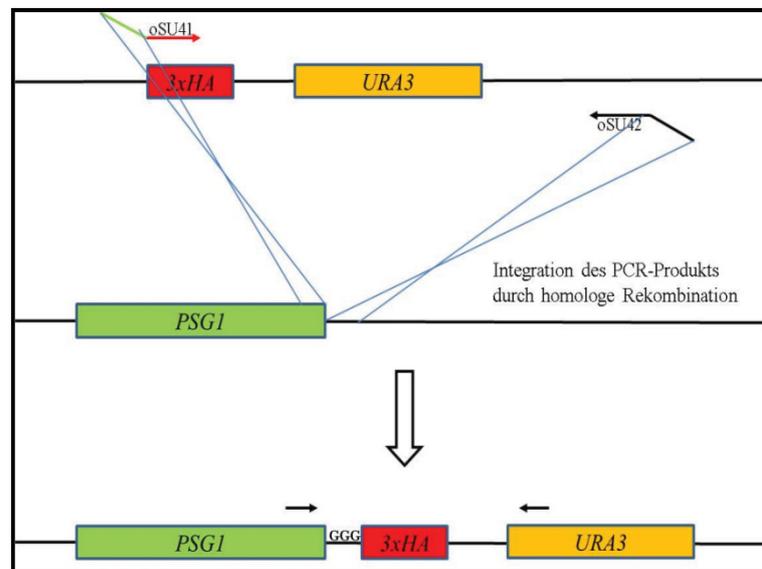
Da bisher der Leseraster *ORF19.7010 (PSG1)* in *C. albicans* als nicht verifiziert galt (<http://www.candidagenome.org>), sollte die Existenz eines Genprodukts von *PSG1* durch Immunoblotanalysen und dessen intrazelluläre Lokalisation durch Immunofluoreszenz nachgewiesen werden. Vor allem durch die Lokalisation von Psg1 sollten Rückschlüsse über die Funktion des Proteins gemacht werden können. Da für das Protein kein spezifischer Antikörper existiert, wurde eine Genfusion mit einem dreifachen HA-Epitop am C-terminalen Bereich von Psg1 durchgeführt. In früheren Arbeiten (Prill *et al.*, 2005; Noffz *et al.*, 2008) konnte für *C. albicans* eine spezifische Detektion dieses Epitops sowie die Funktionalität der konstruierten Fusionsproteine, nachgewiesen werden. Als Ausgangsstamm diente eine heterozygote *PSG1/psg1*-Mutante. Die Fusion mit dem HA-Epitop sollte darin am intakten *PSG1*-Allel geschehen, da nur die homozygote *psg1*-Mutante Defektphänotypen zeigt.

3.3.1 Markierung von Psg1 mit dem HA-Epitop

Um Psg1 innerhalb der Zelle lokalisieren zu können, sollte durch die Fusion mit einem dreifachen HA-Epitop am C-Terminus das Protein detektierbar für kommerzielle Antikörper gemacht werden. Entsprechend der bereits von Prill *et al.*, (2005) für die Fusion des Axl2-Proteins gezeigten Methode wurde auch im Falle der Markierung von Psg1 mit dem HA-Epitop vorgegangen (Abb. 3.16). Anhand des Plasmids p3HA-URA3, welches hier als Template fungierte, wurde eine PCR mit den Primern oSU41 und oSU42 durchgeführt.

Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Markierung von Psg1 mit einem dreifachen HA-Epitop

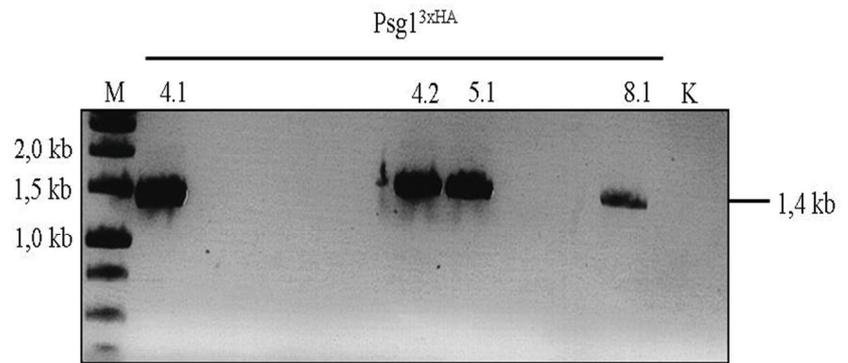
Mithilfe der Primer oSU41 und oSU42 wurde anhand des Plasmids p3HA-URA3 ein 2,7 kb-langes PCR-Fragment amplifiziert und in den Stamm CSU2 transformiert. Durch die 80 bp-langen Überhänge der Primer, welche homolog zum 3'-Ende des *PSG1*-ORF waren, erfolgte via homologer Rekombination die Insertion des PCR-Fragmentes in den *PSG1*-Lokus. Die Verifizierung erfolgte neben den Immunoblots durch PCR. Die Lage der hierfür verwendeten Primer sind im unteren Teil der Abbildung durch Pfeile dargestellt.



Diese Primer wiesen 80 bp-lange Überhänge, homolog zum 3'-Ende des *PSG1*-ORF, auf. Das so amplifizierte PCR-Produkt wurde in den Stamm CSU2 transformiert, welcher noch ein intaktes *PSG1*-Allel trägt und für Uridin und Arginin auxotroph ist. Durch die Integration der homologen Bereiche entstand ein *PSG1*-Allel, welches für ein Protein kodiert, das am C-Terminus über 3 Glycin-Reste mit einem dreifachen HA-Epitop fusioniert ist. Positive Transformanten wurden über Wachstum auf mit Arginin versetzten SD-Platten ermittelt und anschließend auf korrekte Insertion des PCR-Produkts via PCR und Immunoblot verifiziert.

Abb. 3.17: Verifizierungs-PCR der Psg1^{3xHA}-Transformanten

Um die korrekte Insertion des transformierten PCR-Fragments zu überprüfen, wurde anhand der gDNA der Transformanten eine PCR mit den Primern oSU43 (bindet im *PSG1*-Lokus) und oSU245 (bindet in *URA3*-Lokus) gemacht. Bei korrekter Insertion wurde ein 1,4 kb-großes Fragment amplifiziert.



Für die Verifizierungs-PCR wurde genomische DNA aus den Transformanten sowie die Primer oSU43 (bindet im C-Terminus von *PSG1*) und oSU245 (bindet innerhalb des *URA3* Gens) verwendet. Bei korrekter Integration des transformierten PCR-Fragments konnte ein 1,4 kb-langes PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.17). Von den als positiv getesteten Transformanten wurden im Anschluss Protein-Rohextrakte hergestellt und via Immunoblot auf das Vorhandensein eines mit HA-Antikörpern detektierbaren Fusionsproteins untersucht (Abb. 3.18). Die errechnete Größe eines Psg1^{3xHA} Fusionsproteins beträgt 74 kDa.

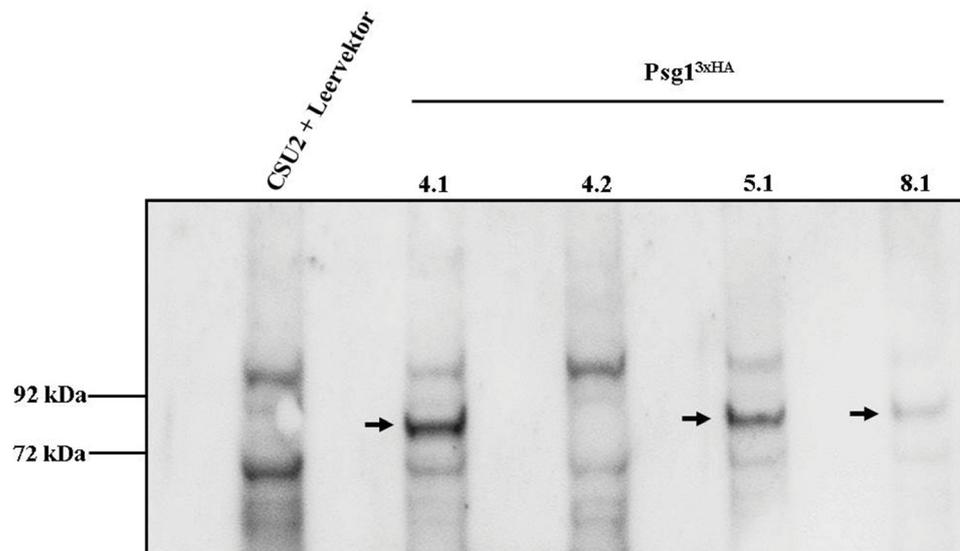


Abb. 3.18: Immunoblotanalyse der verifizierten Transformanten auf das Vorhandensein von Psg1^{3xHA}

Von den in Abb. 3.16 verifizierten Transformanten wurden Rohextrakte extrahiert und via Immunoblotanalyse auf die Detektierbarkeit eines mit dem 3xHA-Epitop markierten Psg1-Fusionsprotein hin untersucht. In den Rohextrakten der Transformanten 4.1, 4.2 und 8.1 konnte ein Protein mit einer molekularen Masse von 80 kDa spezifisch detektiert werden (durch Pfeile gekennzeichnet). Die Detektion erfolgte mittels eines kommerziellen Antikörpers, welcher gegen das HA-Epitop gerichtet ist.

In den Rohextrakten der Transformanten 4.1, 5.1 sowie 8.1 konnte eine Bande von ca. 80 kDa detektiert werden, welche in der Negativkontrolle nicht auftauchte. Auch war ein relativ hoher Hintergrund an unspezifischen Signalen bei der Negativkontrolle zu beobachten, was vermutlich zum Teil auf die hohe Expositionszeit im LAS-Gerät zurückzuführen ist. Anhand der Detektion spezifischer Banden der Transformanten 4.1, 5.1, und 8.1 wird deutlich, dass das Protein Psg1 erfolgreich mit dem HA-Epitop markiert werden konnte. Die so identifizierten Stämme wurden als CSU5 (Transformante 4.1), CSU6 (Transformante 5.1) und CSU7 (Transformante 8.1) bezeichnet.

3.3.2 Funktionalitätstest des Psg1^{3xHA}-Fusionsproteins

Die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins und seine Funktionalität sind voneinander abhängig (Geda *et al.*, 2008). Bevor also die intrazelluläre Lokalisation von Psg1 anhand der Stämme CSU5, CSU6 und CSU7 untersucht werden konnte, musste zunächst sichergestellt werden, dass die mit dem HA-Epitop markierten Proteine auch funktionell sind. Dies wurde anhand des Hyphenwachstums auf mannitolhaltigem YP-Medium getestet. Die *psg1*-Disruptionsmutante CSU3, transformiert mit dem Leervektor pDS1044-1, ist nicht in der Lage auf mannitolhaltigem YP-Medium hyphal zu wachsen. Da die heterozygote Mutante CSU2 ($\Delta psg1/PSG1$), die auch als Ausgangsstamm für die Psg1 Epitopmarkierung diente, diesen Defekt nicht zeigt, kann nur ein funktionelles Psg1^{3xHA} hyphales Wachstum der Stämme gewährleisten.



Abb. 3.19: Test auf hyphales Wachstum auf Festmedium unter hypheninduzierenden Bedingungen

Die Stämme BWP17 (WT), CSU13 (CSU3+Leervektor) und CSU6 ($\Delta psg1/PSG1^{3xHA}$) wurden auf mannitolhaltigem YP-Medium vereinzelt und bei 37 °C 3-4 Tage lang inkubiert. Hyphenwachstum der Kolonien wurde mikroskopisch unter 10-facher Vergrößerung dokumentiert.

Wie anhand von Abb. 3.19 zu erkennen ist, zeigte die heterozygote *psg1*-Mutante mit dem integrierten Fusionsprotein Psg1^{3xHA} anstelle des Wildtypallels hyphales Wachstum auf den YPM-Platten. Somit lässt sich folgern, dass das mit dem HA-Epitop markierte Fusionsprotein im Stamm CSU6 ($\Delta psg1/PSG1^{3xHA}$) funktionell ist. Dieser Befund trifft ebenfalls für die übrigen verifizierten Transformanten zu (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Immunfluoreszenz der Epitop-markierten Stämme

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Psg1^{3xHA} ein funktionelles Allel von Psg1 ist und das Fusionsprotein auch über Immunoblot-Analysen detektierbar war, konnte mit den entsprechenden Stämmen (CSU5 und CSU6) eine Immunfluoreszenz durchgeführt werden. Hierfür wurden, wie in Abschnitt: 2.7.1 beschrieben, Zellen des Stammes CSU6 ($\Delta psg1/PSG1^{3xHA}$) fixiert und mit Fluoreszenzantikörpern behandelt, die gegen das HA-Epitop gerichtet sind. Bei der Immunfluoreszenz wurden die fixierten Zellen zunächst mit einem Primärantikörper, der gegen das HA-Epitop gerichtet war, behandelt. Als nächstes wurden dann, nach mehrfachem Waschen, die Zellen mit einem Sekundärantikörper behandelt, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet und mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert war. Das Protein Psg1^{3xHA} wurde somit durch die Antikörper markiert. Durch die Konjugation des Antikörpers mit FITC konnte im Anschluss die subzelluläre Lokalisation von Psg1^{3xHA} via Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden.

Wie sich anhand von Abb. 3.20 zeigt, gibt es neben der relativ regelmäßigen Verteilung von Psg1^{3xHA} einige Stellen nahe der Zellmembran, an denen das Protein lokalisiert ist. Zudem lässt sich anhand von Abb. 3.20 eine relativ deutliche Lokalisation des Fusionsproteins um

den Zellkern herum, bzw. im Bereich des perinukleären ER feststellen. Anhand der Überlappung der FITC- und DAPI-Signale im Bereich des Zellkerns ist eine Lokalisation des Psg1-Proteins auch dort nicht auszuschließen. Die FITC-Signale an der Zellmembran könnten auf eine Lokalisierung von von Psg1^{3xHA} am kortikalen ER, ähnlich wie es bei Pmt4 in *S. cerevisiae* der Fall ist, hindeuten (Lommel und Strahl, 2009).

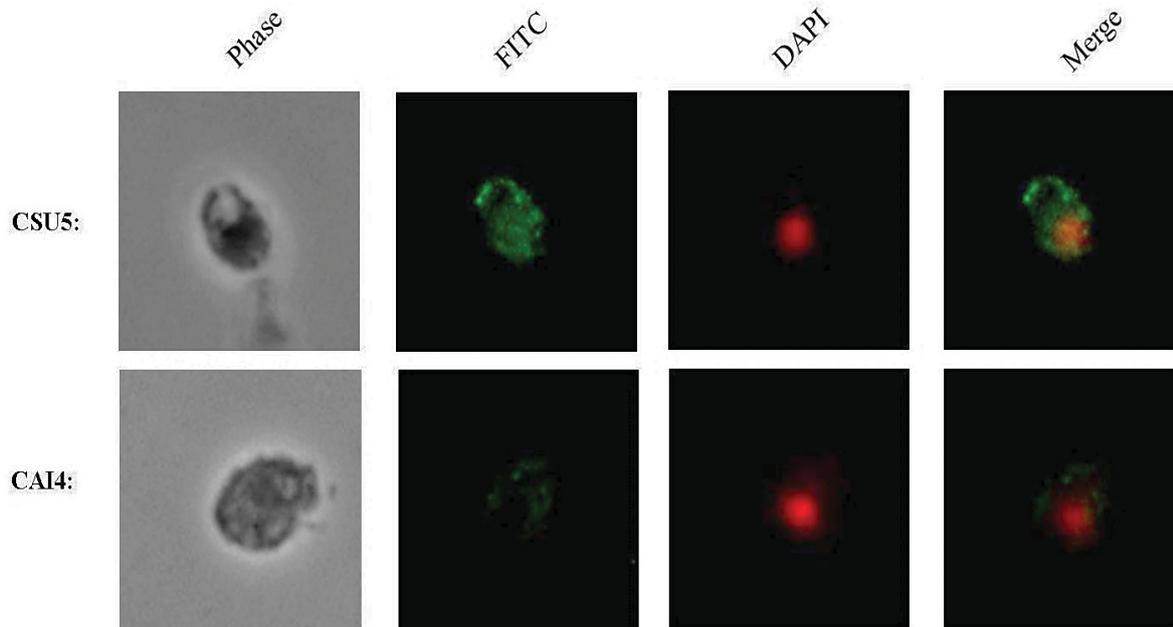


Abb. 3.20: Immunfluoreszenz von Psg1^{3xHA}

Kulturen der Stämme CAI4 (WT) und CSU5 ($\Delta psg1/PSG1^{3xHA}$) wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 in YPD-Medium angezogen und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte die Markierung mit einem Primärantikörper (1:1000), der gegen das HA-Epitop gerichtet war. Der Sekundärantikörper, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet und mit FITC (grün) konjugiert ist, wurde in einer Verdünnung von 1:100 auf die fixierten Zellen gegeben. Der Zellkern wurde mittels DAPI gefärbt (rot). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen erfolgten mittels eines Mikroskops (Zeiss). Die Bearbeitung der Bilder wurde mittels ImageJ durchgeführt.

Fazit zu 3.3

Durch die Markierung eines *PSG1*-Allels mit einem dreifachen HA-Epitop konnte erstmals das Psg1-Protein über Immunoblot-Analysen detektiert werden. Zudem ist das Fusionsprotein funktionell, da die Epitopmarkierung am intakten Allel einer heterozygoten *psg1*-Mutante durchgeführt wurde und diese Mutante im Anschluss keinerlei Phänotypen zeigte. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen konnte das Psg1-Protein in fixierten Zellen nachgewiesen werden. Das Epitop-markierte Psg1-Protein wies eine molekulare Masse von ca. 80 kDa auf. Neben einer Akkumulation am Rand der Zelle, was dem kortikalem ER entsprechen könnte, konnte Epitop-markiertes Psg1-Protein vor allem im Bereich um den Zellkern detektiert werden, was eine Lokalisation im perinukleären und kortikalen ER vermuten lässt.

3.4 Überexpression von *PSG1*

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *DOM34* und *YIL001w* einige Phänotypen von *pmt1*-Mutanten supprimieren. So bewirkte die Überexpression von *DOM34* in *C. albicans pmt1*-Mutanten eine Unterdrückung der Hygromycin B-Sensitivität (Hilbig, 2010). Zuvor hatte Wickert (1998) bei *S. cerevisiae* zeigen können, dass die Expression von *DOM34* und *YIL001w* (*PSG1*-Homolog) in *pmt1 dom34*-Doppelmutanten zu einer Suppression der Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin führt. Als Folge dessen wurde eine genetische Interaktion zwischen *DOM34* und *PMT1* vermutet. Ob es ebenfalls eine genetische Interaktion zwischen *PSG1*, *DOM34* und *PMT1* in *C. albicans* gibt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Um zu untersuchen, welche Effekte eine Überexpression von *PSG1* auf *pmt*-Mutanten zur Folge hat, wurde das Plasmid pDS-YIL [S-5] in eine Reihe von *pmt*-Mutanten (*pmt1*, *PMT2/pmt2*, *pmt4*, *pmt5*, *pmt6*) transformiert. Da für den Wildtypstamm CAI4 durch qPCR gezeigt werden konnte, dass es nach Transformation mit dem frei replizierenden Plasmid pDS-YIL [S-5] zu einer Überexpression von *PSG1* kommt (Abb. 3.12), wurde auf die Integration des Plasmids in das Genom der Stämme verzichtet. Die Folgen einer *PSG1*-Überexpression wurden in allen *pmt*-Mutanten sowie in der *pmt1 dom34*-Doppelmutante von *C. albicans* untersucht. Jedoch werden in den nächsten Abschnitten dieser Arbeit nur die Ergebnisse für die *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten sowie für die *pmt1 dom34*-Doppelmutante dargestellt. Für die restlichen *pmt*-Mutanten führte eine Überexpression von *PSG1* zu keinerlei Effekten (Daten nicht gezeigt).

3.4.1 Überexpression von *PSG1* in *pmt1* und *pmt4*-Mutanten

Zunächst sollten die Folgen einer Überexpression von *PSG1* in *pmt1*- sowie in *pmt4*-Mutanten untersucht werden. Da bekannt ist, dass eine gleichzeitige Disruption der *PMT1*- und der *PMT4*-Allele zur Lethalität führt (Prill *et al.*, 2005), kann angenommen werden, dass es einen Zusammenhang beider Gene in Bezug auf ihre Rolle als Mannosyltransferasen gibt. Um *PSG1* in diesen Mutanten überexprimieren zu können, wurden das Plasmid pDS-YIL [S-5] sowie als Kontrolle der Leervektor pDS1044-1 in die Stämme CAI4 (WT), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$) und CAP4-2162 ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$) transformiert.

3.4.1.1 Untersuchung der Koloniemorphologie und Aggregation der Zellen

Neben einer Reihe verschiedener Phänotypen der *pmt1*-Mutante wurde beobachtet, dass Disruptionen im *PMT1*-Gen zu einer ungewöhnlichen, "rauhem" Koloniemorphologie auf Festmedium führen (Abb. 3.21; CAP1-3121 [pDS1044-1]). In Flüssigmedium zeigen *pmt1*-Mutanten eine stark erhöhte Aggregation (Timpel *et al.*, 1998). Zunächst sollte anhand der Phänotypen der *pmt1*-Mutante (Koloniemorphologie und Aggregation in Flüssigmedium) untersucht werden, wie sich eine Überexpression von *PSG1* auf die Stämme CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$) und CAI4 (WT) auswirkt.

In Abb. 3.21 sind Kolonien der entsprechenden Stämme auf Festmedien sowie die Morphologie der Zellen in Flüssigmedium dargestellt. Erwartungsgemäß wies dabei die *pmt1*-Mutante eine ungewöhnliche Koloniemorphologie und eine starke Aggregation der Zellen in Flüssigmedium auf. Wie sich zeigte, konnte eine Überexpression von *PSG1* den Phänotyp der *pmt1*-Mutante auf Festmedium und in Flüssigmedium supprimieren. Kolonien von *pmt1*-Mutanten, in denen *PSG1* überexprimiert wurde, zeigten eine glatte, runde Oberfläche. Vor

allem in Flüssigmedium führte die Überexpression von *PSG1* in *pmt1*-Mutanten zu einer starken Abnahme der Zellaggregation. Um einen Effekt der *PSG1*-Überexpression auf Wildtypzellen ausschließen zu können, wurden die Kolonimorphologie und Aggregation in Flüssigmedium auch im Stamm CSU8 (CAI4+pDS-YIL [S-5]) untersucht. Es zeigten sich keinerlei Veränderungen im Vergleich zum Wildtypstamm, welcher den Leervektor pDS1044-1 trug. Somit wird durch die Überexpression von *PSG1* die Morphologie und die Aggregation von Wildtypzellen nicht beeinflusst.

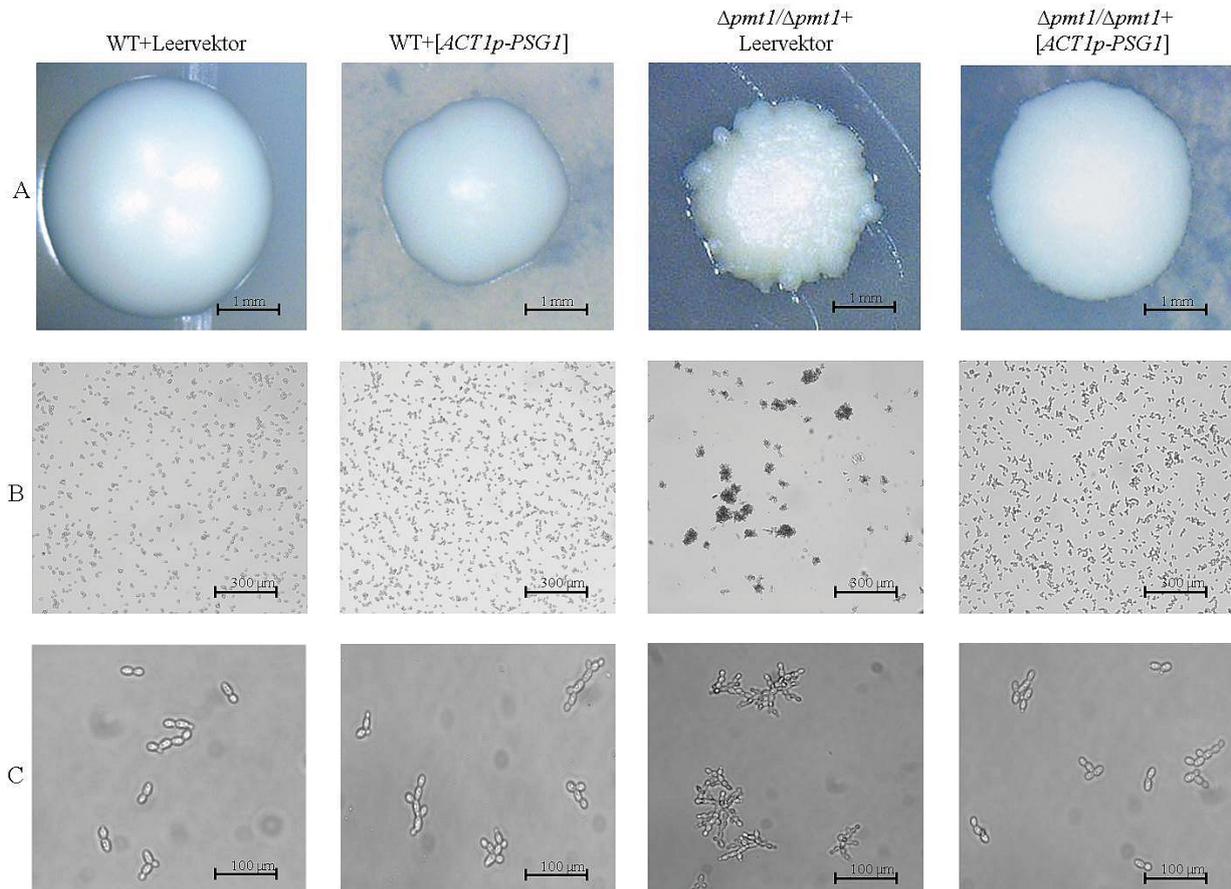


Abb. 3.21: Zell- und Kolonimorphologie von Wildtyp und *pmt1*-Mutante unter *PSG1* Überexpression

(A) Stationäre Kulturen der Stämme CAI4 [pDS1044-1] (WT+Leervektor), CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CAP1-3121 [pDS1044-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +Leervektor) und CAP1-3121 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +*ACT1p-PSG1*) wurden auf Festmedium (SD-Festmedium) ausgestrichen und unter 30 °C für zwei Tage inkubiert. Die Stämme wurden zudem in Flüssigkultur (SD-Flüssigmedium) auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt und unter 30 °C zwei Stunden inkubiert und anschließend mikroskopisch unter 10-facher (B) und 40-facher (C) Vergrößerung dokumentiert.

3.4.1.2 Quantifizierung der Zellaggregation

Die asexuelle Bildung von Zell-Zell-Aggregaten wird innerhalb der Hefegenetik auch als „Flokkulenz“ oder Flockulierung bezeichnet und führt innerhalb einer Zellkultur zur Ausflockung und zum Absinken der Zellen (Verstraten und Klis, 2006). Durch diese Eigenschaft flokkulenter Zellen kann die Bildung von Aggregaten durch Zell-Zell-Adhäsion quantifiziert werden. Hierfür wurden Zellen der Stämme CAI4 (WT) und CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$) mit den Vektoren pDS-YIL [S-5] und pDS1044-1 transformiert und in SD-Medium auf ihre Flokkulenz hin untersucht (Abb. 3.22). Wie zu erwarten, zeigte die *pmt1*-Mutante mit dem Leervektor eine erhöhte Ausflockung der Zellen. Nach 15 Minuten

Standzeit befand sich fast die gesamte Zellsuspension am Grund des Erlenmeyerkolbens. Lediglich 12 % der Zellen der Kultur verblieben an der Oberfläche. Im Vergleich hierzu waren es im Falle des Wildtyps 95 %. Aufgrund der starken Zell-Zell-Adhäsion der *pmt1*-Mutante in Flüssigkultur (Abb. 3.21) war eine solch heterogene Verteilung der Zellen nach 15-minütiger Ruhephase zu erwarten. In den *pmt1*-Mutanten, in denen der *PSG1*-Expressionsvektor (pDS-YIL [S-5]) anstatt des Leervektors transformiert wurde, kam es zu einer homogenen Verteilung der Zellen innerhalb der Kultur (Abb. 3.22) und auch zu einer messbar geringeren Ausflockung (88 % der Zellen verblieben an der Oberfläche). Im Falle einer Überexpression von *PSG1* innerhalb eines Wildtypstammes konnte, im Vergleich zum Wildtypstamm mit Leervektor, ein Rückgang der sich an der Oberfläche befindlichen Zellen (67 %) beobachtet werden. Dieses Ergebnis war unerwartet, da ausgehend von der Morphologie der Zellen in Abb. 3.21 keine Bildung von Aggregaten beobachtet werden konnte.

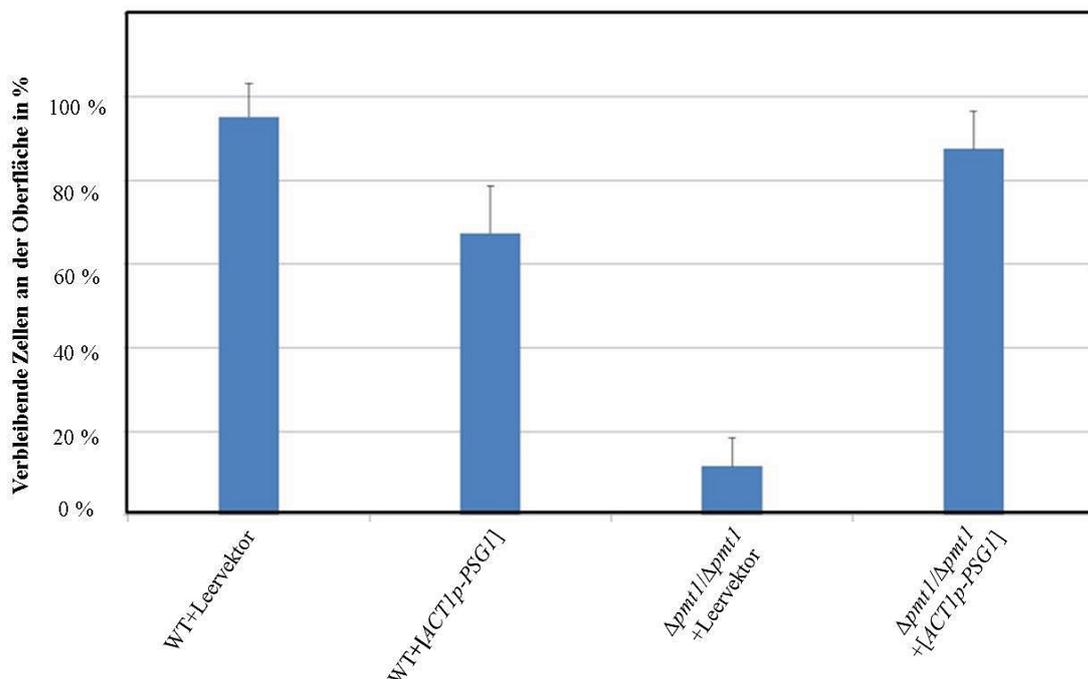


Abb. 3.22: Quantifizierung der Bildung von Aggregaten in Flüssigkultur

Stationäre Kulturen der CAI4 [pDS1044-1] (WT+Leervektor), CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CAP1-3121 [pDS1044-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +Leervektor) und CAP1-3121 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +*ACT1p-PSG1*) wurden auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt und in SD-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 30 °C aufgezogen. Die OD_{600} wurde an der Oberfläche der Zellsuspension jeweils vor und nach einer 15 minütigen Ruhephase (Zellen wurden nicht geschüttelt) gemessen. Die Balken im Diagramm geben an, wieviel Prozent der Zellen nach 15 Minuten Ruhephase noch an der Oberfläche der Zellsuspension messbar waren. Die Standardabweichung von drei Replikaten wurde in der Abbildung berücksichtigt.

3.4.1.3 Sensitivität gegenüber Hygromycin B

Hygromycin B gehört zu den Aminoglykosiden und interagiert mit den 40S-Untereinheiten der Ribosomen (Brodersen *et al.*, 2000), wodurch die Proteinbiosynthese inhibiert wird (Brodersen *et al.*, 2000). Sensitivität gegenüber Hygromycin B ist ein bekanntes Merkmal vieler Glykosylierungsmutanten und konnte in *C. albicans* für alle *pmt*-Mutanten außer für *pmt5* und *pmt6*-Mutanten gezeigt werden (Prill *et al.*, 2004). Um einen möglichen Effekt der *PSG1*-Überexpression bzgl. der Hygromycin B-Sensitivität der *pmt1*- und *pmt4*-Mutante zu

untersuchen, wurden Tropftests auf Hygromycin B-haltigem YPD-Medium durchgeführt (Abb. 3.23). Hierbei zeigte sich die Hypersensitivität der Mutanten im Vergleich zum Wachstum des Wildtypstammes. Interessanterweise konnte aber durch die Überexpression von *PSG1* die Sensitivität der *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten gegenüber Hygromycin B (100 µg/ml) partiell supprimiert werden. Bei höheren Konzentrationen fiel dieser Effekt weniger deutlich aus (Daten nicht gezeigt), da die Mutanten auch unter *PSG1*-Überexpression immer noch hypersensitiv gegenüber Hygromycin B waren.

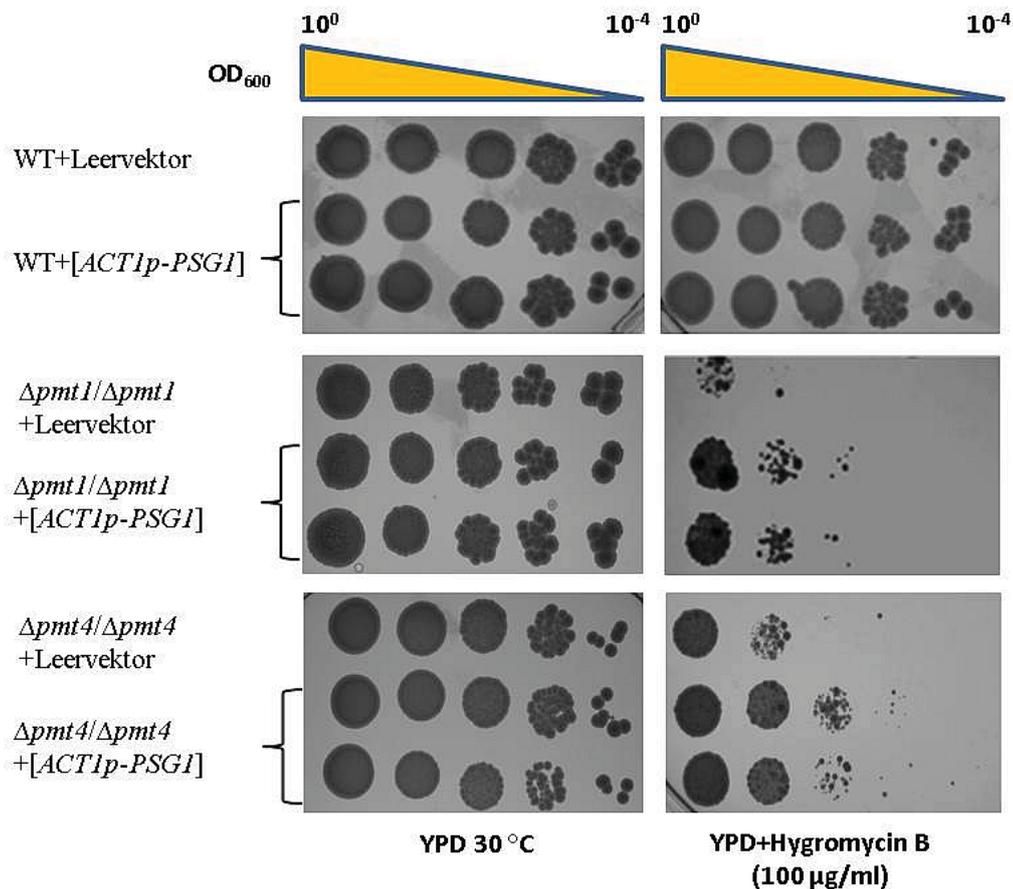


Abb. 3.23: Sensitivität der Überexpressionsstämme gegenüber Hygromycin B

Stationäre Kulturen der Stämme CAI4 [pDS1044-1] (WT+Leervektor), CSU8 (WT+[*ACT1p-PSG1*]), CAP1-3121 [pDS1044-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +Leervektor) und CAP1-3121 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +*ACT1p-PSG1*) CAP4-2162 [pDS1044-1] ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$ +Leervektor) und CAP4-2162 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$ +*ACT1p-PSG1*) wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und seriell verdünnt. Diese Verdünnungen wurden auf YPD-Medium und YPD-Medium mit Hygromycin B (100 µg/ml) aufgetropft und bei 30 °C ca. drei Tage inkubiert.

3.4.2 Die Suppression der *pmt1*-Mutante durch *PSG1*-Überexpression erfordert *Dom34*

Wickert (1998) konnte für *S. cerevisiae* zeigen, dass eine Expression von *YIL001w* (*PSG1*-Homolog) zur partiellen Suppression der K1-Killerresistenz einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante führt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine *PSG1*-Überexpression in *C. albicans* auch den Phänotyp einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante supprimieren kann. Die Frage hierbei war, ob für die Suppression der Phänotypen der *pmt1*-Mutanten die Anwesenheit eines intakten *DOM34* Allels notwendig ist. Hierfür wurden die entsprechenden Plasmide pDS-YIL [S-5] für eine *PSG1*-Überexpression und pDS1044-1 als Leervektor zur Kontrolle in den Stamm SK24 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$) transformiert.

Wie bereits in Abschnitt 3.4.1 wurden Kolonimorphologie und die Zellmorphologie der Zellen in Flüssigmedien untersucht (Abb. 3.24). Auch hierbei zeigte sich für die *pmt1 dom34*-Doppelmutante der für *pmt1*-Mutanten charakteristische Phänotyp einer ungewöhnlichen Kolonimorphologie und der Bildung von Aggregaten in Flüssigmedium. Im Falle einer *PSG1*-Überexpression durch Transformation mit dem Plasmid pDS-YIL [S-5] kam es jedoch hier zu keiner Veränderung der Kolonimorphologie oder der Morphologie und Aggregation der Zellen in Flüssigmedium. Ohne die Anwesenheit von Dom34 scheint daher die Suppression dieses *pmt1*-Phänotyps durch Überexpression von *PSG1* nicht möglich zu sein.

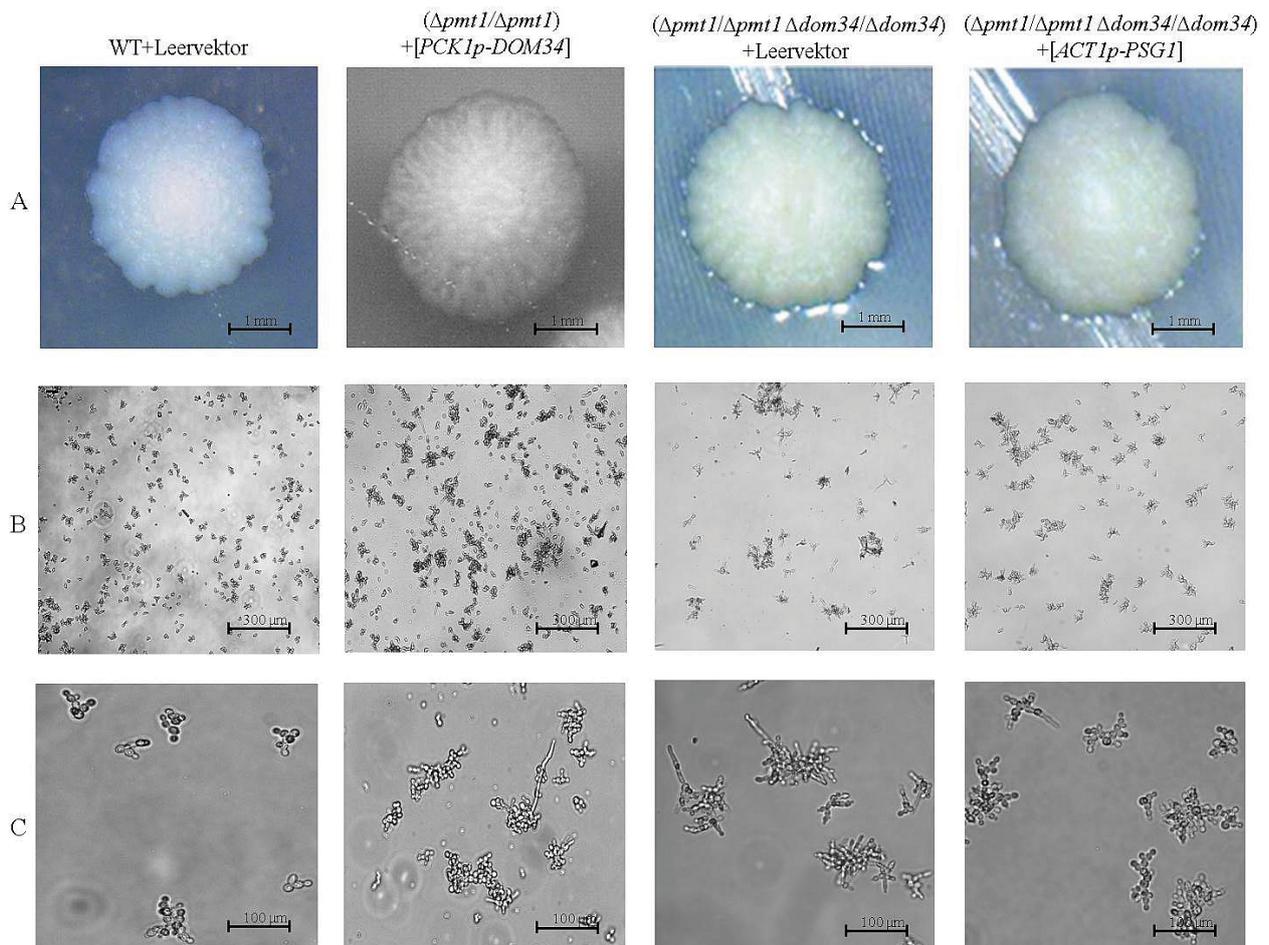


Abb. 3.24: Zell und Kolonimorphologie von Wildtyp und *pmt1*-Mutante unter *PSG1* Überexpression

Die experimentelle Durchführung verlief wie in Abb. 3.22 mit den Stämmen CAI4 [pBI-1] (WT+Leervektor), CAP1-3121 [pJB34] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +PCK1p-DOM34), SK24 [pBI-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +Leervektor) und SK24 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +[ACT1p-PSG1]). Bei Stämmen mit den Plasmiden pJB34 und pBI-1 wurde SCAA-Medium verwendet. A) Kolonimorphologie auf Festmedium. B) Zellmorphologie in Flüssigmedium bei 10-facher Vergrößerung. C) Zellmorphologie in Flüssigmedium bei 40-facher Vergrößerung.

Für eine Überexpression von *DOM34* in *pmt1*-Mutanten konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Sensitivität der Mutanten gegenüber Hygromycin B sowie zur Suppression diverser anderer Phänotypen, wie filamentösem Wachstum, kommt (Hilbig, 2010). Bisher wurde jedoch nicht untersucht, in welcher Form sich eine Überexpression von *DOM34* auf die Morphologie von Kolonien und Zellen in Flüssigmedium einer *pmt1*-Mutante auswirkt. Auch war nicht klar, welchen Effekt eine

Überexpression von *DOM34* für die Aggregation einer *pmt1*-Mutante haben würde. Zu diesem Zwecke wurde das Plasmid pJB34 (*PCK1p-DOM34*) in die Stämme CAI4 (WT) und CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$) transformiert. Da *DOM34* beim verwendeten Vektor pJB34 unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors steht und dieser durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert wird, diente in diesem Falle das Plasmid pBI-1 als Leervektor. Ferner wurde an Stelle des glukosehaltigen SD-Mediums das glukosefreie SCAA-Medium verwendet. Anders als in den von Hilbig (2010) gezeigten Experimenten, konnte keiner der hier untersuchten Phänotypen der *pmt1*-Mutante durch eine Überexpression von *DOM34* mit dem Plasmid pJB34 unterdrückt werden (Daten nicht gezeigt). Die Zellen und die Kolonien der mit dem Plasmid pJB34 transformierten *pmt1*-Mutanten zeigten dieselben morphologischen Defekte wie die *pmt1*-Mutanten, welche mit dem Leervektor pBI-1 transformiert worden waren.

3.4.2.1 Quantifizierung der Zellaggregation

Für die im Abschnitt 3.4.2 verwendeten Stämme (Überexpression von *DOM34* in der *pmt1*-Mutante; Überexpression von *PSG1* in der *pmt1 dom34*-Doppelmutante) wurde wie zuvor beschrieben (3.4.1.2) die Bildung von Zellaggregaten quantifiziert (Abb. 3.25). Als Kontrollen dienten die jeweiligen Leervektoren pDS1044-1 und pBI-1.

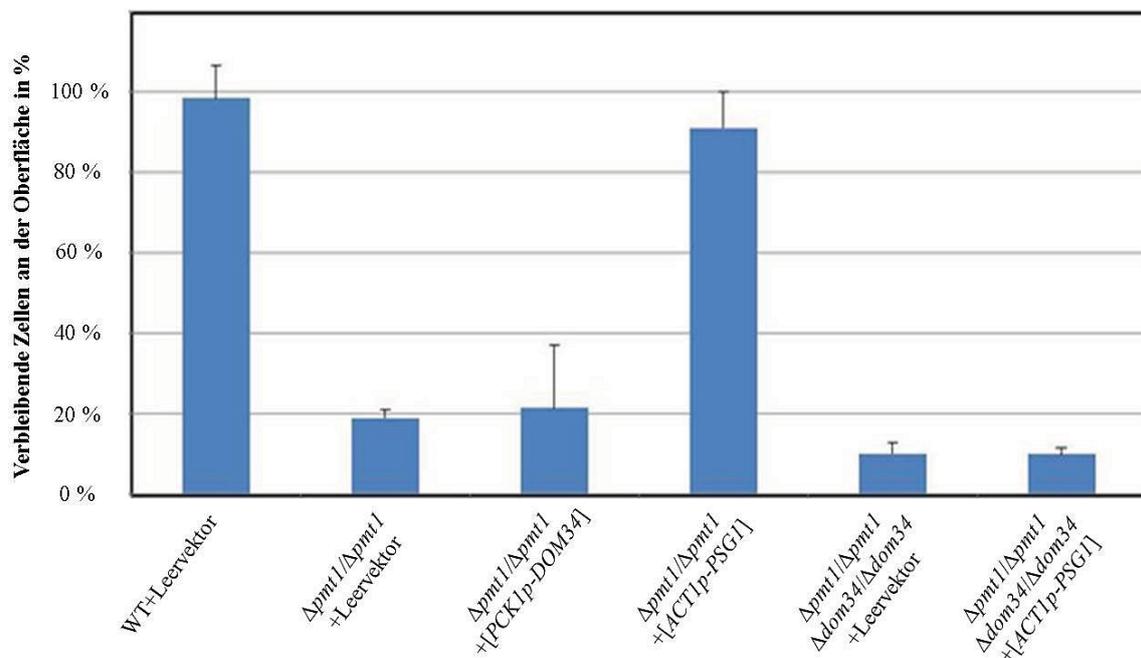


Abb. 3.25: Quantifizierung der Bildung von Aggregaten in Flüssigkultur

Stationäre Kulturen der CAI4 [pDS1044-1] (WT+Leervektor), CAP1-3121 [pDS1044-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +Leervektor), CAP1-3121 [pJB34] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +*[PCK1p-DOM34]*), CAP1-3121 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$ +*[ACT1p-PSG1]*), SK24 [pBI-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +Leervektor) und SK24 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +*[ACT1p-PSG1]*) wurden auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt und in SD-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 30 °C aufgezogen. Die OD_{600} wurde an der Oberfläche der Zellsuspension jeweils vor und nach einer 15 minütigen Ruhephase (Zellen wurden nicht geschüttelt) gemessen. Die Balken im Diagramm geben an, wieviel Prozent der Zellen nach 15 Minuten Ruhephase noch an der Oberfläche der Zellsuspension messbar waren. Die Standardabweichung von drei Replikaten wurde in der Abbildung berücksichtigt.

Im Vergleich zum Wildtypstamm CAI4 (98 % der Zellen) wies die *pmt1*-Mutante nach 15 minütiger Standzeit nur noch 19 % der zuvor gemessenen OD₆₀₀ auf. Durch Überexpression von *DOM34* konnte die erhöhte Zellaggregation der *pmt1*-Mutante nicht supprimiert werden. Der Überexpressionsstamm behielt nach 15 minütiger Standzeit lediglich 22 % der im Vorfeld gemessenen optischen Dichte. Für die Quantifizierung der Zellaggregation der *pmt1 dom34*-Doppelmutanten wurde, anstelle des Wildtypstammes als Referenz, die *pmt1*-Mutante mit dem Plasmid pDS-YIL [S-5] (*PSG1*-Expressionvektor) verwendet. Bei diesem Stamm verblieben 87 % der Zellen nach der 15 minütigen Ruhephase an der Oberfläche. Wie schon die *pmt1 dom34*-Doppelmutante mit dem Leervektor (7 % der Zellen) wies dieser Stamm auch unter *PSG1*-Überexpression die charakteristischen Phänotypen einer *pmt1*-Mutante auf. Bezogen auf die Aggregation der Zellen zeigte sich nach 15 minütiger Ruhephase ein Verbleib von lediglich 7 % der Zellen an der Oberfläche. Somit zeigt sich, dass der Zellaggregations-Phänotyp der *pmt1*-Mutante nicht durch eine Überexpression von *DOM34* supprimiert werden kann. Im Falle der *pmt1 dom34*-Doppelmutante ist die Suppression des Phänotyps auch durch eine Überexpression von *PSG1* nicht möglich.

3.4.2.2 Sensitivität gegenüber Hygromycin B

Anhand einer Überexpression von *DOM34* konnte durch Hilbig (2010) gezeigt werden, dass die Hypersensitivität der *pmt1*-Mutante gegenüber Hygromycin B unterdrückt werden konnte. Da dieser Effekt bereits bekannt war, wurde lediglich untersucht, ob die Suppression der Hypersensitivität gegenüber Hygromycin B durch eine *PSG1*-Überexpression auch in einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante möglich ist. Abb. 3.26 zeigt einen Sensitivitätstest auf Hygromycin B haltigem Medium, bei dem der Stamm SK24 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$), transformiert mit den Plasmiden pDS-YIL [S-5] (*PSG1*-Überexpression) und pDS1044-1 (Leervektor), seriell verdünnt und aufgetropft wurde. In Abb. 3.25 wird deutlich, dass eine *PSG1*-Überexpressionen keinen Effekt auf die Hypersensitivität gegenüber Hygromycin B der *pmt1 dom34*-Doppelmutante zur Folge hat.

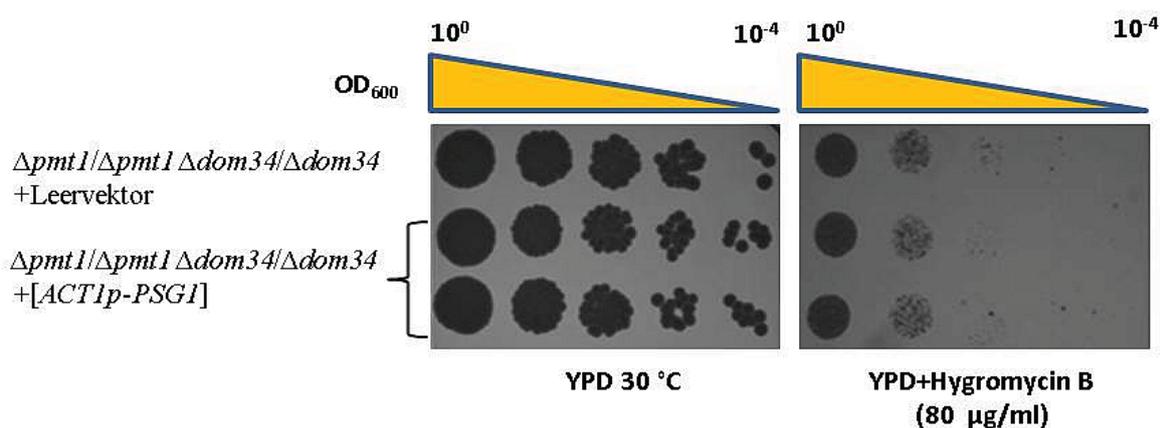


Abb. 3.26: Sensitivität der Überexpressionsstämme gegenüber Hygromycin B

Eine stationäre Kultur der Stämme SK24 [pDS1044-1] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +Leervektor) und SK24 [pDS-YIL [S-5]] ($\Delta pmt1/\Delta pmt1 \Delta dom34/\Delta dom34$ +*[ACT1p-PSG1]*) wurde auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und seriell verdünnt. Diese Verdünnungen wurden auf YPD und YPD-Medium mit Hygromycin B (80 µg/ml) aufgetropft und bei 30 °C ca. drei Tage inkubiert.

Aus den Untersuchungen mit der *pmt1 dom34*-Doppelmutante wird deutlich, dass die in Abschnitt 3.4.1 gezeigten Phänotypen der *pmt1*-Mutante nur bei Anwesenheit von Dom34 durch eine *PSG1*-Überexpression supprimiert werden können. In Falle einer Deletion von *PMT1* und *DOM34* hat die *PSG1*-Überexpression keinen Effekt auf die Phänotypen (Koloniemorphologie, Zell-Aggregation und Hygromycin B-Sensitivität) dieser Mutante.

Fazit zu 3.4

Durch eine Überexpression des *PSG1*-Gens konnten die Phänotypen der veränderten Koloniemorphologie, der Zell-Aggregation und der erhöhten Sensitivität gegenüber Hygromycin B in einer *pmt1*-Mutante unterdrückt werden. Dies war auch bei *pmt4*-Mutanten bezogen auf ihre Hygromycin B-Sensitivität möglich. Weiterhin machten Experimente mit einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante deutlich, dass für die *PSG1*-Suppression die Anwesenheit von Dom34 erforderlich ist. Diese Ergebnisse zeigen eine genetische Interaktion zwischen den Genen *PSG1*, *PMT1* und *DOM34* sowie zwischen den Genen *PSG1* und *PMT4*.

3.5 Gegenseitige Beeinflussung der Transkriptspiegel von *PSG1*, *PMT1* und *DOM34*

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Überexpression einen Einfluss auf die Phänotypen von *pmt1*-Mutanten ausübt. Dies war jedoch nur möglich, wenn ein intaktes *DOM34*-Allel vorhanden ist. Es ist bisher nicht bekannt, inwieweit sich diese Gene in ihrer Genaktivität gegenseitig beeinflussen. Hilbig (2010) konnte bereits zeigen, dass es zu einer verminderten Expression des Gens *DOM34* im Hintergrund einer *pmt1*-Mutante kommt. Daher sollte nun untersucht werden, inwieweit sich die Expression von *PSG1* im Hintergrund einer *pmt1*-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm ändert. Parallel hierzu wurde auch die Expression der Gene *PMT1* und *DOM34* in den genannten Stämmen durch qPCR analysiert. Hierfür wurde die RNA aus Zellen (angezogen in Flüssigmedium) der jeweiligen Mutanten und aus einem Wildtypstamm präpariert. Für das Wachstum der Stämme wurden Medien mit diversen Inhibitoren verwendet. Als Zellwand-destabilisierende Substanz wurde Kongorot ins Medium gegeben, um die Transkription der Gene unter Zellwandstress zu überprüfen. Tunicamycin wurde den Kulturen hinzugefügt, um eine gestörte *N*-Glykosylierung zu simulieren. Außerdem wurde die Genexpression unter Hyphen-induzierenden Bedingungen untersucht. Die hierfür verwendeten Stämme waren CAI4 (WT), CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) und CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$).

In Abb. 3.27 sind die relativen Transkriptspiegel von *PSG1*, *PMT1* und *DOM34* im Hintergrund der verschiedenen Stämme und Wachstumsbedingungen dargestellt. Anhand von Abb. 3.27 wird ersichtlich, dass es zu veränderter Genexpression von *PSG1*, *PMT1* und *DOM34* in den getesteten Stämmen kommt. Für die Expression von *PSG1* lässt sich im Hintergrund einer *pmt1*-Mutante ein verminderter Transkriptspiegel feststellen. Im Falle einer *psg1*-Disruption nimmt der Transkriptspiegel des *PMT1* Gens im Vergleich zum Wildtyp leicht ab. Im Hintergrund einer *psg1*-Mutante kommt es zu einer Erhöhung des *DOM34*-Transkriptspiegels. Für die *PSG1*-Expression im Wildtypstamm unter Zugabe von Kongorot, Tunicamycin sowie bei Wachstum unter Hyphen-induzierenden Bedingungen zeigte sich, dass es zu einem Anstieg des *PSG1*-Transkriptspiegels kommt. Besonders deutlich fällt der Anstieg der *PSG1*-Expression unter dem Einfluss von Tunicamycin auf. Hier erreicht der relative Transkriptspiegel ca. den 2-fachen Wert im Vergleich zum Wachstum in YPD-Medium ohne Zusätze. Für die Expression von *PMT1* im Wildtypstamm konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg des *PMT1*-Transkriptes bei Störung der *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin kommt (Cantero und Ernst, 2011). Derselbe Effekt konnte jedoch lediglich für eines der beiden biologischen Replikate für das *PMT1*-Transkript nachgewiesen werden. Unter Hyphen-induzierenden Bedingungen hingegen kam es, im Vergleich zum Wachstum in YPD-Medium, zu einer leichten Verminderung des messbaren *PMT1*-Transkriptspiegels. Bei Zugabe von Kongorot stieg beim Wildtyp der Wert für die relative Transkription des *DOM34* Gens um den 3-fachen Wert an. Ein leichter Anstieg war ebenfalls unter Zugabe von Tunicamycin detektierbar und unter Hyphen-induzierenden Bedingungen stieg der *DOM34*-Transkriptspiegel, im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps in YPD-Medium, sogar um den 3 bis 5-fachen Wert an.

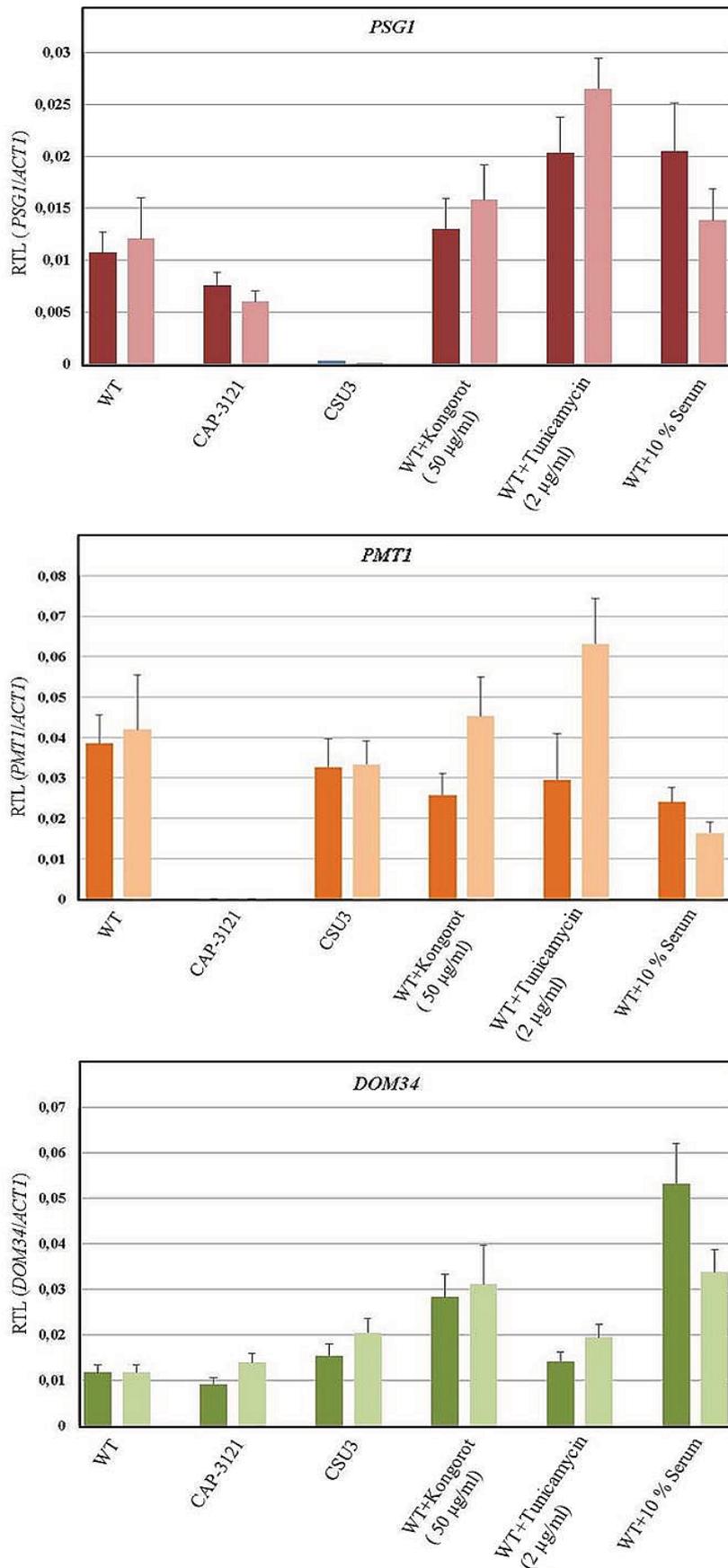


Abb. 3.27: Relativer Transkriptspiegel von *PSG1*, *DOM34* und *PMT1*.

Die relativen Transkriptspiegel (RTL) von *PSG1* (oben), *PMT1* (Mitte) und *DOM34* (unten) wurden in den Stämmen CAI4 (Wildtyp), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) durch qPCR ermittelt. Hierfür wurde Gesamt-RNA nach Anzucht der Zellen in YPD-Flüssigmedium, in YPD-Medium mit Kongorot (50 µg/ml) oder Tunicamycin (2 µg/ml) präpariert. Des Weiteren wurde eine Kultur des Wildtypstamms unter Hyphen-induzierenden Bedingungen aufgezogen (YP+10 % Pferdeserum bei 37 °C) und nach zweistündiger Inkubation die RNA aus den Zellen präpariert. Bei den Messungen wurden pro Stamm zwei biologische und drei technische Replikate verwendet. Die Standardabweichung wurde anhand der Rohdaten der Replikate erhoben.

Fazit zu 3.5

Die Transkriptspiegel der Gene *PSG1*, *DOM34* und *PMT1* beeinflussen sich gegenseitig. In der *psg1*-Mutante ist der *PMT1*-Transkriptspiegel leicht gesenkt und der *DOM34*-Transkriptspiegel erhöht. In der *pmt1*-Mutante ist der *PSG1*-Transkriptspiegel deutlich gesenkt. Ferner waren bei Wildtypzellen, die mit Kongorot und Tunicamycin behandelt wurden, die Transkriptspiegel aller drei Gene leicht bis stark erhöht. Unter hypheninduzierenden Bedingungen in Flüssigmedium reagierten nur die Transkriptspiegel der Gene *PSG1* und *DOM34* mit einem Anstieg. Der Zusammenhang zwischen den Transkriptmengen der Gene lässt auch einen gewissen funktionellen Zusammenhang der Genprodukte vermuten.

3.6 Auswirkungen der *psg1*-Disruption auf Substrate der *N*- und *O*-Glykosylierung

Für *C. albicans* sind mehrere Substrate der *O*-Glykosylierung bekannt. So wurde gezeigt, dass die Proteine Msb2, Pir1 und Kre9 in einer *pmt1*-Mutante ein verändertes Laufverhalten in einer SDS-PAGE zeigen (Prill, 2004; Timpel *et al.*, 1998; Szafranski-Schneider, 2011). Da innerhalb dieser Arbeit eine genetische Interaktion zwischen *PSG1*, *DOM34* und *PMT1* gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit eine Disruption von *psg1* oder *dom34* das Laufverhalten solcher Substrate der *O*-Glykosylierung beeinflussen kann. Möglich wäre auch, dass die Mutanten die *N*-Glykosylierung beeinflussen könnten. So wurde ein Anstieg des *PMT1*-Transkripts bei Anwesenheit von Tunicamycin festgestellt (Cantero *et al.*, 2007; Cantero, 2010). Schmidt (2007) konnte über das „Ubiquitin-Split-System“ zeigen, dass Pmt2 mit Alg9 (Mannosyltransferase für die *N*-Glykosylierung) interagiert. Aus diesen Gründen wurde auch der Effekt der *psg1*-Disruption auf das Laufverhalten des Suc2-Proteins (Invertase) als Substrat der *N*-Glykosylierung untersucht.

3.6.1 Msb2

Für das *C. albicans* Msb2-Protein zeigten Szafranski-Schneider *et al.* (2011), dass es hochgradig *O*-glykosyliert ist, und dass Pmt1 und Pmt2 die Glykosylierung des Proteins bewirken. Msb2 wird von *C. albicans* kontinuierlich in das umgebende Medium sekretiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Laufverhalten von Msb2 in einer SDS-PAGE im Hintergrund verschiedener *pmt*-Mutanten sowie in *psg1*- und *dom34*-Mutanten analysiert werden (Abb. 3.28).

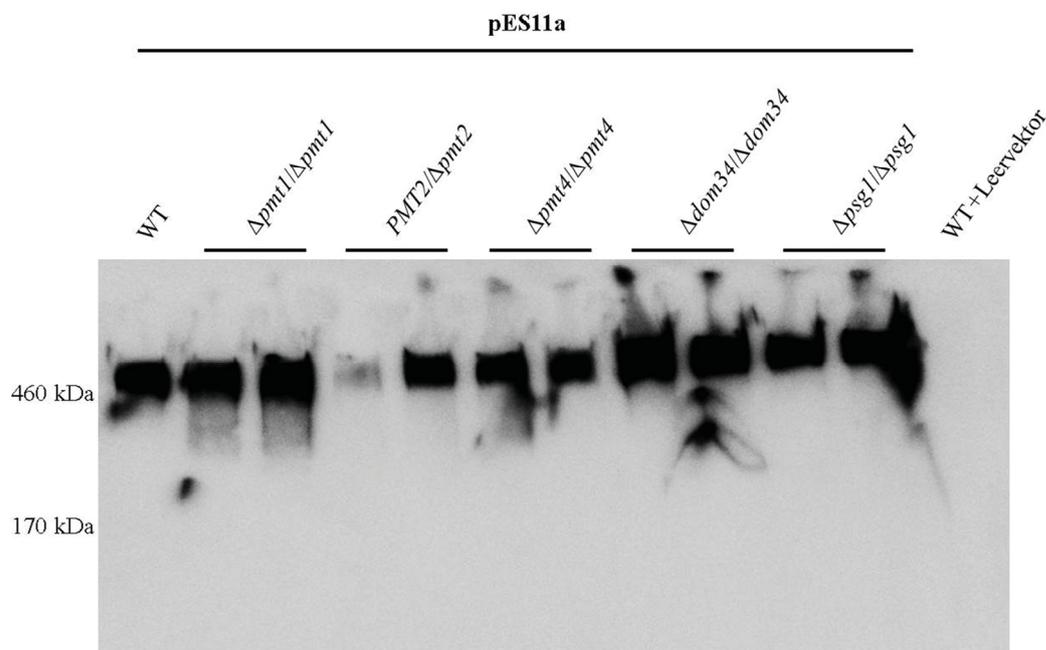


Abb. 3.28: Immunoblotanalyse von Msb2 im Medium

Die Mediumüberstände stationärer Kulturen der Stämme CAI4 (WT), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$), P2-22 ($PMT2/\Delta pmt2$), CAP4-2162 ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$), SK47 ($\Delta dom34/\Delta dom34$) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) wurden in einem 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Jeder dieser Stämme trägt das Plasmid pES11a im *LEU2*-Lokus. Das Epitop-markierte *MSB2* ($MSB2^{HA-V5}$) wurde über einen Antikörper detektiert, welcher gegen das HA-Epitop gerichtet war. Als Negativkontrolle fungierte der mit dem Leervektor pDS1044-1 transformierte Wildtypstamm CAI4 (WT). Es wurden jeweils 30 μ l der Medienüberstände aufgetragen.

Das Plasmid pES11a enthielt einen mit den Epitopen HA und V5 markierten *MSB2*-Leseraster unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012). Hierfür wurde pES11a mittels des Restriktionsenzym *EcoRV* im *LEU2*-Gen linearisiert und durch homologe Rekombination in den *LEU2*-Lokus der betroffenen *C. albicans* Stämme integriert (Toh-e *et al.*, 1980). Die Transformanten wurden jeweils in SD-Flüssigmedium angezogen. Da Msb2 kontinuierlich in das umliegende Medium sezerniert wird, wurden die Medium-Überstände gesammelt und für die folgenden Immunoblot-Analysen verwendet. Dies erfolgte mit den Stämmen CAI4 (WT), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$), P2-22 (*PMT2*/ $\Delta pmt2$), CAP4-2162 ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$), SK47 ($\Delta dom34/\Delta dom34$) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$). Als Negativkontrolle diente der Stamm CAI4, transformiert mit dem Leervektor pDS1044-1. In Abb. 3.28 ist zu erkennen, dass das Epitop-markierte Msb2, aufgrund seiner starker *O*-Glykosylierung, wie erwartet oberhalb der 170 kDa Marke detektiert werden konnte. Ferner zeigte sich im *pmt1*-Hintergrund ein leicht nach unten gezogener Schmier. In den *psg1* und *dom34*-disruptierten Stämmen war, im Vergleich zum Wildtyp, kein verändertes Laufverhalten erkennbar. Offenbar haben Disruptionen in den Genen *PSG1* und *DOM34* keinen Einfluss auf das Laufverhalten, bzw. auf die *O*-Glykosylierung, von Msb2. Neben dem Msb2-Protein als Substrat für die *O*-Glykosylierung wurde auch das Laufverhalten anderer Substrate im SDS-PAGE wie Pir1 und Kre9 (Daten nicht gezeigt) untersucht. Jedoch zeigten diese Substrate in *psg1*- und *dom34*-Mutanten ebenfalls kein verändertes Laufverhalten.

3.6.2 Suc2

Das Suc2-Protein aus *S. cerevisiae* ist eine β -Fructofuranosidase oder Invertase, die Saccharose in Glukose und Fruktose spaltet. Bei *S. cerevisiae* wird eine extrazelluläre Form (sezerniert in das Periplasma) und eine cytoplasmatische Form gebildet (Lutfiyya und Johnston, 1996). Die extrazelluläre Form ist hoch *N*-glykosyliert und im Immunoblot als Schmier im Größenbereich von etwa 110 kDa bis 150 kDa detektierbar (Daten nicht gezeigt). Der in früheren Arbeiten konstruierte *SUC2*-Expressionsvektor pBI-SM [K12] trägt das *ScSUC2*-Gen unter Kontrolle des *PCK1*-Promotors. Ferner ist das *ScSUC2*-Gen C-terminal mit der Sequenz für das "Myc"-Epitop fusioniert. Das Plasmid wurde mittels des Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert und in den *LEU2*-Lokus der Stämme CAI4 (WT), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$), P2-22 (*PMT2*/ $\Delta pmt2$), CAP4-2162 ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$), P5-5744 ($\Delta pmt5/\Delta pmt5$), SK47 ($\Delta dom34/\Delta dom34$) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) integriert. In Abb. 3.29 ist zu erkennen, dass das Epitop-markierte Suc2 von Plasmid pBI-SM [K12] in *C. albicans* produziert wird und mittels Immunoblot detektierbar ist. Unglykosyliertes Suc2 weist eine theoretische molekulare Masse von ca. 58 kDa auf. Es zeigen sich jedoch bei allen Stämmen, in denen *SUC2*^{MYC} exprimiert wurde, distinkte Banden im Größenbereich von ca. 130 kDa, umgeben von einem „Schmier“. Bei den *pmt1*-Mutanten weist dieser Schmier eine höhere molekulare Masse auf als beim Wildtypstamm und den anderen Mutanten. Um zu zeigen, dass das Suc2 in *C. albicans* *N*-glykosyliert wird, wurde eines der Rohextrakte aus der Wildtypstamm-Transformante mit der Peptid-*N*-Glycosidase F (PNGase F) behandelt. PNGase F ist eine Amidase, die die α -1,6 Bindung zwischen dem ersten *N*-Acetylglucosamin und dem Asparagin schneidet (Maley *et al.*, 1989). Bei dem Rohextrakt, welcher mit PNGase F behandelt wurde, konnte eine Bande im Größenbereich von ca. 100 kDa detektiert werden. Dies zeigt, dass das Suc2-Protein *N*-glykosyliert ist. Es ist aber unklar, warum das deglykosylierte Protein eine größere molekulare Masse als erwartet aufweist. Im Falle der

psg1-Mutante sowie bei der *dom34*-Mutante, konnte im Vergleich zum Wildtyp kein verändertes Laufverhalten von Suc2 detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Disruptionen in *PSG1* oder *DOM34* keinen Einfluss auf die *N*-Glykosylierung von Suc2 haben. Andererseits zeigte sich, dass Suc2 in *pmt1*-Mutanten möglicherweise hyperglykosyliert vorliegt. Der „Schmier“ oberhalb der distinkten Bande bei 130 kDa hat in der *pmt1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein viel höheres Molekulargewicht.

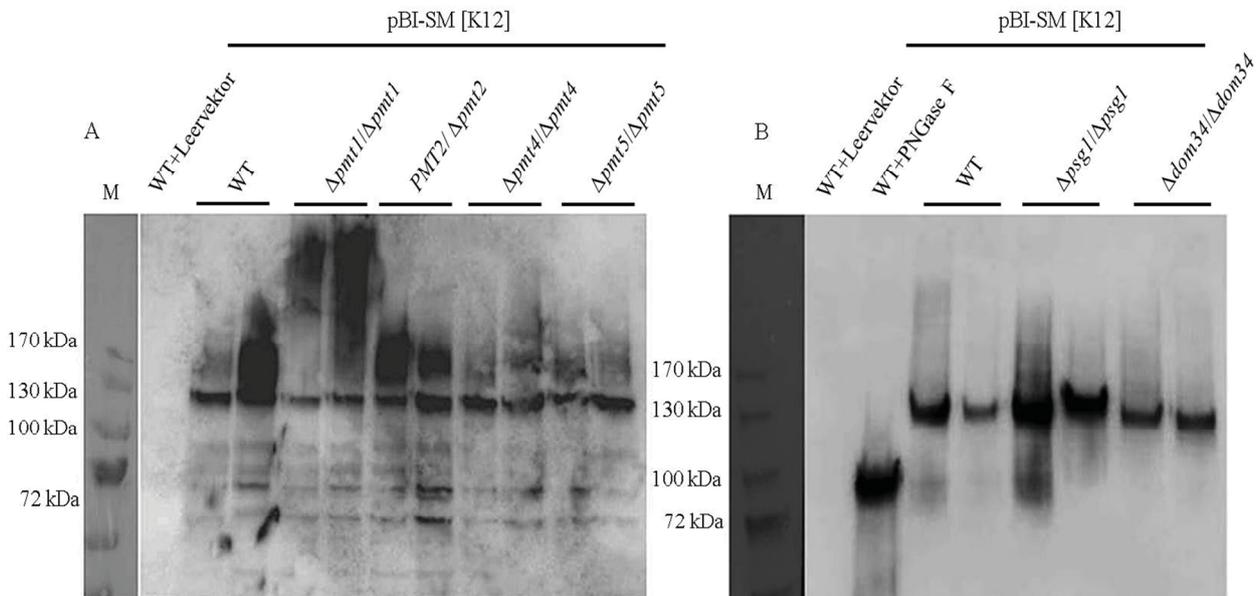


Abb. 3.29: Immunoblotanalyse von Suc2 in den Rohextrakten verschiedener Stämme

A) Rohextrakte der mit dem Plasmid pBI-SM [K12] transformierten Stämme CAI4 (WT), CAP1-3121 ($\Delta pmt1/\Delta pmt1$), P2-22 ($PMT2/\Delta pmt2$), CAP4-2162 ($\Delta pmt4/\Delta pmt4$) und P5-5744 ($\Delta pmt5/\Delta pmt5$), wurden auf 8 %iges, selbstgegossenes SDS-PAGE aufgetragen. Als Negativkontrolle (WT+Leervektor) wurden Rohextrakte des wildtypischen Stammes CAI4 transformiert mit dem Leervektor pBI-1 verwendet. B) Rohextrakte der mit dem Plasmid pBI-SM [K12] transformierten Stämme SK47 ($\Delta dom34/\Delta dom34$), CAI4 (WT) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) wurden auf ein kommerzielles SDS-PAGE (4-20 %iges Gradientengel von Pierce) aufgetragen. Als Negativkontrolle (WT+Leervektor) wurden Rohextrakte des wildtypischen Stammes CAI4, transformiert mit dem Leervektor pBI-1, verwendet. Zusätzlich wurden die Rohextrakte eines mit dem Plasmid pBI-SM [K12] transformierten Wildtypstammes mit PNGase F behandelt (WT+PNGase F). Das Epitop-markierte Suc2 (MYC-Epitop am C-Terminus) wurde in A und B mit einem Antikörper detektiert, welcher gegen das Myc-Epitop gerichtet war. Die Stämme wurden in SCAA-Medium angezogen.

Fazit zu 3.6

Weder für ein untersuchtes Substrat der *O*-Glykosylierung, noch für die *N*-glykosylierte Invertase (Suc2), zeigten *psg1*- und *dom34*-Mutanten ein verändertes Laufverhalten an. Die beiden Gene scheinen nicht direkt an den Mechanismen der *O*- oder *N*-Glykosylierung beteiligt zu sein. Interessant war die zu beobachtende Hyperglykosylierung von Suc2 im Hintergrund einer *pmt1*-Mutante. Dies könnte einer Kompensation der defekten *O*-Glykosylierung in einer *pmt1*-Mutante zugrunde liegen.

3.7 Genomweite Transkriptanalyse

Eine Disruption beider *PSGI* Allele hat, genau wie eine Überexpression in *pmt*-Mutanten, eine Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen und Effekte zur Folge. Oftmals liegen diese Phänotypen nicht direkt dem Defekt des jeweiligen Gens zugrunde, sondern sind eine Folge gestörter Signalwege oder Folge einer Adaption des Organismus auf die veränderte intrazelluläre Situation. Um einen Eindruck zu bekommen, wie *C. albicans* auf eine Disruption von *PSGI* reagiert, wurde eine genomweite Transkriptanalyse durchgeführt. Hierfür wurde aus logarithmisch wachsenden Kulturen von Wildtyp und *psg1*-Mutante RNA extrahiert und in markierte cDNA umgeschrieben. Die markierte cDNA der beiden Stämme wurde dann mit einem DNA-Microarray hybridisiert. Für diese genomweiten Transkriptionsanalysen wurden DNA-Microarrays der Firma Eurogentec verwendet, welche mit ca. 6.000 offenen Leserastern etwa 98 % der Gene von *C. albicans* enthalten. Dabei ist jedes Gen vierfach auf einem Microarray vertreten. Nach der Hybridisierung wurden die Microarrays gewaschen und eingescannt. Mittels des Programms GenepixPro 6.0 (Molecular Devices) wurden die Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten Spots den entsprechenden Genen zugeordnet. Die Normalisierung und die statistische Auswertung erfolgten mit GenespringGX 12.1 (Agilent Technologies). Für die Auswertung dieser DNA-Microarrays wurden vier Replikate verwendet. Zwei der Hybridisierungen waren sogenannte „dye swap“-Arrays. Hierbei wurden die Fluorochrom-Farbstoffe getauscht, da diese mit unterschiedlicher Effizienz in die cDNA eingebaut werden. Die cDNA dieser vier Hybridisierungen wurde aus der präparierten RNA von jeweils vier unabhängigen Kulturen synthetisiert. Somit wurden für die Transkriptomanalyse vier biologische (präparierte RNA) und jeweils vier technische (Anzahl der offenen Leseraster auf dem Chip pro Gen) Replikate verwendet. Der jeweilige Mittelwert der normalisierten Werte wurde dann in das Verhältnis zum Mittelwert der Referenz (Wildtyp) gesetzt. Hieraus ergab sich dann die Expression im Verhältnis zur Referenz. Es wurden nur solche Gene als reguliert eingestuft, die in allen 4 Microarrays ähnliche Signalintensitäten (normalisierte Werte) und in ihren Mittelwerten eine mindestens 2-fache Änderung zur Referenz aufwiesen. Insgesamt konnten im Rahmen dieser Untersuchungen 248 regulierte Gene ermittelt werden. Mittels eines Abgleichs der *C. albicans* Genomdatenbank (www.candidagenome.org) konnten die bereits vorhandenen Informationen zu diesen Genen ermittelt werden. Eine Auflistung befindet sich zusammen mit den Expressionswerten der Gene (als Verhältnis zur Referenz) im Anhang dieser Arbeit. Die Daten der Arrayanalyse sind vollständig bei Array Express unter der Accession Nummer E-MEXP-3976 einzusehen.

3.7.1 Stark regulierte Gene in der *psg1*-Mutante

Bevor eine Einteilung der 248 regulierten Gene in funktionelle Subkategorien erfolgt, sollten zunächst die am stärksten regulierten Gene analysiert werden. Von den jeweils positiv- und negativ-regulierten Genen sind jeweils die 12 Gene, die am stärksten reguliert waren in Abb. 3.30 dargestellt. Einige Gene, denen in *C. albicans* oder deren homologen Genen in anderen Organismen eine Funktion zugeordnet werden kann, sollen hier kurz erläutert werden.

Durch Psg1 stark reprimierte Gene im Wildtyp

OYE23 ist ein in *C. albicans* bisher uncharakterisiertes Gen. Sein homologes Gen in *S. cerevisiae* (*OYE3*) kodiert für eine NADPH-Oxireduktase, von der angenommen wird, dass sie im Sterol-Metabolismus und in der Antwort auf oxidativen Stress involviert ist. *CIP1* ist ein verifiziertes Gen, das möglicherweise ebenfalls als Oxireduktase fungiert. Die Genexpression wird bei Hitzeschock, der Anwesenheit von Schwermetallen, beim hyphalem Wachstum und bei oxidativem Stress induziert. *MDS3* ist ein verifiziertes Gen und kodiert für eine Komponente des TOR-Signalweg. Der TOR-Signalweges ist ein wichtiger Regulator für Wachstum und Nährstoff-Signalisierung. In *C. albicans* zeigen *mds3*-Deletionsmutanten Wachstumsdefekte, ein gestörtes Hyphenwachstum und eine verminderte Virulenz. Ein weiteres Gen, das vermutlich für eine Oxireduktase kodiert, ist *QTH1*. Das Gen ist ebenfalls verifiziert in *C. albicans*. Weitere positiv regulierte, allerdings nicht verifizierte Gene sind *ATO9*, *PGA42*, *SMF11*, *FRE3*, *PMS1* und *OGG1*. *ATO9* kodiert möglicherweise für ein Membranprotein, *PGA42* kodiert für ein Adhesin-ähnliches Protein, *SMF11* ist induziert in Biofilmen und *FRE3* hat Ähnlichkeit mit einer Eisen-Reduktase. Unter den positiv regulierten und nicht-verifizierten Genen sind *PMS1* und *OGG1* vermutlich involviert in den Mechanismen der DNA-Reparatur. *PMS1* kodiert für einen potenziellen „DNA-mismatch repair“-Faktor und das homologe Gen für *OGG1* in *S. cerevisiae* kodiert für eine mitochondriale Glykosylase.

stark positiv-regulierte Gene			stark negativ-regulierte Gene		
Gen ID	Name	-fache Regulation	Gen ID	Name	-fache Regulation
<i>ORF19.3433</i>	<i>OYE23</i>	9,42	<i>ORF19.7284</i>	<i>ASR2</i>	0,29
<i>ORF19.7557</i>	<i>FGR46</i>	7,45	<i>ORF19.2672</i>	<i>NCP1</i>	0,27
<i>ORF19.113</i>	<i>CIP1</i>	7,13	<i>ORF19.6139</i>	<i>FRE7</i>	0,26
<i>ORF19.6760</i>	<i>MDS3</i>	6,56	<i>ORF19.2947</i>	<i>SNZ1</i>	0,25
<i>ORF19.6899</i>	<i>QTH1</i>	5,78	<i>ORF19.6712</i>	<i>SGMI</i>	0,24
<i>ORF19.286</i>	<i>ATG10</i>	5,74	<i>ORF19.4777</i>	<i>DAK2</i>	0,24
<i>ORF19.3261</i>	<i>ATO9</i>	5,50	<i>ORF19.2608</i>	<i>ADH5</i>	0,24
<i>ORF19.2907</i>	<i>PGA42</i>	4,78	<i>ORF19.2531</i>	<i>CSP37</i>	0,23
<i>ORF19.4690</i>	<i>SMF11</i>	4,77	<i>ORF19.3554</i>	<i>AAT1</i>	0,23
<i>ORF19.1605</i>	<i>PMS1</i>	4,76	<i>ORF19.986</i>	<i>GLY1</i>	0,22
<i>ORF19.1270</i>	<i>FRE3</i>	4,61	<i>ORF19.3548.1</i>	<i>WH11</i>	0,19
<i>ORF19.7190</i>	<i>OGG1</i>	4,46	<i>ORF19.4716</i>	<i>GDH3</i>	0,19

Abb. 3.30: Analyse regulierter Gene aus DNA-Microarrays (*psg1*-Mutante gegen Wildtyp)

Die cDNA für die Stämme CAI4 (WT) und CSU3 ($\Delta psg1/\Delta psg1$) wurden aus vier unabhängig präparierten RNA synthetisiert und mit jeweils einem DNA-Microarray hybridisiert. Die relative Expression jedes Gens wurde ermittelt und in das Verhältnis zur Expression des Wildtypstammes gesetzt. Von den 248 regulierten Genen wurden jeweils 12 Gene mit der stärksten positiven Regulation (links/rot) und mit der stärksten negativen Regulation (rechts/blau) dargestellt.

Durch Psg1 stark induzierte Gene im Wildtyp

GDH3 ist ein in *C. albicans* uncharakterisiertes Gen, dessen Homolog in *S. cerevisiae* für eine NADP-Glutamat-Dehydrogenase kodiert. Mit dem Gen *GLY1* (verifiziert) ist eine L-Threonin-Aldolase unter den stark negativ regulierten Genen. *ADH5* kodiert in *C. albicans* vermutlich, wie auch sein Homolog aus *S. cerevisiae* (*ADH2*), für eine Alkohol-Dehydrogenase. *SNZ1* (verifiziertes Gen) ist in *C. albicans*, wie auch sein Homolog in *S. cerevisiae*, in der Biosynthese von Vitamin B6 involviert. *FRE7* (verifiziertes Gen) kodiert in *C. albicans* für eine Kupfer-Reduktase, die im basischem Milieu oder in Makrophagen hochreguliert wird. Ein ebenfalls stark negativ reguliertes und bereits gut charakterisiertes Gen in *C. albicans* ist *NCPI*. Es kodiert für eine NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, die zusammen mit Erg11 in der 14-alpha-Demetylierung von Lanosterol bei der Ergosterol-Biosynthese involviert ist.

3.7.2 „Gene Ontology“ (GO) Analyse der regulierten Gene

Gen-Ontologie ist eine Bioinformatik-Initiative, die zum Ziel hat, einen Großteil des Vokabulars innerhalb der Biowissenschaften zu vereinheitlichen (Begriffsdefinition: www.wikipedia.org). Darunter fällt auch die Zuordnung von Genen zu sogenannten GO-Termini. Diese GO-Termini unterteilen sich in drei Domänen und teilen Gene bzw. ihre Genprodukte anhand ihrer Eigenschaften ein. Diese Domänen sind „Zellkomponente“ (cellular component), „biologischer Prozess“ (biological process) und „molekulare Funktion“ (molecular function). Im Rahmen dieser GO-Analyse wurden die regulierten Gene lediglich nach ihrer Zugehörigkeit in diverse biologische Prozesse eingeteilt. Die GO-Analyse der regulierten Gene wurde über das Programm „GO-Slim Mapper“ auf der Internetseite www.candidagenome.org (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermMapper>) durchgeführt. Zu beachten ist, dass viele der innerhalb der GO-Analysen aufgelisteten Gene selbst in *C. albicans* noch nicht charakterisiert sind. Die Informationen bezüglich ihrer Zugehörigkeiten und Funktionen wurden in diesem Falle anhand von bioinformatischen Analysen sowie von bekannten homologen Genen verwandter Spezies, abgeleitet.

Unter „Biological Process“ werden alle molekularen Vorgänge und molekularen Ereignisse zusammengefasst, die einen definierten Anfang sowie ein definiertes Ende aufweisen und in lebenden Einheiten (Zellen, Gewebe, Organismen) integriert sind. Innerhalb dieser Domäne werden auf der „Candida Genome Database“ 28 GO-Termini untergeordnet (Arnaud *et al.*, 2009). In Tabelle 3.1 wurden die 248 regulierten Gene einigen dieser GO-Termini zugeordnet. Zudem zeigt ein Kuchendiagramm die Verteilung der regulierten Gene innerhalb der GO-Termini (Abb. 3.31). Den größten prozentualen Anteil bilden mit 20,6 % (54 Gene) Gene, die nicht eindeutig einem GO-Terminus zugeordnet werden können. Danach sind mit 17,7 % unter „stress response“ alle Gene zugeordnet, die mit Stressantworten der Zelle in Verbindung gebracht werden. Weitere relevante GO-Termini umfassen Proteinmodifikation (9,3 %), Lipid-Metabolismus (6,5 %) sowie Translation (3,2 %) und sollen mit ihren zugeordneten regulierten Genen im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

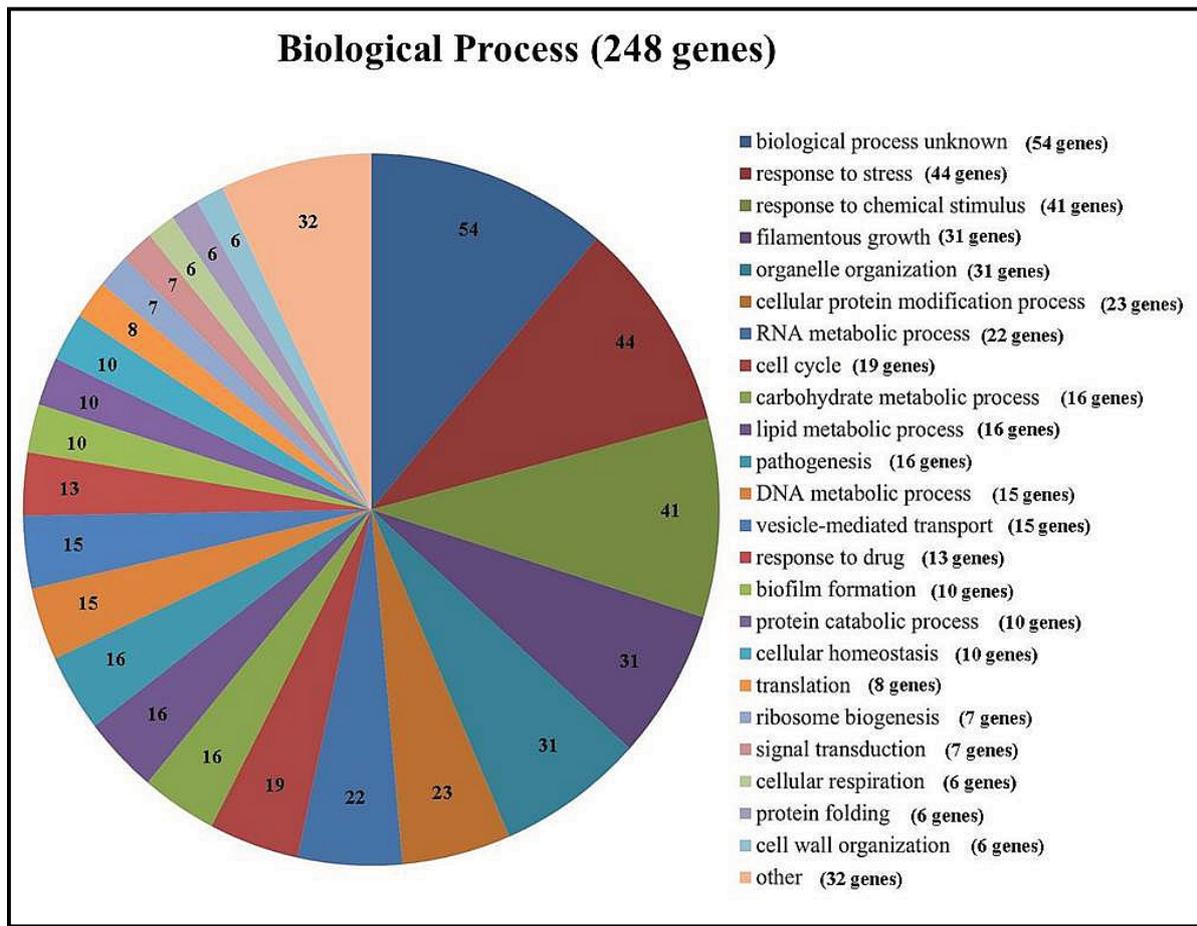


Abb. 3.31: Verteilung der 248 regulierten Gene in GO-Termini der Domäne „biological process“
Ausgehend von Tabelle 3.1 wurde ein Kuchendiagramm mit der Verteilung der 248 Gene innerhalb der GO-Termini erstellt.

Gene involviert in Stressantworten

Die Anzahl an möglichen zellulären Reaktionen auf veränderte, bzw. schädliche Umweltbedingungen, die gemeinhin als Stress für die Zelle definiert werden, ist ebenso hoch wie deren Auslöser. Als kommensaler Pilz ist *C. albicans* in der Lage, auf eine Vielzahl von Bedingungen zu reagieren. Um einen Eindruck zu bekommen inwiefern sich die zelluläre Situation von *C. albicans* im Falle einer *psg1*-Disruption verändert, sind in Abb. 3.31 und in Tab 3.1 die regulierten Gene gezeigt, die dem GO-Terminus „stress response“ zugeordnet wurden und damit in diversen Stressantworten von *C. albicans* eine Rolle spielen. Von den 248 regulierten Genen wurden 17,7 % (44 Gene) diesem GO-Terminus untergeordnet. Für zwei Stressantworten konnten mehrere Gene zugeordnet werden. Dies betraf zum einen die Antwort auf oxidativen Stress mit den Genen *CIP1*, *HSP21* und *CHK1*, welche alle in der *psg1*-Mutante hochreguliert waren. Zum anderen betraf dies die Gene *RAD10*, *RAD14*, *OGG1* und *PMS1*, welche in Prozesse der DNA-Reparatur involviert sind und ebenso, aufgrund ihrer positiven Regulation in der *psg1*-Mutante, im Wildtyp von Psg1 reprimiert werden. Die positive Regulation von Genen in der *psg1*-Mutante, welche involviert sind in DNA-Reparatur-Prozessen, wird auch anhand der zugeordneten Gene im GO-Terminus „DNA metabolic response“ deutlich (Tab 3.1).

GO-Term	Regulierte Gene	Frequenz
biological process unknown (39,17 %)	<i>orf19.7304, ASR2, LPF25, orf19.5449, orf19.7539.1, orf19.3335, orf19.6712, CMD3, orf19.1075, orf19.7027, PGA42, AMD22, orf19.5012, orf19.6245, orf19.3906, orf19.7210, orf19.4513, ATG10, orf19.3781, ATO9, STB2, orf19.7170, orf19.3973, orf19.2784, orf19.5225, ASR1, YJU99, ATO10, orf19.2928, orf19.2177, PGA30, orf19.2515, orf19.3254, PGA22, orf19.6065, orf19.251, orf19.557, LPF20, AES5, RSM23, FMP14, orf19.4793, orf19.4250, orf19.2509, orf19.7167, orf19.1549, orf19.2202, SPT1, orf19.1116, orf19.4574, DPP1</i>	20.6 %
response to stress (56,13 %)	<i>YNK1, APM1, RTA3, WH11, FTR1, CIP1, HSP21, SNF12, FGR46, MDS3, RAD10, ADE13, RAD14, KAR2, SAC3, AHP1, ERG5, AHA1, DAK2, CAT1, GAD1, VAC8, PRO2, orf19.6748, MNL1, HIR1, CDR1, orf19.5438, DDR48, TPS1, PMT1, NDH51, HDA1, GPH1, CHK1, OGG1, SCP160, SAN1, PTC2, CDC28, HSP12, ECM4, PMS1, orf19.4622</i>	17.7 %
response to chemical stimulus (44,18 %)	<i>YSH1, QTH1, ZCF16, DOA4, orf19.583, CIP1, PGA62, PTP3, NCP1, HSP21, orf19.6586, MDS3, ADE13, KAR2, AHP1, CAT1, GAD1, PRO2, orf19.6748, MNL1, CDR1, AHP1, DDR48, ERG11, TPS1, PMT1, SWI3, PHO15, HDA1, ERG3, CHK1, orf19.223, KRE9, orf19.2335, SSN3, SCP160, SAN1, SIT1, HIS5, PTC2, SEC4</i>	16.5 %
Filamentous growth (41,7 %)	<i>YNK1, APM1, CMK2, CDC55, ZCF16, DEF1, orf19.583, UBC1, HSP21, FGR46, MDS3, PGA13, ERG5, CAT1, VAC8, OSH3, DDR48, CHA1, TPS1, PMT1, NDH51, HDA1, ERG3, CHK1, KRE9, FGR43, SSN3, ADE5,7, CDC28, ECM4, YPT72</i>	12.5 %
organelle organization (65,9 %)	<i>MRP20, EST3, PEX13, DOA4, UBC1, SPT2, RRNL, RAD14, KAR2, SAC3, VAC8, orf19.2821, OSH3, VMA4, HIR1, orf19.5438, SWI3, orf19.247, HDA1, PRI1, orf19.3003, orf19.4758, TEL2, SCP160, orf19.5627, CDC28, HSP12, SEC4, YPT72, PMS1, orf19.4622</i>	12.5 %
cellular protein modification process (35,4 %)	<i>YNK1, CMK2, UGP1, orf19.4760, PTP3, UBC1, UBP15, SPF1, orf19.5438, PMT1, PHO15, NMT1, HDA1, CWH8, CHK1, orf19.223, HRT1, SSN3, SAN1, PTC2, CDC28, CWH43, CMK1</i>	9.3 %
RNA metabolic process (47,3 %)	<i>YSH1, EXO84, MAK16, LSM6, SPT2, ALA1, SAC3, ISU1, orf19.7646, LEA1, SAP49, HIR1, ILS1, PRI1, SNM1, SSN3, RPR2, VAS1, SNU13, RPC19, CDC28, SGN11</i>	8.9 %
cell cycle (37,6 %)	<i>CMK2, CDC55, RAD10, SAC3, orf19.6748, HIR1, TPS1, PMT1, NDH51, orf19.4758, HRT1, SSN3, SCP160, PTC2, CDC28, HSP12, SEC4, YPT72, PMS1</i>	7.7 %
carbohydrate metabolic process (16,8 %)	<i>GLK4, UGP1, orf19.7214, HSP21, GDB1, ARA1, DAK2, SPF1, PGA56, TPS1, PMT1, SWI3, GPH1, CWH8, KRE9, HEX1</i>	6.5 %
lipid metabolic process (16,8 %)	<i>ACC1, PEX13, ERG10, NCP1, ERG9, BTS1, ERG5, LKH1, AHP1, ERG11, OLE2, CWH8, FAD2, ERG3, ARE2, CWH43</i>	6.5 %
Pathogenesis (24,7 %)	<i>WH11, HEM3, FTR1, CSP37, HSP21, MDS3, CAT1, SPF1, TPS1, PMT1, NMT1, ERG3, CHK1, HEX1, ADE5,7, YPT72</i>	6.5 %
DNA metabolic process (25,3 %)	<i>EST3, RAD10, RAD14, SAC3, HIR1, orf19.5438, DDR48, HDA1, PRI1, TEL2, OGG1, orf19.5627, CDC28, PMS1, orf19.4622</i>	6.0 %
vesicle-mediated transport (19,1 %)	<i>APM1, GOT1, EXO84, APL6, DOA4, orf19.3247, OSH3, UBP15, orf19.5825.1, SEC26, CHC1, CDC28, APS1, SEC4, YPT72</i>	6.0 %
response to drug (20,8 %)	<i>YSH1, QTH1, PGA62, NCP1, orf19.6586, MNL1, CDR1, ERG11, PMT1, ERG3, orf19.2335, SIT1, SEC4</i>	5.2 %
biofilm formation (7,2 %)	<i>WH11, DEF1, PGA10, YWP1, MDS3, SPF1, PMT1, NDH51, ADH5, CHK1</i>	4.0 %
protein catabolic process (13,1 %)	<i>DOA4, UBC1, KAR2, LKH1, UBP15, PMT1, HRT1, SAN1, orf19.5752, orf19.4622</i>	4.0 %
cellular homeostasis (9,8 %)	<i>DOA4, FTR1, PGA10, AHP1, ISU1, SPF1, OYE32, SIT1, ADE5,7, YPT72</i>	4.0 %
Translation (26,0 %)	<i>MRP20, MRPS9, RRNL, ALA1, orf19.989, ILS1, VAS1, MRP4</i>	3.2 %
ribosome biogenesis (18,7 %)	<i>MAK16, LSM6, SAC3, orf19.7646, VMA4, SNM1, SNU13</i>	2.8 %
signal transduction (12,9 %)	<i>CDC55, MDS3, CHK1, SCP160, PTC2, SEC4, YPT72</i>	2.8 %
cellular respiration (5,3 %)	<i>MRPS9, SDH12, orf19.6602, CYT1, NDH51, SDH2,</i>	2.8 %
protein folding (5,7 %)	<i>GSF2, CPR3, KAR2, orf19.7646, AHA1, orf19.2335</i>	2.4 %
cell wall organization (10,4 %)	<i>PGA62, PGA13, SPF1, PMT1, KRE9, CWH43</i>	2.4 %

Tab. 3.1: Verteilung der 248 regulierten Gene in GO-Termini der Domäne „biological process“

Ausgehend von ihrer positiven (rot) oder negativen (blau) Regulation wurden die Gene aus dem Microarray-Experiment farblich dargestellt und den GO-Termini der Domäne „biological process“ zugeordnet. Die Frequenz beschreibt dabei den prozentualen Anteil der 248 regulierten Gene, welche im jeweiligen GO-Terminus vertreten sind. Hinter den GO-Termini ist der jeweilige prozentuale Anteil aller Gene im Genom angegeben, die diesem GO-Terminus zugeordnet sind. Desweiteren sind nur jene GO-Termini vertreten, die im Rahmen dieser Analyse als relevant erachtet wurden.

Mit dem negativ reguliertem *HDA1* ist ein Gen, welches für eine Histon-Deacetylase kodiert, innerhalb dieser Gruppe vertreten. *Hda1* induziert filamentöses Wachstum in *C. albicans* und reguliert den Wechsel zwischen der „white“- und der „opaque“-Form der Zellen (Srikantha *et al.*, 2001). Ein für diese Arbeit sehr wichtiges Gen ist *PMT1*, welches in einer *psg1*-Mutante negativ reguliert ist und von dem die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5 bereits ein Absinken des *PMT1*-Transkriptspiegels im Hintergrund einer *psg1*-Mutante zeigten. Dies zeigt, dass im Wildtyp das *PMT1*-Transkript durch *Psg1* induziert wird. Ein ebenfalls im Wildtyp durch *Psg1* induziertes und in einer *psg1*-Mutante negativ reguliertes Gen (Abb. 3.31) ist *KAR2*. *KAR2* in *C. albicans* spielt eine Rolle bei der Translokation von Proteinen in das ER, wo es als Chaperon fungiert (Lan *et al.*, 2004). Von dem homologen Gen (*KAR2*) aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass sein Protein an der Regulation des UPR-Weges durch Interaktion mit *Ire1* beteiligt ist. Ein weiteres negativ reguliertes Gen innerhalb dieser Gruppe ist *TPS1*. Es kodiert für eine Trehalose-6-Phosphat-Synthase und hat Einfluss auf die Virulenz innerhalb des Maus-Modells (systemische Infektion) und auf das Hyphenwachstum von *C. albicans*. Die Akkumulation des Disaccharids Trehalose gehört zu einem primären Defensiv-Mechanismus von Hefen unter Umweltstress (oxidativer und osmotischer Stress, Hitzeschock) und diversen Mangelbedingungen (Martínez-Esparza *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass *TPS1*, welches für die Trehalose-Synthese verantwortlich ist, unter oxidativem Stress stark induziert wird und dass Mutanten, die keine Trehalose synthetisieren können, sehr sensitiv gegenüber oxidativem Stress sind (Álvarez-Peral *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* kodiert das homologe Gen (*TPS1*) ebenfalls für eine Trehalose-6-Phosphat-Synthase. Zudem ist bekannt, dass dort die Proteinmenge bei Stress während der DNA-Replikation ansteigt (Tkach *et al.*, 2012). Als letztes Gen innerhalb dieses GO-Terminus soll *DDR48* erwähnt werden, welches bei einigen Umwelt-Stressbedingungen induziert wird und ebenfalls in der Antwort auf DNA-Schädigung involviert ist (Cleary *et al.*, 2012). Entgegen der positiven Regulation von Genen innerhalb dieses GO-Terminus, die in der Antwort auf oxidativen Stress und in den Prozessen der DNA-Reparatur involviert sind, ist *DDR48* negativ reguliert und somit ein im Wildtyp durch *Psg1* induziertes Gen.

Gene involviert in Prozesse der Proteinmodifikation

Da *PSG1* anhand von Glykosylierungsmutanten in *S. cerevisiae* (Homolog *YIL001w*) identifiziert wurde und *O*- und *N*-Glykosylierung zu den wichtigsten Proteinmodifikationen von *C. albicans* zählen, wurden die 23 regulierten Gene, welche dem GO-Terminus „cellular protein modification process“ zugeordnet wurden, näher betrachtet (Tab. 3.1; Abb. 3.31). Innerhalb dieses GO-Terminus kodieren die zugeordneten Gene vorwiegend für Kinasen und Phosphatasen mit verschiedenen Funktionen. Ausgehend von ihrer Genregulation lässt sich kein Muster erkennen. Sie kommen positiv, wie auch negativ reguliert vor. Erwähnenswert ist das ebenfalls in diesem GO-Terminus vertretene, positiv-regulierte und daher im Wildtyp durch *Psg1* reprimierte Gen *CHK1*. Das Gen *CHK1* kodiert für eine Zellwandsensor-Kinase welche an der Regulation der Zellwand-Biosynthese beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass *chk1*-Mutanten einen veränderten Zellwand-Mannan Anteil und Veränderungen im Anteil der beta-1,6 Glykane aufweisen, wodurch es zu einer stärkeren Immunreaktion während der Wirtsinfektion einer solchen Mutante kommt (Klippel *et al.*, 2010). Folglich sind *chk1*-Mutanten avirulent. In einer *psg1*-Mutante ist die Expression des Gens dreifach erhöht, was auf eine Erhöhung des Zellwand-Mannan Anteils in einer *psg1*-Mutante hinweisen

könnte. Eine solche Erhöhung des Zellwand-Mannan Anteils könnte eine Antwort der Zelle auf den abgesenkten *PMT1*-Transkriptspiegel in der *psg1*-Mutante sein (Abschnitt 3.5). *PMT1* hat eine Schlüsselfunktion innerhalb der Protein *O*-Mannosylierung und eine Disruption führt zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Zellwand von *C. albicans*. Im Falle der Disruption des *PMT1*-Gens kommt es zu einer starken Erhöhung des β -1,3 Glukan-Anteils und zu einer starken Abnahme der Mannoproteine innerhalb der Zellwand (Prill *et al.*, 2005). Eine Erhöhung des *CHK1*-Transkripts könnte zu einer Stabilisierung der durch den geringeren *PMT1*-Transkriptspiegel geschwächten Zellwand führen. Ein weiteres negativ-reguliertes Gen ist *NMT1* eine Protein *N*-Myristoyltransferase. Myristoylierung ist essenziell in *C. albicans* und geschieht sehr spezifisch am Glycinrest einiger Proteine. Durch die abgesenkten Transkriptspiegel von *PMT1* und *NMT1*, scheint neben der Protein *O*-Mannosylierung auch die *N*-Myristoylierung in einer *psg1*-Mutante reduziert zu sein. Eine weitere Gruppe von Genen innerhalb dieses GO-Terminus haben eine Rolle in der Ubiquitinierung von Proteinen. Die Gene *UBC1*, *HRT1*, *SAN1* und der *ORF19.5438* sind jeweils in E3 Ubiquitinligase-Komplexen involviert und, bis auf *UBC1*, positiv reguliert. Sollte Psg1 eine Rolle bei der Ubiquitinierung von Proteinen haben, so könnte die positive Regulation dieser Gene in einer *psg1*-Mutante ein redundanter Mechanismus sein um die Abwesenheit von Psg1 zu kompensieren.

Gene involviert in Prozesse des Lipid-Metabolismus

Die erhöhte Sensitivität der *psg1*-Mutante gegenüber Clotrimazol (Abschnitt 3.2.1.3) könnte auf einen Defekt im Lipid-Metabolismus hinweisen. Aus diesem Grund sollten die 16 regulierten Gene, die dem GO-Terminus „lipid metabolic process“ zugeordnet wurden, näher betrachtet werden. Auffällig ist, dass allein sieben Gene (*ERG10*, *ARE2*, *ERG11*, *ERG9*, *ERG5*, *ERG3*, *NCP1*), die eine Rolle in der Ergosterol-Synthese spielen, deutlich negativ reguliert waren. Ergosterol ist eine Komponente fungaler Zellmembranen und seine Synthese bietet einen wichtigen Angriffspunkt für antifungale Mittel, wie zum Beispiel Azole (Balkis *et al.*, 2004). Ein weiteres negativ reguliertes Gen ist *FAD2*. *FAD2* kodiert für eine Δ 12-Fettsäure-Desaturase, welche in der Synthese von Linolsäure involviert ist. Die Senkung des *FAD2*-Transkriptspiegels könnte eine Gegenreaktion zu der vermutlich erniedrigten Ergosterol-Synthese und für den Erhalt der Membranfluidität sein. Linolsäure ist eine Hauptkomponente von Zellmembranen (Murayama *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den negativ regulierten Genen ist der Transkriptspiegel des *OLE2*-Gens 3,6-fach erhöht. Ole2 fungiert in *C. albicans* vermutlich als Fettsäure-Desaturase und ist involviert in der Synthese von Prostaglandin (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Erb-Downward und Noverr, 2007).

Gene involviert im vesikulären Transport

Der GO-Terminus „vesicle mediated transport“ umfasst alle zellulären Transport-Prozesse, bei denen Substanzen in Membran-gebundene Vesikel bewegt werden. Dies betrifft neben dem vesikulären Transport innerhalb des sekretorischen Pfades auch die Prozesse der Exo- und Endozytose. Auffällig bei den 15 Genen, die diesem GO-Terminus zugeordnet wurden, (Tab. 3.1; Abb. 3.31) war, dass mit Ausnahme der Gene *DOA4*, *ASP1* und *GOT1* alle weiteren Gene negativ reguliert waren. Zudem haben einige der negativ regulierten Gene (*APM1*, *SEC26*, *CHC1*, *ORF19.3247* und *ORF19.5825.1*), oder deren homologe Gene Funktionen für den AP1-Clathrin-Adaptor Komplex. Dieser Komplex wird an die Membran

des trans-Golgi rekrutiert und vermittelt den endocytotischen Transport von Kompartimenten zu den frühen Endosomen (Foote und Nothwehr, 2006). Dem entgegen steht das normalerweise im Wildtyp durch *Psg1* reprimierte Gen *APSI*, welches als kleine Untereinheit des AP1-Clathrin-Adaptor Komplexes eine Rolle im „protein sorting“ am trans-Golgi Netzwerk hat (Phan *et al.*, 1994). Ein weiteres positiv reguliertes Gen ist *GOT1*. Das homologe Protein aus *S. cerevisiae* ist an der Golgi-Membran lokalisiert und vermutlich involviert an Vesikel-Fusionen beim vesikulären Transport vom ER zum Golgi und vom Golgi zu den Endosomen (Conchon *et al.*, 1999). Das dritte positiv regulierte Gen innerhalb dieses GO-Terminus ist das für eine Ubiquitin-Hydrolase kodierende *DOA4*. Das homologe Gen aus *S. cerevisiae* (*ScDOA4*) kodiert für eine Ubiquitin-Hydrolase, die an der Deubiquitinierung von Substraten am späten Endosom beteiligt ist und darüber hinaus eine Rolle im „protein sorting“ spielt (Amerik *et al.*, 2000). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Hochregulierung von *DOA4* zur Antwort auf oxidativen Stress von *C. albicans* gehört (Wang *et al.*, 2005).

Gene involviert in Prozesse der Translation

Unter den regulierten Genen der *psg1*-Mutante waren acht Gene beteiligt an biologischen Prozessen der Translation (Tab. 3.1; Abb. 3.31). Jedes dieser Gene ist deutlich negativ reguliert und, ausgehend von den Funktionen ihrer homologen Gene in *S. cerevisiae*, vermutlich involviert in den Aufbau und Funktion der mitochondrialen Ribosomen. Besonders auffällig sind hierbei die drei *MRP* Gene (*MRP4*, *MRPS9*, *MRP20*) und *ORF19.989* (Ortholog von *MRPS5* aus *S. cerevisiae*), welche jeweils Teile der großen und kleinen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms sind (Graack und Liebold, 1998). Des Weiteren ist auch die Expression einer ribosomalen RNA, *RRNL* stark reduziert. *RRNL* ist eine bisher uncharakterisierte, mitochondrielle, ribosomale RNA, welche in der großen Untereinheit von Ribosomen lokalisiert ist. Die anderen regulierten Gene in dieser Gruppe kodieren für verschiedene tRNA-Synthetasen, denen auch unter anderem eine Funktion innerhalb der Mitochondrien zugesprochen wird.

3.7.3 Vergleichende Analyse mit regulierten Genen aus *pmt*-Mutanten

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine genetische Interaktion zwischen *PSG1*, *PMT1* und *PMT4* existiert, sollten die Auswirkungen ihrer Mutationen auf die jeweiligen Transkriptomprofile verglichen werden. Genomweite Transkriptomanalysen aus früheren Arbeiten zeigten, dass in *pmt*-Mutanten die Expression von Genen des Hexose-Metabolismus und der Glycerin-Biosynthese gesenkt war (Cantero *et al.*, 2007). Es wurde angenommen, dass aufgrund der veränderten Zusammensetzung der Zellwand, die Synthese von osmotisch aktivem Glycerin reduziert wird, um, durch den geringeren Wassereinstrom, den Turgor innerhalb der Zelle zu senken. In einer *psg1*-Mutante hingegen ist der Glukose-Metabolismus nicht beeinträchtigt. Unterschiede zwischen den Mutanten gibt es auch bei der Regulation einiger Stressantwortgene. In *pmt*-Mutanten erhöht sich der ER-Stress, da durch die mangelnde *O*-Mannosylierung die Anzahl an falsch gefalteten, instabilen und in ihrer Funktion eingeschränkten Proteinen steigt. Dies wird besonders durch die erhöhte Expression der Stressantwortgene *KAR2*, *DDR48*, *DEF1* und *CDR1* deutlich (Cantero *et al.*, 2007). In einer *psg1*-Mutante sind diese Gene, im Gegensatz zur *pmt1*-Mutante deutlich negativ reguliert. In der *pmt1*-Mutante und der *psg1*-Mutante erfolgt die Regulation dieser

Stressantwortgene gegensätzlich. Besonders interessant ist dabei die gegensätzliche Regulation von *KAR2*. In der *pmt1*- und *pmt5*-Mutante ist *KAR2* deutlich hochreguliert (Cantero *et al.*, 2007). Das Genprodukt von *KAR2* reguliert durch Interaktion mit Ire1 die „unfolded protein response“, zu deren Aktivierung es allerdings in der *psg1*-Mutante nicht zu kommen scheint, da es hier negativ reguliert wird. Eine Gemeinsamkeit in den Auswirkungen einer *pmt1*-Mutante und der *psg1*-Mutante ist die negative Regulation einiger Gene involviert in der Protein-Biosynthese. Betroffen sind dabei für ribosomale Proteine kodierende Gene, was bei beiden eine verringerte Proteinbiosynthese vermuten lässt. In *pmt1*-Mutanten sind die Gene *MRPL37*, *NEP1*, *MRP51* und *MRP10* negativ reguliert. In *psg1*-Mutanten betrifft dies die Gene *MRP4*, *MRPS9*, *MRP20*. Zusätzlich ist hier noch das Gen für eine ribosomale RNA, *RRNL* negativ reguliert. Eine weitere Gruppe von Genen, die in der *pmt1*- und in der *psg1*-Mutante positiv reguliert wurden, sind die *PGA*-Gene („putative GPI-anchored“). Einige dieser Gene weisen Ähnlichkeiten zu Adhesinen auf und spielen eine Rolle in der Regeneration der Zellwand (Rashki *et al.*, 2013). In der *pmt1*-Mutante betrifft dies mit *PGA36* ein Gen, welches unter Hyphen-induzierenden Bedingungen induziert wird und *PGA13*, welches in der Zellwand-Synthese involviert ist. In der *psg1*-Mutante sind sechs *PGA*-Gene (*PGA42*, *PGA22*, *PGA56*, *PGA13*, *PGA30*, *PGA63*) positiv reguliert. Im Wildtyp werden diese Gene durch die Anwesenheit des Psg1-Proteins reprimiert. Die meisten dieser *PGA*-Gene haben eine Funktion innerhalb der Zellwand.

Fazit

Die genomweite Transkriptanalyse ermittelte 248 Gene in der *psg1*-Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp positiv oder negativ reguliert waren. Die positiv regulierten Genen (reprimiert im Wildtyp durch Psg1) kodierten in höherer Anzahl für Proteine, die in verschiedene Stressantworten (z.B. oxidativer Stress) involviert waren sowie für Proteine, die in der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Die positive Regulation der Zellwandsensor-Kinase *CHK1* sowie die positive Regulation der *PGA*-Gene in der *psg1*-Mutante, weisen auf eine Veränderung im Mannan-Anteil sowie auf eine veränderte Zellwandkomposition von *psg1*-Mutanten hin. Des Weiteren fiel mit *OLE2* ein weiteres, in der *psg1*-Mutante positiv reguliertes Gen auf, dessen Genprodukt vermutlich als Fettsäure-Desaturase in der Synthese von Prostaglandin involviert ist. Als negativ regulierte Gene (induziert im Wildtyp durch Psg1) fielen vor allem *PMT1* und *KAR2* auf, da sie involviert in der Protein *O*-Mannosylierung und in der weiterführenden Faltung von Proteinen im ER sind. Bei Genen, die eine Ligase-Aktivität aufwiesen, fanden sich fünf Gene, die in E3-Ubiquitinligase Komplexen involviert sind und positiv reguliert waren. Viele negativ-regulierte Gene hatten eine Funktion im Lipid-Metabolismus, wie z.B. Gene, die in der Ergosterol-Biosynthese involviert sind. Weiterhin waren einige negativ regulierte Gene involviert in den Prozessen der mitochondrialen Translation. Ein Vergleich mit den Microarray-Analysen der *pmt1*-Mutante zeigte, dass einige Stressantwortgene (*KAR2*, *DDR48*, *DEF1* und *CDR1*) in der *psg1*-Mutante gegensätzlich reguliert werden. Gemeinsamkeiten fanden sich in der negativen Regulation einiger Gene, die in der mitochondrialen Translation involviert sind sowie in der positiven Regulation einiger *PGA*-Gene.

3.8 Identifikation von Psg1-Interaktionspartnern mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems

Die im Abschnitt 3.1 beschriebenen Sequenzmotive (BTB-Domänen) der *PSG1* Aminosäuresequenz legen die Vermutung nahe, dass Psg1 mit anderen Proteinen interagiert. Ferner könnte die Identifizierung potenzieller Interaktionspartner Aufschluss über die Funktion des Psg1-Proteins geben. Zu diesem Zwecke wurde eine Genbanksuche in *S. cerevisiae* mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems durchgeführt. Für die Suche nach Psg1-Interaktionspartnern wurde das Plasmid pBD-Psg1 konstruiert. In diesem Plasmid wurde die Sequenz des *PSG1*-Gens N-terminal mit der Sequenz für die DNA-bindende Domäne (BD) des Transkriptionsfaktors Gal4 aus *S. cerevisiae* fusioniert. Die so konstruierte Genfusion steht unter der Kontrolle des konstitutiv-aktiven *ADHI*-Promotors. Zusammen mit dem Plasmid pBD-Psg1 wurden DNA-Bankvektoren mit der genomischen DNA aus *C. albicans* in den *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A kotransformiert. In den Bankvektoren pDYC-C1, pDYC-C2 und pDYC-C3 waren gDNA-Fragmente aus *C. albicans* mit der Sequenz für die Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Im Falle einer Interaktion der BD- und AD-Fusionsproteine sollte es zu einer Expression der Reportergene *lacZ*, *ADE2* und *HIS3* des Stamms pJ69-4A kommen und der Stamm sollte prototroph für Adenin und Histidin werden. Insgesamt wurden so von ca. 20000 Kolonien 18 positive Transformanten isoliert.

3.8.1 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Nach Transformation der Plasmide wurden die Zellen zunächst auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen. Da die transformierten Plasmide jeweils einen dieser Auxotrophiemarker enthielten, wurde dadurch zunächst nur auf das Vorhandensein des Plasmids pBD-Psg1 und des Bankplasmides selektiert. Im Anschluss erfolgte die Selektion auf Interaktionen der Fusionsproteine auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan. Protein-Protein Interaktionen der positiven Transformanten wurden danach zunächst quantitativ mittels eines „X-Gal-overlay“ ermittelt (Abb. 3.32). Hierbei wurden die Zellen mit einer X-Gal-haltigen Agarosesuspension überschichtet. Bei Expression des *LacZ*-Reportergens wird das X-Gal von der β -Galaktosidase gespalten, wodurch sich die Kolonien positiver Transformanten blau färben. Innerhalb dieses X-Gal-Tests zeigten von den 18 getesteten Kolonien 15 Kolonien eine deutliche Blaufärbung (Abb. 3.31). Kolonien der Transformanten mit den Plasmiden p1-1GAD, p1-5GAD und p1-9GAD zeigten auch nach mehrfacher Wiederholung des Tests keine Blaufärbung. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Leervektoren pGAD-C1 und pGBD-C1 sowie pBD-Psg1 mit pGAD-C1 transformiert und mit der beschriebenen Methode auf Anwesenheit von β -Galaktosidase getestet. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide pACT-II und pGAD-C1 sowie die Plasmide pSE1111 und pSE1112 in den Stamm PJ69-4A transformiert und im „X-Gal-overlay“ getestet. Im Plasmid pACT-II befindet sich das komplette *GAL4*-Gen unter Kontrolle eines *ACT1*-Promotors. Das Gal4-Protein ist allein in der Lage, die Transkription der Reportergene zu induzieren. Die Plasmide pSE1111 und pSE1112 enthalten die Gene *SNF1* und *SNF4* fusioniert an die Sequenzen der Gal4-Aktivierungs-, bzw. an die Gal4-Bindedomäne. Es ist bekannt, dass Snf1 und Snf4 miteinander interagieren (Jiang und Carlson *et al.*, 1997) und so ebenfalls die Transkription der Reportergene auslösen.

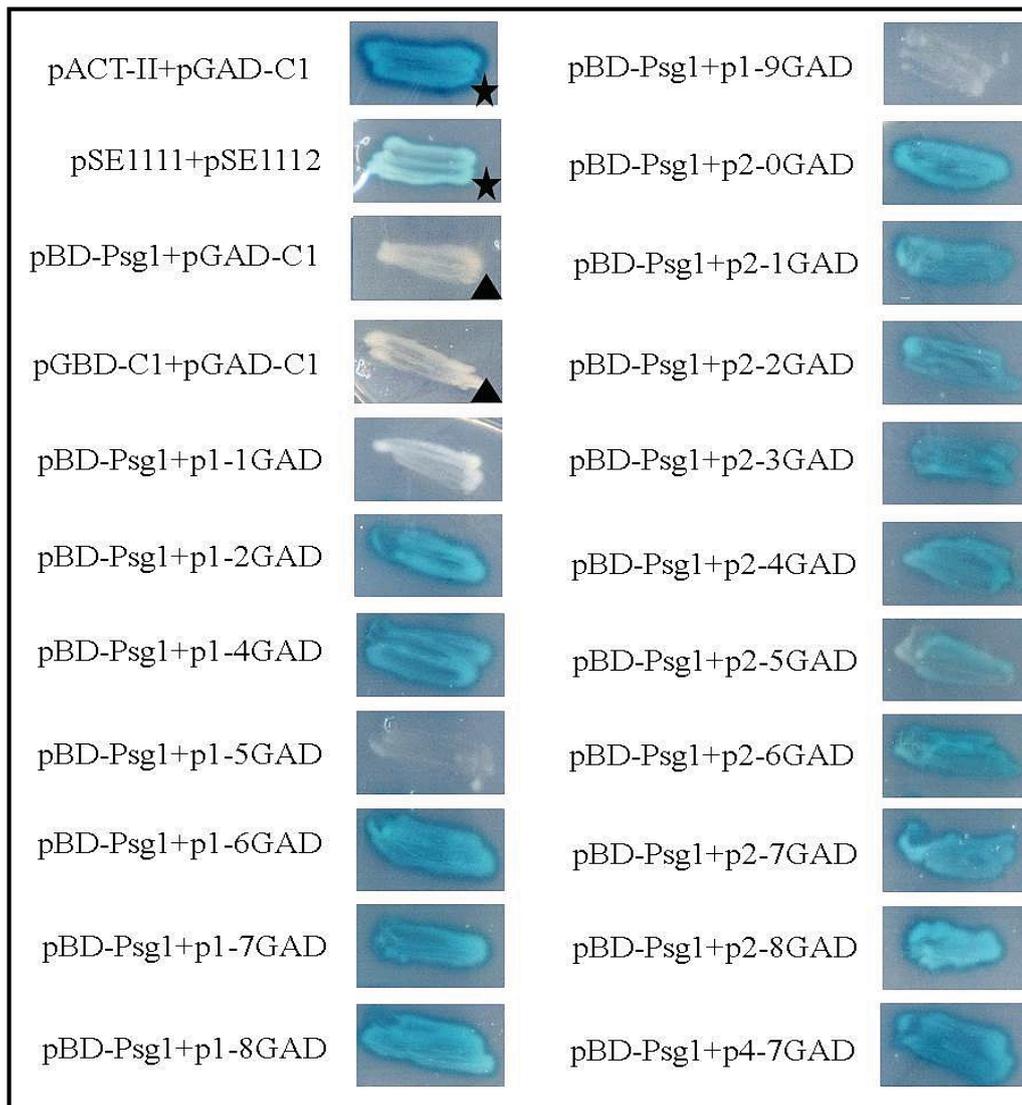


Abb. 3.32: X-Gal Test positiver Transformanten

Transformanten, die in der Lage waren auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin zu wachsen, wurden vereinzelt und zusammen mit Positiv-(Stern) und Negativkontrollen (Dreieck) auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen. Nach einer 3 tägigen Inkubation bei 30 °C wurde ein „X-Gal-overlay“ durchgeführt. Eine Blaufärbung indiziert die Anwesenheit einer aktiven β -Galaktosidase in den Zellen, welche der Expression des *lacZ*-Reportergens zugrunde liegt.

Aus Transformanten, die sich im quantitativen X-Gal Test blau färbten, wurden die Plasmide isoliert und in *E. coli* „Top10“ Zellen retransformiert. Aus diesen *E. coli* Zellen wurden dann die durch Restriktionsverdau ermittelten Bankplasmide isoliert. Um die in Abb. 3.32 gezeigte Interaktion der Fusionsproteine zu verifizieren, wurden die aus *E. coli* präparierten Bankplasmide zusammen mit dem Plasmid pBD-Psg1 erneut in den Hefestamm PJ69-4A kotransformiert (auf SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan). Die Transformanten wurden daraufhin auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin ausgestrichen. Nur bei einer Interaktion der Fusionsproteine aus dem Bankplasmid und pBD-Psg1 kommt es zu einer Expression des *ADE2*-Gens. In Abb. 3.33 ist das Wachstum der Transformanten auf den SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin zu sehen. Wie sich zeigte, sind alle 15 Transformanten, die mit einem Bankplasmid und dem Plasmid pBD-Psg1 transformiert wurden, in der Lage auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin zu wachsen.

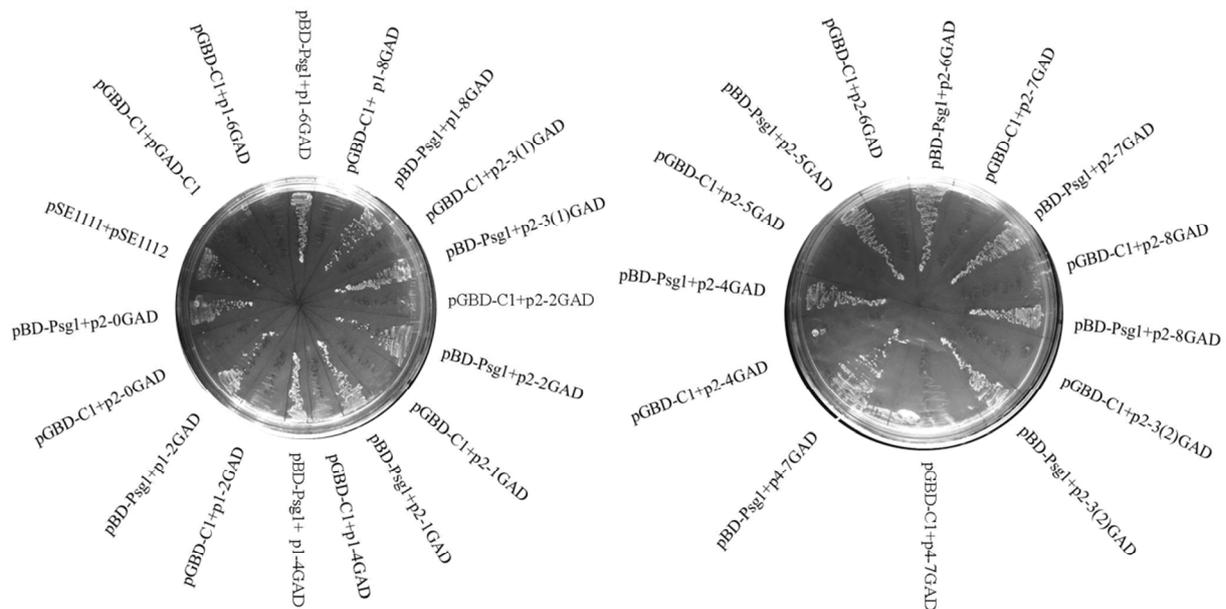


Abb. 3.33: Wachstum der retransformierten Stämme auf SD-leu-trp-ade Medium

Die Transformanten wurden auf SD-leu-trp-ade Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 4 Tage inkubiert. Jedes Bankplasmid wurde zusätzlich mit einem Leerplasmid pGAD-C1 transformiert. Als weitere Negativkontrolle wurde ein Hefestamm verwendet, der die beiden Leerplasmide pGAD-C1 und pGBD-C1 trug. Als Positivkontrolle diente ein Hefestamm transformiert mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112.

Um eine Selbstaktivierung der Protein-Fragmente aus den Bankplasmiden auszuschließen, wurden die Bankplasmide zusätzlich mit dem Leervektor pGBD-C1 transformiert und ausgestrichen. Wie erwartet zeigen die Transformanten mit Bankplasmid und Leervektor kein Wachstum auf SD-Platten ohne Leucin, Tryptophan und Adenin. Daraus ist zu schließen, dass das Genprodukt des jeweiligen genomischen Fragments auf dem Bankplasmid mit dem Psg1::BD-Fusionsprotein interagiert und es so zur Expression des Reportergens *ADE2* kommt.

3.8.2 Sequenzanalyse der Bankplasmide

Die zuvor aus den *E. coli* „Top10“ Zellen isolierten Bankplasmide wurden nun auch sequenziert. Die Sequenzierung der Bankplasmide erfolgte von der Aktivierungsdomäne in das fusionierte Bankfragment. Anschließend wurde die Sequenz über PubMedBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) einem bekannten Gen zugeordnet und entsprechend mit der Candida-Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org/>) verglichen. Es wurden, ausgehend von Abb. 3.33, insgesamt 15 Bankplasmide sequenziert. Für die Plasmide p2-1GAD, p2-2GAD, p1-7GAD, p2-5GAD, p2-4GAD und p4-7GAD konnte keine Sequenz ermittelt werden, weshalb sie nicht weiter berücksichtigt wurden. Anhand der Sequenzen der Bankfragmente konnten drei Leseraster zugeordnet werden. Diese Leseraster waren *ORF19.6776* (*GCD2*), *ORF19.2366* und *ORF19.6729* (*TIP120*). In Abb. 3.34 sind die ermittelten Leseraster und die übereinstimmenden Bankfragmente schematisch dargestellt. Unerwartet war, dass jede untersuchte Transformante stets dasselbe Bankfragment für den entsprechenden Leseraster aufwies. Bioinformatische Untersuchungen der Aminosäuresequenzen von *ORF19.6776* (*GCD2*), *ORF19.2366* und *ORF19.6729* (*TIP120*) zeigten keine bekannten Sequenzmotive innerhalb der zu den Bankfragmenten homologen Bereiche. Mit Ausnahme von *TIP120* ist keines dieser Gene in *C. albicans* bisher

charakterisiert worden, jedoch ist die Funktion einiger homologer Gene bekannt. Die homologen Gene für *GCD2* kodieren in *S. cerevisiae* (*GCD2*) und *S. pombe* (*tif224*) für die Delta-Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors eIF2B. Für *S. cerevisiae* ist ferner gezeigt worden, dass *GCD2* als Delta-Untereinheit des heptameren „guanine-nucleotide exchange factor“ (GEF) eIF2B fungiert (Reid *et al.*, 2012). *TIP120* kodiert in *C. albicans* für einen regulierenden Faktor des SCF-Komplexes (Sela *et al.*, 2011). Es ist das Homolog des humanen *CAND1* („Cullin-Associated Nedd8-Dissociated“), welches ebenfalls in der Regulation solcher SCF-Komplexe involviert ist. Im Falle von *ORF19.2366* gibt es keine Informationen über die Funktion in *C. albicans* oder in anderen Organismen. Bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenz (www.candidagenome.org) zeigen ein konserviertes Sequenzmotiv (TF_OSM-Domäne) im C-terminalen Bereich des Proteins, welches in der Aktivierung der Transkription glykolytischer Enzyme beteiligt ist und unter osmotischem Stress induziert wird (Haw *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde über das Programm „NLS-Mapper“ (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>) ein potenzielles Kernlokalisierungssignal im C-terminalen Bereich der AS von *ORF19.2366* identifiziert. Für alle diese drei hypothetischen Interaktionspartner von Psg1 konnten mit dem Programm www.ubpred.org einige potenzielle Ubiquitinierungsstellen innerhalb ihrer Aminosäuresequenzen ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

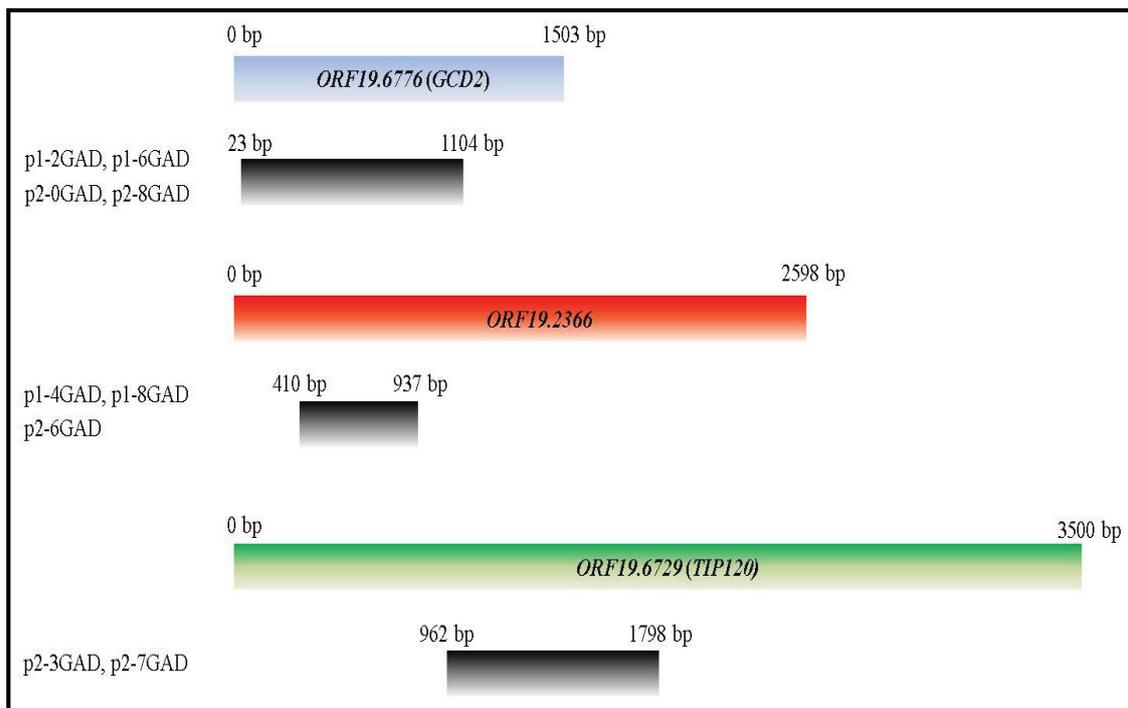


Abb. 3.34: Darstellung der ermittelten Leseraster und homologe Bereiche der Bankfragmente
Unter die ermittelten Leseraster *ORF19.6776* (blau), *ORF19.2366* (rot) und *ORF19.6729* (grün) wurden jeweils durch graue Balken dargestellt, die homologen Bereiche der genomischen Bankfragmente angezeigt. Die Position der grauen Balken unter dem jeweiligen Leseraster entspricht dem homologen Bereich des aus dem Plasmid sequenzierten Bankfragments. Daneben sind die Namen der Bankplasmide aufgelistet, deren Sequenzierung eine solche homologe Sequenz ergab.

Da die ermittelten Bankfragmente, mit Ausnahme von *GCD2*, jeweils nur einen kleinen Teil des Gens enthalten, konnte der Interaktionsbereich mit Psg1 bei *TIP120* auf den Bereich zwischen den Basenpaaren 962 und 1798 (Aminosäuren: 321 bis 599) eingegrenzt werden.

Bei *ORF19.2366* beläuft sich der Interaktionsbereich zwischen den Basenpaaren 410 und 937 (Aminosäuren: 137 bis 312). Im Falle von *GCD2* sind die Bankfragmente fast so groß wie das gesamte Gen und erstrecken sich von Position 23 bp bis 1104 bp 1798 (Aminosäuren: 8 bis 368).

3.8.3 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Um die Interaktion von Psg1 mit den Bankfragmenten zu quantifizieren, wurde ein ONPG-Test durchgeführt. Hierfür wurden die mit den Bankplasmiden und Plasmid pBD-Psg1 retransformierten Hefestämme verwendet, deren Bankfragmente anhand der Sequenzierung einem Leseraster zugeordnet werden konnten. Im Falle einer Interaktion zwischen dem Genprodukt des Bankfragments mit dem Psg1::BD-Fusionsprotein wird ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) durch die exprimierte β -Galaktosidase in Galaktose und *ortho*-Nitrophenol umgewandelt, das photometrisch bei 420 nm bestimmt werden kann. In Abb. 3.35 sind die Ergebnisse des ONPG-Tests in Miller-Units abgebildet.

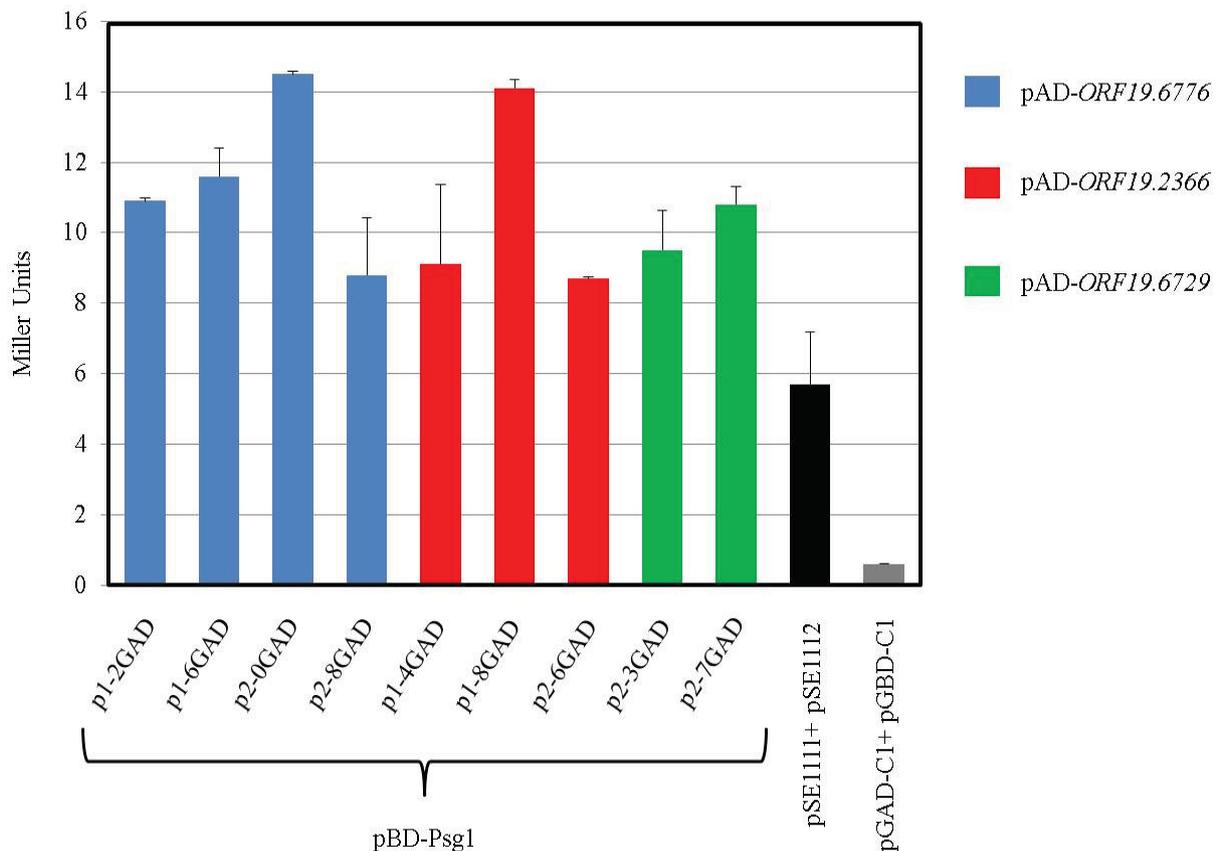


Abb. 3.35: ONPG-Test der retransformierten Stämme

Jeweils zwei der mit dem Plasmid pBD-Psg1 und dem Bankplasmid retransformierten Hefestämme wurden in SD-leu-trp Medium angezogen und auf ihre β -Galaktosidase-Aktivität hin untersucht. Die Balken zeigen die Mittelwerte in Miller-Units an. Als Positivkontrolle fungierte ein Hefestamm mit den Plasmiden pSE1112 (AD::*SNIF4*) und pSE1111 (BD::*SNIF1*). Als Negativkontrolle diente der mit den jeweiligen Leerplasmiden (pGAD-C1 und pGBD-C1) transformierte Hefestamm pPJ69-4A.

Für Transformanten mit den Bankplasmiden p1-2GAD, p1-6GAD, p2-0GAD und p2-8GAD, welche ein Fragment des *GCD2*-Gens (*ORF19.6776*) trugen, konnten im ONPG-Test Werte zwischen 14,5 und 8,3 Miller-Units ermittelt werden. Drei Transformanten enthielten die Bankplasmide p1-4GAD, p1-8GAD und p2-6GAD, welche Fragmente des nicht

charakterisierten *ORF19.2366* trugen. Diese Transformanten zeigten beim ONPG-Test Werte zwischen 14,1 und 8,3 Miller-Units. Zwei der Transformanten mit den Bankplasmiden p2-3GAD und p2-7GAD trugen Fragmente des Gens *TIP120* (*ORF19.6729*). Für diese Transformanten konnten im ONPG-Test die Werte von 9,5 und 10,3 Miller-Units ermittelt werden. Alle getesteten Transformanten wiesen einen höheren Wert als die Positivkontrolle (pSE111+ pSE112) auf, welche mit 5,7 Miller-Units die Protein-Protein Interaktion von Snf1 und Snf4 quantifiziert. Der basale Wert liegt, gemessen an den beiden Leerplasmiden pGAD-C1 und pGBD-C1 bei 0,6 Miller-Units. Ausgehend von der in Abb. 3.33 gezeigten Auxotrophie der Transformanten mit Bankplasmid und Leerplasmid gegenüber Adenin wurde auf einen zusätzlichen ONPG-Test dieser Stämme verzichtet. Diese Ergebnisse lassen eine Protein-Protein Interaktion von Psg1 mit den Genprodukten der Leseraster *ORF19.6776* (*GCD2*), *ORF19.2366* und *ORF19.6729* (*TIP120*) in *C. albicans* vermuten.

Fazit

Durch die Analysen mithilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems konnten die Leseraster für drei potenzielle Interaktionspartner von Psg1 identifiziert werden. Die Ergebnisse sprechen für eine starke Interaktion von Psg1 mit Gcd2, Tip120 und dem Genprodukt von *ORF19.2366*. Gcd2 ist in *S. cerevisiae* und *S. pombe* die Delta-Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors eIF2B, ein „Guanine nucleotide exchange factor“ (GEF). Tip120 ist ein regulierender Faktor des SCF-Komplexes in *C. albicans*. Das Genprodukt von *ORF19.2366* ist unbekannt.

4 Diskussion

Als einer der prominentesten Verursacher opportunistischer Infektionen des Menschen ist *C. albicans* aus medizinischer Sicht sehr relevant. Insbesondere bei immunsupprimierten Personen kann *C. albicans* zu lebensgefährlichen systemischen Infektionen führen (Eggimann *et al.*, 2003; Gudlaugsson *et al.*, 2003; Wey *et al.*, 1988). Ein wichtiges Kriterium für die Pathogenität von *C. albicans* ist seine hohe Anpassungsfähigkeit an seine Umwelt sowie die Fähigkeit zum Dimorphismus. Diese Fähigkeiten werden nicht zuletzt durch eine dynamische Zellwand und die darin enthaltenen *O*-glykosylierten Proteine gewährleistet (Ernst und Prill, 2001). Defekte in der *O*-Glykosylierung können in *C. albicans* Zellwanddefekte, gestörtes Hyphenwachstum oder auch Lethalität zur Folge haben (Prill *et al.*, 2005; Rouabhia *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* konnten Psg1 (*YIL001w*), wie auch Dom34 als Faktoren identifiziert werden, die an der *O*-Glykosylierung verschiedener Proteine in diesem Organismus beteiligt sind (Finck *et al.*, 1996; Wickert, 1998).

4.1 Sequenzanalyse von *PSG1* in *C. albicans*

Da *PSG1* bislang noch nicht charakterisiert wurde, befasst sich diese Arbeit mit der initialen Charakterisierung des Gens und der Analyse seiner Nukleotid- und Aminosäuresequenz (Abschnitt 3.1). *PSG1* ist auf dem Chromosom 7 als *ORF19.7010* annotiert. Das Gen ist stromaufwärts und stromabwärts umgeben von Genen, die in *C. albicans* weitgehend uncharakterisiert sind. Über das Programm „Candida Gene Order Browser“ (www.candidagenome.org) wurde ein Orthologiecluster erstellt, das zeigt, dass nicht nur *PSG1*, sondern auch ein Großteil der benachbarten Gene bei verwandten Pilzen konserviert sind. Den ersten Hinweis über eine eventuelle Funktion des Gens lieferten die Sequenzmotive („Ankyrin repeat“-Regionen und BTB-Domänen) im N-terminalen Bereich des Psg1-Proteins. Das Ortholog aus *S. pombe*, Btb3, besitzt dieselben Sequenzmotive, welche für die Funktion als Substratadaptor eines Cul3-Ubiquitinligasekomplexes essenziell sind. Die Homologie ist vor allem im Bereich dieser Sequenzmotive sehr hoch. Dies führte zu der Annahme, dass Btb3 aus *S. pombe* und Psg1 aus *C. albicans* ähnliche Funktionen haben könnten. Diese These wird durch Geyer *et al.* (2003) unterstützt, in der diskutiert wird, dass alle Gene mit BTB/POZ-Domänen als potenzielle Substratadaptoren für Cul3-Ubiquitinligasen fungieren können. Ferner konnte gezeigt werden, dass in *S. pombe* alle BTB-Proteine (Btb1, Btb2 und Btb3) einen Komplex mit Cul3 und der RING-Ubiquitinligase Rbx1 eingehen. Bei *S. cerevisiae* konnte bisher nur ein Gen mit solchen Sequenzmotiven identifiziert werden. Es handelt sich dabei um *YIL001w*, das homologe Gen zu *PSG1*. In *C. albicans* besitzt neben *PSG1* das annotierte Gen *ORF19.7574* ebenfalls eine BTB-Domäne. Dieser ORF gilt als uncharakterisiert und wird auf der *Candida* Genom-Datenbank (www.candidagenome.org) als homologes Gen zu Btb1 aus *S. pombe* beschrieben, dessen Funktion allerdings nicht geklärt ist. Weiterhin ist die Sequenzidentität der Aminosäuresequenz des translatierten Gens (*ORF19.7574*) zur Psg1-Proteinsequenz mit 3 % sehr gering (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurden mithilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems drei potenzielle Interaktionspartner/Zielproteine (Gcd2, Tip120 und das Genprodukt des *ORF19.2366*) von Psg1 identifiziert, deren Aminosäuresequenzen mit mittlerer- bis hoher Wahrscheinlichkeit potenzielle Ubiquitinierungsstellen aufweisen (ermittelt über www.ubpred.org; Daten nicht gezeigt). Interessanterweise besitzen die Aminosäuresequenzen von Pmt1, Pmt2 und Pmt4 ebenfalls Lysine, die mit mittlerer- bis hoher Wahrscheinlichkeit ubiquitiniert werden (Daten nicht gezeigt). Da für die Gene *PMT1* und für *PMT4* innerhalb dieser Arbeit eine genetische Interaktion nachgewiesen werden konnte, ist daher auch möglich, dass ihre Genprodukte durch Psg1 erkannt und ubiquitiniert werden. Weiterhin konnten Geyer *et al.* (2003) zeigen, dass Btb3 selbst in *S. pombe* ein Substrat für den Cul3-basierten Ubiquitinligasekomplex ist. Btb3 wird vermutlich nach einiger Zeit innerhalb dieses Multiproteinkomplexes selbst polyubiquitiniert und im Anschluss abgebaut. Ein Vergleich von potenziellen Ubiquitinierungsstellen zeigte, dass Btb3 aus *S. pombe* sowie das Genprodukt des Gens *Cd36_70970* aus *C. dublinensis* und Psg1 aus *C. albicans* an ähnlichen Positionen solche Ubiquitinierungsstellen aufweisen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Psg1-Proteinsequenz nach potenziellen Sumoylierungsstellen hin untersucht. SUMO ist Ubiquitin sehr ähnlich und kann als molekularer Schalter dienen. Somit wäre es auch möglich, dass Psg1 sumoyliert wird und dieses die Funktion des Proteins beeinflusst. Eine starke Regulation von potenziellen Substratadaptoren ist sinnvoll, da ein ständig-aktiver E3 Ubiquitinligase-Komplex auch einen permanenten Abbau von Zielproteinen zur Folge hätte (Bosu und Kipreos, 2008).

Das Laufverhalten eines mit dem HA-Epitop markierten Psg1-Protein in der SDS-PAGE zeigte Abschnitt 3.3. Hier lief das Epitop-markierte Psg1-Protein bei ca. 80 kDa und nicht, wie anhand seiner theoretischen molekularen Masse erwartet, bei 74 kDa. Diese erhöhte molekulare Masse könnte einerseits durch abnormales Laufverhalten, andererseits durch eine posttranslationale Modifikation, wie zum Beispiel Sumoylierung, Ubiquitinierung oder Phosphorylierung zustande kommen, da Psg1 ein cytoplasmatisches Protein ist und keinerlei *N*- oder *O*-Glykosylierungsstellen aufweist. Bisher konnten in *C. albicans* nur einzelne Komponenten eines SCF-Komplexes (Skp1-Cullin/Cdc53-F-Box-Protein) charakterisiert werden (Bosu und Kipreos, 2008; Sela *et al.*, 2011). Komponenten eines Cul3-CRL-Komplexes mit BTB-Proteinen, die hier als Substratadaptoren wie Btb3 in *S. pombe* dienen, konnten nicht beschrieben werden. Allerdings existiert in *C. albicans* mit *ORF19.7497* ein homologes Gen zum *CUL3*-Gen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae*. Ferner konnte in Abschnitt 3.8 gezeigt werden, dass Psg1 mit einem Protein-Fragment des Tip120-Proteins interagiert. Tip120 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität des SCF-Komplexes in *C. albicans* und könnte auch für andere Ubiquitinligase-Komplexe eine regulatorische Funktion inne haben.

Anhand der charakteristischen BTB-Domänen und der Homologie zum Btb3-Protein aus *S. pombe* ist somit wahrscheinlich, dass Psg1 in *C. albicans* ebenfalls als Substratadaptor für einen bisher nicht charakterisierten Cul3-basierten Ubiquitinligase-Komplex fungiert.

4.2 Phänotypen der *psg1*-Mutante

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *psg1*-Disruption in *C. albicans* zu nachweisbaren Phänotypen führt. Ferner konnten durch die Plasmid-basierte Expression von *PSG1* alle mutanten Phänotypen ganz oder partiell komplementiert werden. Die generelle Fitness der Mutanten scheint durch die Disruption nicht beeinträchtigt zu werden, da keine Unterschiede im Wachstum im Vergleich zu Wildtypstämmen, auf festem und flüssigem Vollmedium, beobachtet wurden. Andererseits führen Disruptionen im *PSG1*-Gen zu einem gestörten Hyphenwachstum auf Festmedium. Auch wenn diverse Gen-Disruptionen in *C. albicans* einen solchen Phänotyp aufweisen, so ist dieser doch gemeinsam mit den Phänotypen von Mutanten fast aller *Pmt*-Isoformen. Interessanterweise ist dieser Defekt-Phänotyp bei *psg1*-Disruptionen nicht in Flüssigmedium unter hypheninduzierenden Bedingungen detektierbar, was auch Prill (2005) für die *pmt1*-Mutante und für heterozygote *PMT2/Δpmt2*-Mutanten zeigte. Als Gründe für dieses gestörte Hyphenwachstum einiger *pmt*-Mutanten wurden Defekte in strukturellen Komponenten, Unterschiede in der Zellwandkomposition und Störung von Signalwegen durch Hypoglykosylierung involvierter Proteine genannt (Prill *et al.*, 2005). Ferner unterliegt der morphologische Wechsel zwischen Hefe und Hyphenform von *C. albicans* einem komplexen Zusammenspiel externer und interner Faktoren (Whiteway und Bachewich, 2007), welches durchaus partiell durch die Folgen einer *psg1*-Disruption gestört werden kann. Dass Psg1 als cytoplasmatisches Protein einen direkten Einfluss auf das Hyphenwachstum von *C. albicans* hat, ist durchaus möglich. So könnte Psg1 in seiner Funktion in Signalkaskaden involviert sein, die möglicherweise auch das Hyphenwachstum beeinflussen können. Zudem zeigten Sela *et al.* (2011), dass SCF-vermittelte Proteindegradierung in *C. albicans* durchaus eine Rolle in der Morphogenese des Pilzes spielt. Deletionen in Komponenten des SCF-Komplexes (*cdc53*-Mutanten, *cdc4*-Mutanten und *grr1*-Mutanten) führen oftmals zu einem abnormen Hyphenwachstum und anderen morphologischen Defekten der Zellen. Ausgehend von der Annahme, dass es auch in *C. albicans* einen Cul3-basierten Ubiquitinligase-Komplex mit Psg1 als Substratadaptor gibt (*ORF19.7497* kodiert für ein *CUL3*-homologes Gen), würden bei einer *psg1*-Disruption, ähnlich einer Disruption der F-Box-Proteine (*CDC4*, *GRR1*) im SCF-Komplex, die Zielproteine von Psg1 nicht länger ubiquitiniert werden. Dies könnte dann unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle haben, wie sich anhand der ermittelten Phänotypen der *psg1*-Mutante aus Abschnitt 3.2 zeigte.

Ein weiterer Phänotyp der *psg1*-Mutante zeigte sich in einer hohen Sensitivität dieser Mutante gegenüber Tunicamycin. Tunicamycin stört die *N*-Glykosylierung und verursacht dadurch eine erhöhte Anzahl an ungefalteten Proteinen und somit ER-Stress für die Zelle. Eine Sensitivität gegenüber Tunicamycin ist typisch für Mutanten mit defekter *N*-Glykosylierung, wurde aber auch für *pmt1*-Mutanten mit defekter *O*-Glykosylierung nachgewiesen. Für den *PMT1*-Transkriptspiegel ist bekannt, dass er bei Behandlung der Zellen mit Tunicamycin ansteigt (Cantero und Ernst, 2011). Es konnte in Abschnitt 3.5 gezeigt werden, dass der *PSG1*-Transkriptspiegel in der Zelle unter Einfluss von Tunicamycin um das Doppelte ansteigt. Dies lässt vermuten, dass in einer *psg1*-Mutante die *N*-Glykosylierung gestört, die Zellwand geschwächt, oder ein genereller ER-Stress vorhanden sein könnte. Dem steht jedoch

entgegen, dass Suc2, als Substrat für die *N*-Glykosylierung, kein verändertes Laufverhalten in einer *psg1*-Mutante zeigt (Abschnitt: 3.6). Gegen einen erhöhten ER-Stress in der *psg1*-Mutante spricht die negative Regulation des *KAR2*-Gens. Dieses Gen spielt in *C. albicans* eine Rolle bei der Translokation von Proteinen in das ER und fungiert dort als Chaperon. Im Falle von ER-Stress wäre mit der Aktivierung des UPR-Weges eine Erhöhung des *KAR2*-Transkripts in der Zelle zu erwarten gewesen, wie dies im Falle einer Mutation im *PMT1*-Gen zu beobachten war (Cantero *et al.*, 2007). Hingegen ist, aufgrund der Sensitivität gegenüber Caspofungin eine Schwächung der Zellwand in einer *psg1*-Mutante wahrscheinlich. Ferner zeigte sich in den Abschnitten 3.5 und 3.7, dass der *PMT1*-Transkriptspiegel in der *psg1*-Mutante erniedrigt ist. Dies könnte neben der Abwesenheit des *PSG1*-Transkripts ein weiterer Grund für die erhöhte Sensitivität der *psg1*-Mutante gegenüber Tunicamycin sein.

Im Vergleich zu den *pmt*-Mutanten verhält sich eine *psg1*-Mutante unter Einfluss von Kongorot und Caspofungin gegensätzlich. Alle *pmt*-Mutanten weisen gegenüber Caspofungin keine Sensitivität und im Falle einer *pmt1*-Mutante sogar eine erhöhte Resistenz auf. Gegenüber Kongorot zeigten sich *pmt1*-Mutanten und *PMT2/Δpmt2*-Mutanten sensitiv (Prill *et al.*, 2005). Zwar sind *psg1*-Mutanten nicht sensitiv gegenüber Kongorot, jedoch konnte in dieser Arbeit eine hohe Sensitivität der *psg1*-Mutante gegenüber Caspofungin festgestellt werden (Abschnitt 3.2). Wie schon bei Anwesenheit von Tunicamycin reagiert die Wildtypzelle auch auf die Anwesenheit von Kongorot mit einer Erhöhung des *PSG1*-Transkripts. Es ist möglich, dass Psg1 indirekt eine Rolle in der Regeneration der Zellwand haben könnte. Zudem konnte in Abschnitt 3.7 für die *psg1*-Mutante gezeigt werden, dass der Transkriptspiegel der Zellwandsensor-Kinase *CHK1* und die Transkriptspiegel von sechs *PGA*-Genen (*PGA42*, *PGA22*, *PGA56*, *PGA13*, *PGA30*, *PGA63*) positiv reguliert waren. Die erhöhte Expression von *CHK1* in einer *psg1*-Mutante lässt auf einen veränderten Mannan-Anteil in der Zellwand schließen (Klippel *et al.*, 2010). Die erhöhte Expression der *PGA*-Gene spricht ebenfalls für eine veränderte Zellwand-Komposition, da einigen dieser Gene eine Rolle in der Regeneration der Zellwand zugesprochen wird. Psg1, als Substratadaptor für Ubiquitinligasen, könnte eine Rolle in Signalwegen haben, die in der Komposition der Zellwand involviert sind. Dabei ist es möglich, dass mithilfe von Psg1 potenzielle Zielproteine nicht nur für den proteasomalen Abbau markiert, sondern auch in ihrer Aktivität verändert werden können.

Ein weiterer Phänotyp den die *psg1*-Mutante mit denen einer *pmt*-Mutante gemeinsam hat, ist die Färbung von Kolonien durch Phloxin B. Dieser Phänotyp konnte durch Prill *et al.*, (2005) bei einer heterozygoten *PMT2/Δpmt2*-Mutante nachgewiesen werden und basiert vermutlich auf einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran. Die in dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen zeigten im Falle einer *psg1*-Mutante eine negative Regulation von sieben Genen, welche eine Rolle in der Membran-Organisation spielen. Unter diesen Genen sind auch *ERG3*, *ERG5* und *ERG11*, welche eine Rolle in der Ergosterol-Biosynthese spielen. Insgesamt konnten sieben Gene detektiert werden (*ERG10*, *ARE2*, *ERG11*, *ERG9*, *ERG5*, *ERG3*, *NCPI1*), die in irgendeiner Weise eine Rolle in der Synthese von Ergosterol spielen und im Wildtyp durch Psg1 induziert werden (negative Regulation in der *psg1*-Mutante). Wenn durch die Disruption von *PSG1* in der Zelle weniger Ergosterol synthetisiert werden würde, so könnte dies auch ein Grund für eine erhöhte Membran-Permeabilität des Pilzes und somit

auch für die Färbung der Kolonien von *psg1*-Mutanten in Phloxin B-haltigem Medium sein. Ein weiteres Indiz für einen Mangel an Ergosterol der *psg1*-Mutante könnte die in Abschnitt 3.7 gezeigte negative Regulation von *FAD2* sein. *Fad2* ist eine $\Delta 12$ -Fettsäure-Desaturase, welche in der Synthese von Linolsäure involviert ist. Linolsäure ist eine 2-fach ungesättigte Fettsäure und in Phospholipiden eine der Hauptkomponenten der fungalen Zellmembran. Des Weiteren war auch ein starker Anstieg des *OLE2*-Transkripts in der *psg1*-Mutante zu beobachten. *Ole2* ist vermutlich als Fettsäure-Desaturase, in der Prostaglandin-Synthese und in der Synthese von ungesättigten Fettsäuren beteiligt (Krishnamurthy *et al.*, 2004; Erb-Downward und Noverr, 2007). Ferner zeigten die DNA-Microarray-Analysen (Abschnitt: 3.7), dass eine Reihe von Genen (*CIP1*, *HSP21*, *DOA4*), die in der Antwort auf oxidativen Stress involviert sind, in *psg1*-Mutanten positiv reguliert waren. Ein erhöhter oxidativer Stress in *psg1*-Mutanten könnte ebenfalls einer verminderten Ergosterol-Synthese und der vermutlich daraus resultierenden erhöhten Membranfluidität zugrunde liegen. Ferner sind vier Gene (*RAD10*, *RAD14*, *OGG1*, *PMS1*) teils stark positiv reguliert, die in den Prozessen der DNA-Reparatur involviert sind. Die positive Regulation von DNA-Reparatur-Genen könnte durch die verstärkte Produktion von ROS (reactive oxygen species), aufgrund des vermutlich erhöhten oxidativen Stresses in der *psg1*-Mutante, zurückzuführen sein.

Zudem zeigten Untersuchungen zur Auswirkung einer systemischen Infektion im Mausmodell, dass die *psg1*-Mutante völlig avirulent ist.

4.2.1 *psg1*-Mutanten beeinflussen indirekt die Prozesse der O-Glykosylierung, führen jedoch nicht zur Hypoglykosylierung einiger Zielproteine

Obwohl das *Psg1*-Protein strukturell keine Gemeinsamkeiten mit den Protein *O*-Mannosyltransferasen hat, weisen die Phänotypen mutanter Stämme dennoch Gemeinsamkeiten auf. Daher wurde ferner in dieser Arbeit untersucht, ob eine *psg1*-Disruption auch zu hypoglykosylierten Proteinen führt. Hierfür wurden mit *Suc2* aus *S. cerevisiae* Substrate für die *N*-Glykosylierung und mit *Msb2* sowie *Kre9* (persönliche Mitteilung M. Juchimiuk) Substrate für die *O*-Glykosylierung auf ihr Laufverhalten in einem SDS-PAGE getestet (Abschnitt 3.6). Eine Disruption im *PSG1*-Gen hat weder für ein Substrat der *N*-Glykosylierung, noch für ein Substrat der *O*-Glykosylierung sichtbare Auswirkungen in Bezug auf das Laufverhalten dieser Substrate. Interessant ist, dass die Invertase (*Suc2*) als Substrat für die *N*-Glykosylierung im Falle einer *pmt1*-Mutante stark hyperglykosyliert wurde, da bisher noch nicht gezeigt wurde, dass die Disruption von *PMT1* direkt die posttranslationale Modifikation von Substraten der *N*-Glykosylierung beeinflusst. Scheinbar versucht die Zelle Defekte in der *O*-Glykosylierung mittels verstärkter *N*-Glykosylierung zu kompensieren. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen *N*- und *O*-Glykosylierung, die Schmidt (2007) schon anhand einer vermuteten Interaktion von *Alg9* (Mannosyltransferase für die *N*-Glykosylierung) und *Pmt2* äußerte. Cantero und Ernst (2011) konnten zeigen, dass im Falle einer gestörten *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin der *PMT1*-Transkriptspiegel ansteigt. Dies konnte in dieser Arbeit auch nochmals für das *PMT1*-Transkript und auch für das *PSG1*-Transkript bestätigt werden (Abschnitt: 3.5). Die Kompensation von gestörter *N*-Glykosylierung durch verstärkte Aktivierung der Gene für die *O*-Glykosylierung (*PMT1*) ist durchaus denkbar. Ferner wurde durch qPCR und Microarray-Experimente gezeigt, dass der *PMT1*-Transkriptspiegel bei einer *psg1*-Disruption sowie der

PSG1-Transkriptspiegel bei einer *pmt1*-Disruption, jeweils um fast die Hälfte absinken. Aufgrund der in den Abschnitten 3.5 und 3.7 gezeigten wechselseitigen Einflussnahme der *PMT1*- und *PSG1*-Transkriptspiegel ist zumindest ein indirekter Einfluss von *PSG1* bei der Regulation der in der *O*-Glykosylierung beteiligten Gene zu vermuten.

4.3 Psg1 ist gleichmäßig im Bereich um den Zellkern lokalisiert und akkumuliert vereinzelt an der Zellmembran

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein endogenes *PSG1*-Allel C-terminal mit der Sequenz für ein HA-Epitop fusioniert und auf seine Funktion getestet (Abschnitt: 3.3). Wie sich zeigte ist das Fusionsprotein funktionell und durch Immunoblot-Analysen detektierbar. Hilbig (2010) konnte für *C. albicans* eine homogene Verteilung von Dom34 in der Zelle zeigen. Ausgehend von dieser gleichen Verteilung in der Zelle konnten anhand der Lokalisation von Dom34 nicht wirklich neue Rückschlüsse über eine eventuelle Funktion des Proteins gemacht werden. Im Gegensatz hierzu konnte das mit dem HA-Epitop markierte Psg1-Protein vor allem im Bereich des ER und dem Zellkern herum lokalisiert werden. Obwohl im Abschnitt 3.4 eine leichte Kolokalisation vom Signal des Psg1-Proteins mit dem DAPI-Signal des Nucleus gezeigt werden konnte, ist die Anwesenheit von Psg1 im Zellkern fraglich. Die Proteinsequenz von Psg1 weist keine Kernlokalisierungssequenz auf und könnte so nur mithilfe der Bindung an ein anderes Protein in den Kern importiert werden. Eine Lokalisation des Proteins in Nähe des ER ist dagegen schlüssig. So werden beispielsweise beim UPR-Weg („unfolded protein-response“) falsch- oder ungefaltete Proteine aus dem ER-Lumen ins Cytosol herausgeschleust, um im Anschluss polyubiquitiniert und abgebaut zu werden (ERAD) (Helenius und Aebi, 2001). Ausgehend von der Funktion des homologen Proteins Btb3 aus *S. pombe* als Substratadaptor von Cul3-Ubiquitinligasen bekräftigt die Lokalisation im Bereich des ER die Vermutung einer ebensolchen Funktion von Psg1. In diesem Falle wäre Psg1 vermutlich mit einer bisher für *C. albicans* unbekanntem Cul3-Ubiquitinligase assoziiert und würde dort die Substratspezifität des E3 Ubiquitinligase-Komplexes gewährleisten. Genau wie Pmt1 konnte auch das Psg1-Protein in *C. albicans* am perinukleären ER lokalisiert werden (Schmidt, 2007). Zudem konnte, wie dies schon für Pmt4 in *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, das Psg1-Protein neben der Lokalisation am perinukleären ER, auch im kortikalen ER nachgewiesen werden (Lommel und Strahl, 2009). Hierbei handelt es sich nicht um eine gleiche Verteilung, sondern eher um eine „fleckige“ Akkumulation des Proteins. Ausgehend von der vermuteten Funktion als Substratadaptor für E3-Ubiquitinligasen wäre es denkbar, dass Psg1 auch eine Rolle bei der Ubiquitin-vermittelten Internalisierung von Proteinen der Zellmembran spielen könnte (Raiborg und Stenmark, 2002). Membranständige Zielproteine wie Rezeptoren und Ionenkanäle könnten von einem E3 Ubiquitinligase-Komplex, dem vermutlich Psg1 angehört, vom Cytosol aus monoubiquitiniert werden. Dieses würde dann zur endozytischen Internalisierung des Membranareals samt Zielprotein führen. Psg1 wäre dann mit seiner E3 Ubiquitinligase außerhalb der Vesikel an den Zielproteinen in der Vesikel-Membran gebunden und detektierbar (Tanno und Komada, 2013). Dieser Prozess der Autophagozytose ist auch bei einer Anhäufung ungefalteter und dadurch aggregierender Proteine im ER-Lumen möglich (Kruse *et al.*, 2006; Ishida und Nagata 2009; Ishida *et al.*, 2009). Eine Beteiligung von Psg1 an den Prozessen des Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbaus würde die Lokalisation

von Psg1 um das perinukleäre und kortikale ER herum sowie die teilweise Akkumulation des Proteins in Vesikeln erklären.

4.4 Genetische Interaktion von *PSG1*, *PMT1* und *DOM34*

Wickert (1998) konnte zeigen, dass durch die Expression von *DOM34* oder *YIL001w* in *S. cerevisiae* die Resistenz gegenüber dem K1-Killertoxin in *pmt1 dom34*-Doppelmutanten supprimiert werden kann. In dieser Arbeit wurde getestet, ob eine Überexpression des homologen Gens in *C. albicans* (*PSG1*) die Phänotypen von *pmt*-Mutanten supprimieren kann. Eine solche Suppression konnte durch die Expression von *DOM34* anhand der Hypersensitivität von *pmt1*-Mutanten gegenüber Hygromycin B bereits gezeigt werden (Hilbig, 2010). Hier wurde beobachtet, dass eine *PSG1*-Überexpression zur Suppression der Hypersensitivität gegenüber Hygromycin B in *pmt1* und *pmt4*-Mutanten führt (Abschnitt 3.4). Ferner wurde gezeigt, dass die *pmt1*-Phänotypen einer ungewöhnlichen Kolonimorphologie und der Aggregation der Zellen in Flüssigkultur durch eine *PSG1*-Überexpression supprimiert werden. Daher zeigen *PSG1* und *PMT1* eine genetische Interaktion, die dadurch bestätigt wird, dass Inhibition von Pmt1 durch den Pmt1-Inhibitor zu einem verminderten Wachstum von *psg1*-Mutanten führt (Abschnitt: 3.2). Stämme mit einzelnen Disruptionen im *pmt1* oder im *psg1*-Gen zeigten dagegen normales Wachstum auf Festmedium bei 30 °C. Die Phänotypen der *pmt1* und *pmt4*-Mutanten wurden bereits ausführlich beschrieben (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005), jedoch wird über die Gründe für einige dieser Phänotypen bis heute spekuliert. Im Falle der Hypersensitivität einiger *pmt*-Mutanten (Prill *et al.*, 2005) gegenüber Hygromycin B wird angenommen, dass durch die mangelnde *O*-Glykosylierung eines „multi-drug-resistance“ (MDR)-Transporters weniger Aminoglykoside wie Hygromycin B aus der Zelle ausgeschleust werden (Sanglard *et al.*, 1997). Prill *et al.* (2005) vermuteten, dass die Sensitivität der *pmt*-Mutanten gegenüber Hygromycin B durch einen erleichterten Zugang des Aminoglykosids zu seinem Wirkungsort, der kleinen Untereinheit des Ribosoms, erleichtert wird. Für die Aggregation der Zellen untereinander und für die ungewöhnliche Kolonimorphologie der *pmt1*-Mutanten wurde von Timpel *et al.*, (1998) vermutet, dass eine unzureichende Glykosylierung von Zelloberflächen-Adhäsinen, wie beispielsweise Als1, der Grund für diese Phänotypen sein könnte. Ferner wurde durch Prill *et al.* (2005) die Möglichkeit des Funktionsverlustes durch unzureichende Mannosylierung einer Glukosidase in Betracht gezogen, was in einer unvollständigen Separation der Zellen bei der Zellteilung resultieren könnte. Aufgrund seiner Sequenz scheint Psg1 keine katalytische oder strukturgebende Funktion innerhalb der Zellwand zu haben und eine direkte Beteiligung an den Mechanismen der *O*-Glykosylierung oder der Translokation in das ER-Lumen ist fraglich. Daher stellt sich die Frage, wie eine Überexpression von *PSG1* zu einer Suppression der Phänotypen von *pmt*-Mutanten führen kann. Dass dies prinzipiell möglich ist, zeigte sich bereits am Beispiel der *pmt6*-Mutation, die durch Überexpression intrazellulärer Signalkomponenten supprimiert wurde (Timpel *et al.*, 2000).

Eine weitere Beobachtung in dieser Arbeit war, dass die Anwesenheit von Dom34 eine Voraussetzung ist, um den Phänotyp einer *pmt1*-Mutante durch die Überexpression von *PSG1* supprimieren zu können (Abschnitt: 3.4). Das Ausbleiben dieses Effekts im Falle einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante zeigt die genetische Interaktion von *PSG1* und *DOM34*. Die genaue

Rolle von Dom34 in *C. albicans* ist bis heute unklar, weswegen über die Ursachen dieses Effekts nur spekuliert werden kann. Dom34 begünstigt möglicherweise die Translation des *PMT1*-Transkripts und anderer Transkripte. Es ist denkbar, dass durch die Abwesenheit von Dom34 in einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante der Proteinspiegel anderer Gene, die für die Stressantwort bei einer erhöhten Anzahl falsch gefalteter Proteine eine Rolle spielen, absinkt und so die Überexpression von *PSG1* nicht mehr ausreicht, um die Folgen der defekten O-Glykosylierung abzupuffern.

4.5 Mögliche Funktionen von Psg1

Um Aussagen über eine mögliche Funktion von Psg1 in *C. albicans* treffen zu können, muss neben der Frage nach den Gründen für die Phänotypen der Mutante auch die Frage diskutiert werden, wie durch die Überexpression von *PSG1* der Phänotyp der *pmt1*- und *pmt4*-Mutante supprimiert werden kann. In diesem Abschnitt sollen zwei Hypothesen über eine mögliche Funktion von Psg1 im ER und im Cytoplasma aufgestellt werden. Dabei gehen beide Hypothesen davon aus, dass Psg1 aus *C. albicans*, wie auch Btb3 aus *S. bombe*, als Substratadaptor eines Cul3 Ubiquitinligasekomplexes fungiert. BTB-Proteine, wie Btb3 aus *S. pombe*, agieren als „substrate-recognition subunit“ oder Substratadaptoren der Cul3-Ubiquitinligase. Durch sie wird die Substraterkennung und die Substratspezifität solcher E3 Ubiquitinligasen gewährleistet (Xu *et al.*, 2003; Pintard *et al.*, 2003; Maezawa *et al.*, 2008; Bosu und Kipreos, 2008).

4.5.1 Psg1 beeinflusst Signalweg-Komponenten im Cytoplasma

Wie schon in Abschnitt 1.5 erwähnt, können Monoubiquitinierungen an Lysinresten einiger Proteine als molekularer Schalter fungieren. Eine solche Ubiquitinierung kann die Aktivität von Kinasen und anderen Enzymen beeinflussen oder zur Modulation von Chromosomen führen (Chen und Sun, 2009). Neben Zielproteinen, die von Psg1 erkannt und vom Ubiquitinligase-Komplex polyubiquitiniert werden, könnte die Aktivität einiger dieser Zielproteine auch durch alternative Ubiquitinierung reguliert werden. Einen Anhaltspunkt hierfür liefern die Gene *MDS3* und *CHK1*, deren Transkriptspiegel in der *psg1*-Mutante stark erhöht waren (Abschnitt: 3.7) und somit im Wildtyp durch Psg1 reprimiert werden. *Mds3* ist vermutlich ein Repressor des TOR-Signalweges in *C. albicans*, dessen Mutanten einen Defekt im filamentösen Wachstum zeigen, der durch Zugabe von Rapamycin supprimiert werden kann (Zacchi *et al.*, 2010). Über den TOR-Signalweg reagiert *C. albicans* auf Umweltsignale, reguliert das Wachstum sowie die Morphogenese des Pilzes und hat somit Einfluss auf die Ribosom-Biosynthese, die Morphologie, Translation sowie auf Autophagie-Prozesse. Dabei agiert *Mds3* vermutlich als Gerüstprotein und beeinflusst hauptsächlich die Morphogenese von *C. albicans* durch die negative Regulation des TOR-Signalweges (Zacchi *et al.*, 2010). In einer *psg1*-Mutante ist der *MDS3*-Transkriptspiegel um den 7-fachen Wert erhöht, was vermuten lässt, dass Komponenten des TOR Signalwegs durch Psg1 beeinflusst werden könnten. Weiterhin waren die Transkriptspiegel einiger Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, negativ reguliert, was ebenfalls einer Beeinflussung des TOR-Signalwegs zugrunde liegen könnte. Die negative Regulation einiger ribosomaler Proteine konnte auch in der *pmt1*-Mutante beobachtet werden (Cantero *et al.*, 2007). Weiterhin könnte der Einfluss von Psg1 auf den TOR-Signlaweg auch der anhand von Hefe Zwei-Hybrid Experimenten vermuteten

Interaktion mit Gcd2 (Abschnitt 3.8) zugrunde liegen. Hierdurch könnte die Aktivität der Translations-Initiation beeinflusst werden, was rückwirkend auch einen Einfluss auf Komponenten des TOR-Signalweges haben könnte (Zacchi *et al.*, 2010). *GCD2* kodiert in *C. albicans* vermutlich für die Delta-Untereinheit des heteropentameren „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) eIF2B. Dieser Multiproteinkomplex regeneriert den Translations-Initiationsfaktor eIF2 in seiner GDP-gebundenen Form zu eIF2-GTP und ermöglicht so eine erneute Initiation der Translation am 43S Prä-Initiationskomplex. In *S. cerevisiae* hat Gcd2 als Delta-Untereinheit von eIF2B eine regulatorische Funktion. Im Falle einer Interaktion zwischen Psg1 und Gcd2 könnte die Aktivität von Gcd2 durch Monoubiquitinierung verändert, oder das Protein durch Polyubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert werden. Ein weiteres positiv reguliertes Gen in der *psg1*-Mutante (3-fach erhöhter Transkriptspiegel) war *CHK1*, eine Zellwandsensor-Kinase die, wie in Abschnitt 4.4 schon erwähnt, eine Rolle bei der Regeneration der Zellwand spielt. Zudem sind in einer *pmt1*- sowie in einer *psg1*-Mutante einige *PGA*-Gene positiv reguliert, welche alle eine Rolle in der Zellwand-Regeneration haben. Die Erhöhung des *CHK1*-Transkriptspiegels in der Mutante und die Hinweise auf eine veränderte Zellwandzusammensetzung führen zu der Annahme, dass Psg1 auch in Signalwegen die Verantwortlich für die Integrität und Regeneration der Zellwand sind involviert sein könnte.

In einer *pmt1*-Mutante sind durch die gestörte *O*-Mannosylierung viele zelluläre Prozesse sowie die Integrität und Zusammensetzung der Zellwand betroffen. Zudem zeigen beide Mutanten (*psg1*- und *pmt1*-Mutante) eine gemeinsame Regulation von Genen, die involviert in der Zellwand-Regeneration und in der Proteinbiosynthese sind. Dies führt zu der Annahme, dass im Falle einer *PSG1*-Überexpression in einer *pmt1*-Mutante Signalwege beeinflusst werden könnten, in denen Chk1 und Mds3 involviert sind. Möglicherweise führt dies zu einer verstärkten Aktivierung oder Repression dieser Signalwege, wodurch die Phänotypen der *pmt1*-Mutante supprimiert werden. Die Suppression der Phänotypen einer *pmt1*-Mutante durch eine *PSG1*-Überexpression ist in einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante nicht möglich. Ein möglicher Grund, neben einem additiven Effekt durch die zusätzliche Disruption des *DOM34*-Gens wäre, dass Dom34 selbst in den durch Psg1 beeinflussten Signalwegen involviert ist und epistatisch zu Psg1 ist.

4.5.2 Psg1 als Komponente der Ubiquitinin-vermittelten Proteolyse „puffert“ die Folgen einer mangelhaften *O*-Glykosylierung in *pmt*-Mutanten am ER

Die mangelhafte *O*-Glykosylierung von Glykoproteinen hat oftmals deren erhöhte inkorrekte Faltung zur Folge (Braakman und Hebert, 2013). Aufgrund falsch gefalteter Proteine kommt es in der Zelle zur Aktivierung des UPR-Weges und zu einem erhöhten ER-Stress. Die zellulären Antworten auf diese Form von Stress sind sehr vielfältig (Schröder, 2007), umfassen jedoch oftmals eine Verlangsamung der Proteinbiosynthese am Translokton und ein Herausschleusen der missgefalteten Proteine aus dem ER mit anschließendem proteolytischen Abbau. Am Beispiel von Msb2 in *C. albicans* konnte ein in das umliegende Medium sezerniertes Protein nachgewiesen werden, welches durch Pmt1 *O*-mannosyliert wird (Szafranski-Schneider *et al.*, 2012); eine unterglykosylierte Form von Msb2 wurde im Medium von *pmt1*-Mutanten nachgewiesen. Hieraus folgt, dass selbst wenn im Zuge des UPR-Weges ein Teil des hypoglykosylierten Proteins proteolytisch abgebaut wird, dennoch

größere Mengen des hypoglykosylierten Proteins ins Medium sezerniert werden. Dies zeigt, dass hypoglykosylierte Proteine nicht zwangsläufig vollständig über den UPR-Weg abgebaut werden, sondern durchaus ihren Bestimmungsort erreichen können. Dies könnte neben Msb2 auch für andere Zielproteine von Pmt1 und für Pmt1 selbst zutreffen. Die Phänotypen von *pmt*-Mutanten könnten daher teilweise durch den Mangel korrekt gefalteter Proteine hervorgerufen werden, jedoch auch dem Wirken von unterglykosylierten Proteinen an ihren Zielorten zugrunde liegen. Am Beispiel von Flo11 in *S. cerevisiae* konnten z.B. Funktionsverlust und mangelnde Stabilität eines solchen Proteins durch Hypoglykosylierung gezeigt werden (Mahbuba *et al.*, 2012). Im Falle des humanen Insulinrezeptors kam es durch eine mangelnde *O*-Glykosylierung zu einer konstitutiven Kinase-Aktivität des Rezeptors (D'Alessandris *et al.*, 2004). Unter der Annahme, einige Phänotypen der *pmt*-Mutanten entstünden primär durch die Dysfunktion hypoglykosylierter Proteine und nicht allein aufgrund des Mangels an korrekt glykosylierten Proteinen, könnte auch der Effekt der Suppression dieser Phänotypen durch die Überexpression von *PSG1* erklärt werden. Als Substratadaptor eines Cul3 basierten Ubiquitinligase-Komplexes könnten einige Zielproteine von Psg1 ebenfalls durch Pmt1 und Pmt4 mannosyliert werden und somit auch Substrate dieser Mannosyltransferasen sein. Die Disruption in einer dieser Proteinmannosyltransferasen würde zu einer mangelnden *O*-Glykosylierung ihrer Zielproteine und somit zur Ausbildung der bekannten Phänotypen der *pmt*-Mutanten führen. Psg1 als Substratdaptor erkennt eventuell einige dieser hypoglykosylierten Proteine und vermittelt über seinen E3 Ubiquitinligase-Komplex deren proteasomalen Abbau. Im Falle einer *pmt1*-Mutante würden die verstärkt auftretenden hypoglykosylierten Proteine auch verstärkt über den UPR-Weg (Verstärkte Aktivierung des UPR-Weges in *pmt*-Mutanten) aus der Zelle geschleust werden. Durch die *PSG1*-Überexpression und der daraus resultierenden erhöhten Menge an Psg1-Protein würden diese hypoglykosylierten Proteine um das ER herum möglicherweise schneller gebunden, polyubiquitiniert und für den proteasomalen Abbau markiert werden. Die Anzahl an Proteinen mit fehlender *O*-Glykosylierung könnte sinken und der durch diese Proteine hervorgerufene Stress könnte abklingen. Das Fehlen dieser mannosylierten Proteine würde vermutlich von der Zelle durch Proteine mit redundanten Funktionen oder, wie beispielsweise im Falle von Zellwandproteinen, durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Zellwand kompensiert werden (Prill *et al.*, 2005). Zudem konnte Psg1 um das perinukleäre ER herum sowie am kortikalen ER lokalisiert werden, was diese Hypothese unterstützt.

In Abschnitt 3.4 wurde ebenfalls gezeigt, dass die Überexpression von *PSG1* keinen Einfluss auf die Phänotypen (Koloniemorphologie, Zellaggregation, Hygromycin B-Sensitivität) einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante hat. Folglich ist die Anwesenheit des *DOM34*-Genprodukts essenziell für den Suppressionseffekt einer *PSG1*-Überexpression in *pmt1*-Mutanten. Das Ausbleiben dieses Effektes im Falle einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante zeigt die genetische Interaktion von *PSG1* und *DOM34*. Die genaue Rolle von Dom34 in *C. albicans* ist bis heute unklar, weswegen über die Ursachen dieses Effektes nur spekuliert werden kann. Dom34 begünstigt möglicherweise die Translation des *PMT1*-Transkripts und anderer Transkripte. Es ist denkbar, dass durch die Abwesenheit von Dom34 in einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante der Proteinspiegel anderer Gene, die für die Stressantwort bei einer erhöhten Anzahl falsch gefalteter Proteine eine Rolle spielen, absinkt und so die Überexpression von *PSG1* nicht

mehr ausreicht um die Folgen der defekten *O*-Glykosylierung abzupuffern. Es wäre sogar möglich, dass Dom34 auch die Translation der anderen *PMT*-Transkripte beeinflusst. Es könnte sein, dass im Falle einer Deletion des *PMT1*-Gens die Translation der anderen *PMT*-Isoformen durch Bindung von Dom34 an das Transkript erhöht wird. Diese Regulation wäre im Falle einer *dom34 pmt1*-Doppelmutante nicht möglich.

Einen weiteren Beleg für die These, dass eine *PSG1*-Überexpression die Folgen einer defekter *O*-Glykosylierung „abpuffern“ kann, bilden die auftretenden Phänotypen bei einer *psg1*-Disruption. Einige dieser Phänotypen ähneln den Phänotypen verschiedener Glykosylierungsmutanten. Fehler in der *O*-Glykosylierung treten vermutlich gelegentlich auch ohne Disruption in einer der Proteinmannosyltransferasen auf. Wie bereits angemerkt, würden solche hypoglykosylierten Proteine über ERAD aus dem ER geschleust und teilweise von Psg1 erkannt werden. Im Falle einer Disruption von *psg1* würde der proteasomale Abbau dieser Proteine vermutlich beeinträchtigt werden, da einige Substrate für den proteasomalen Abbau nicht durch Psg1 erkannt werden würden. Diese gestörte Substraterkennung innerhalb der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse könnte zu einer erhöhten Menge an Proteinen in der Zelle führen, die eigentlich für den proteasomalen Abbau vorgesehen sind. Oftmals sind solche Proteine aufgrund von Schädigung, mangelhafter *O*-Mannosylierung oder überschrittener Halbwertszeit in ihrer Funktion beeinträchtigt. So könnte die Zelle beispielsweise durch den Verbleib von hypoglykosylierten Zellwand-Proteinen anfälliger gegenüber einigen Zellwand-schädigenden Substanzen werden, wie dies auch bei der *psg1*-Mutante gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.2). Durch den verstärkten Verbleib fehlerhafter Proteine in der Zelle könnte auch die mitochondriale Translation beeinflusst werden, was eventuell die negative Regulation der Gene *MRP4*, *MRPS9*, *MRP20*, *ORF19.989*, *RRNL* in *psg1*-Mutanten erklären würde (Vannuvel *et al.*, 2013). Die scheinbar erhöhte Menge an fehlerhaften Proteinen in einer *psg1*-Mutante führt offenbar nicht zu einem erhöhten ER-Stress, da Indikatoren für ER-Stress, wie beispielsweise das Gen *KAR2*, negativ oder nicht reguliert wurden. Allerdings sind einige Gene mit Funktionen in Ubiquitinligase-Komplexen (*HRT1*, *SAN1*, *ORF19.5438*, *ORF19.5752*) in einer *psg1*-Mutante positiv reguliert (Abschnitt 3.7), was auf eine erhöhte Aktivität von E3 Ubiquitinligase-Komplexen hinweist. Dies könnte eine Kompensation der Zelle für das Fehlen von Psg1 sein und würde zudem die These der erhöhten Menge fehlerhafter Proteine in einer *psg1*-Mutante unterstützen.

In Abb. 4.1 ist ein Modell aufgeführt, in dem die Funktionsweise von Psg1 veranschaulicht werden soll. Es zeigt, wie Psg1 als Substratadaptor eines Cul3-basierten Ubiquitinligase-Komplexes Zielproteine erkennt und falsch gefaltete Proteine, die über ERAD aus dem ER geschleust wurden, bindet. Mithilfe des Cul3-Ubiquitinligase-Komplexes kommt es zur Polyubiquitinierung der Zielproteine und zum Abbau im Proteasom. Es wird auch davon ausgegangen, dass sich die Zielproteine von Psg1 nicht nur auf unterglykosylierte und falsch gefaltete Proteine beschränken, die über ERAD aus dem ER geschleust wurden, sondern z. B. auch falsch gefaltete Proteine, die über den sekretorischen Pfad an ihren Bestimmungsort gelangen, umfassen. In dem Modell wurde auch die mögliche Interaktion von Psg1 mit Gcd2

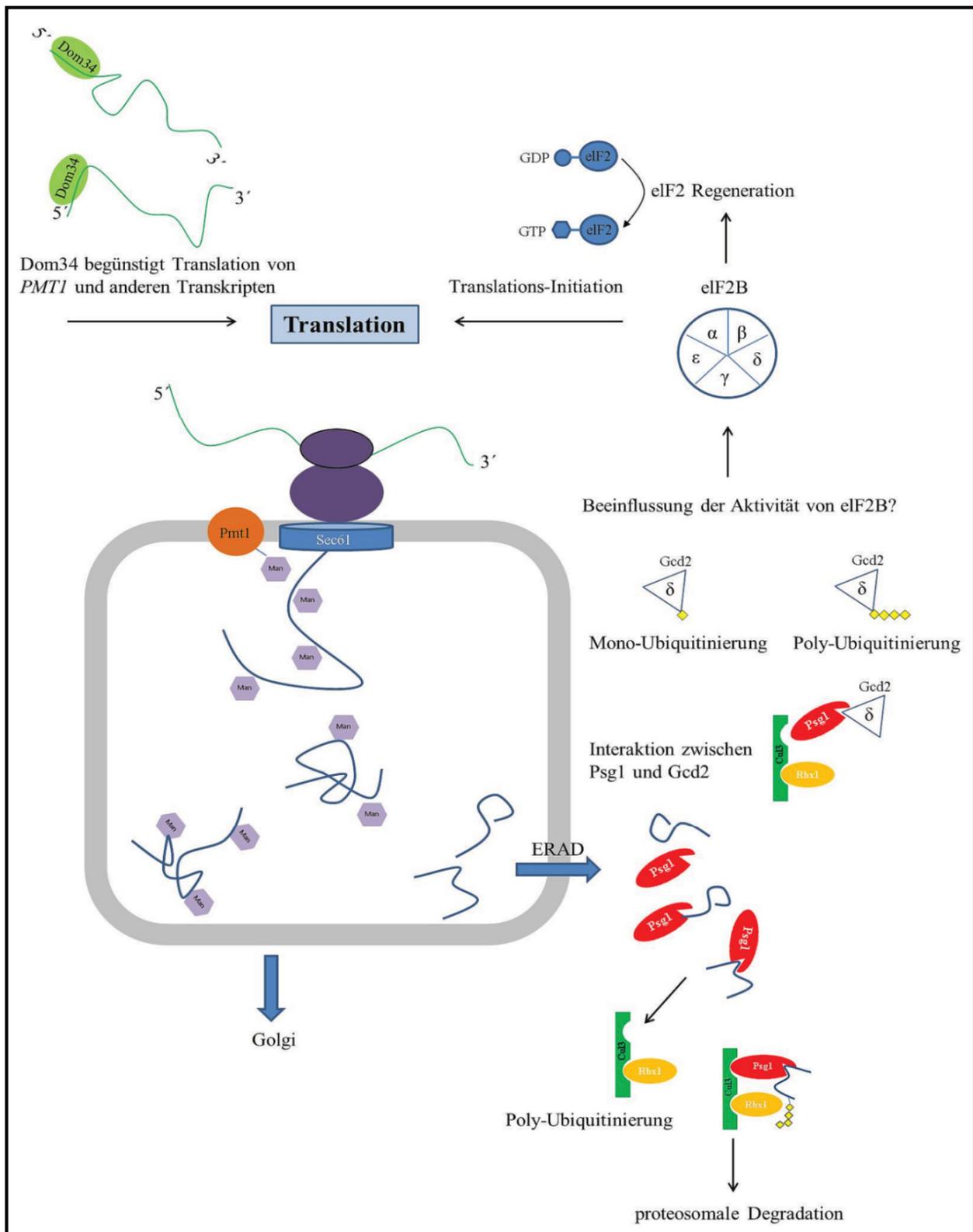


Abb. 4.1 Modell der möglichen Funktionen von Psg1 am ER

Synthese, kotranslationale Glykosylierung und Abbau eines sekretierten Proteins. Korrekt gefaltete Proteine gehen vom ER ins Golgi. Unglykosylierte und falsch gefaltete Proteine werden über ERAD aus dem ER-geschleust. Dort werden einige von ihnen durch Psg1 erkannt und mittels eines Cul3-Ubiquitinligase-Komplexes polyubiquitiniert, was zur Degradation im Proteasom führt. Neben einigen Proteinen, die das perinukleäre ER über ERAD verlassen, könnten auch Membranproteine im kortikalen ER oder cytosolische Proteine potenzielle Zielproteine von Psg1 sein. Ein möglicher Einfluss auf die Translation ist durch die Interaktion von Psg1 mit Gcd2 sowie durch die Bindung von Dom34 an Transkripte (z. B. *PMT1*) innerhalb ihrer untranslatierten Bereiche im Modell dargestellt.

berücksichtigt und es wurden einige hypothetische Möglichkeiten angedeutet, wie sich Ubiquitinierung oder Polyubiquitinierung von Gcd2 auf die Translation auswirken könnte. Zusätzlich wurde auch der Einfluss des Dom34-Proteins auf die Translation dargestellt. Nicht berücksichtigt in diesem Modell wurde die in Abschnitt 4.5.1 aufgestellte Hypothese, dass Psg1 einen Einfluss auf Komponenten des TOR-Signalwegs und auf Komponenten von Signalwegen, die Involviert in der Integrität und Regeneration der Zellwand sind, haben könnte.

5. Zusammenfassung

O-Mannosylierung durch die fünf Isoformen der Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) beeinflusst die Oberflächeneigenschaften und Virulenz des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. In früheren Arbeiten waren die Proteine Dom34 und Yil001w als potenzielle Faktoren der *O*-Mannosylierung in *S. cerevisiae* identifiziert wurden. In dieser Arbeit wurde das zu *YIL001w*-homologe Gen *ORF19.7010* aus *C. albicans*, hier bezeichnet als *PSG1*, charakterisiert. *PSG1* ist eines von insgesamt zwei Genen in *C. albicans*, deren Sequenzen BTB-Domänen aufweisen und daher potenzielle Substratadaptoren von Cul3-basierten Ubiquitinligase-Komplexen darstellen.

In *C. albicans* wurden zwei unabhängige *psg1*-Deletionsmutanten konstruiert und auf ihre Phänotypen hin untersucht. Die Deletion des *PSG1*-Gens führte zur Ausbildung verschiedener Phänotypen, wie gestörtes Hyphenwachstum auf Festmedien und Sensitivität gegenüber Inhibitoren einschließlich Tunicamycin, Clotrimazol, Caspofungin und dem Pmt1-Inhibitor. Außerdem war eine homozygote *psg1*-Mutante vollständig avirulent im Mausmodell einer systemischen *C. albicans*-Infektion. Die Disruption des *PSG1*-Gens blockierte jedoch nicht generell die *N*- und *O*-Glykosylierung von sekretorischen Proteinen in *C. albicans*. In einer genomweiten Transkriptanalyse der *psg1*-Mutante in *C. albicans* wurden insgesamt 248 regulierte Gene identifiziert, wobei der Transkriptspiegel von 94 Genen erhöht und von 154 Genen erniedrigt war. Die Funktion und Regulation dieser Gene deuten darauf hin, dass in der *psg1*-Mutante ein erhöhter oxidativer Stress sowie eine veränderte Zellwand-Komposition vorliegen. Ferner scheint die Ergosterol-Biosynthese beeinträchtigt zu sein, da die Transkriptspiegel der Gene *ERG10*, *ARE2*, *ERG11*, *ERG9*, *ERG5*, *ERG3* und *NCP1* in der *psg1*-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm signifikant erniedrigt waren.

Durch Überexpression des *PSG1*-Gens wurden Defektphänotypen einer *pmt1*-Mutante (erhöhte Zell-Aggregation, Sensitivität gegenüber Hygromycin B) und einer *pmt4*-Mutante (Sensitivität gegenüber Hygromycin B) aufgehoben. Mit einer *pmt1 dom34*-Doppelmutante konnte gezeigt werden, dass für diese Suppression die Anwesenheit des Dom34-Proteins erforderlich ist. Diese Ergebnisse zeigen daher eine genetische Interaktion zwischen den Genen *PSG1*, *PMT1* und *DOM34*; ferner liegt eine genetische Interaktion zwischen *PSG1* und *PMT4* vor. Durch die Markierung des Psg1-Proteins mit einem C-terminalen Hämagglutinin-Epitop wurde die Lokalisation des Psg1-Proteins im perinukleären und im Cytoplasmamembran-nahen kortikalen Bereich des endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen.

Weiterhin konnten mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems die Genprodukte der *GCD2*-, *TIP120*- und *ORF19.2366*-Gene als Interaktionspartner von Psg1 identifiziert werden. Tip120 ist in *C. albicans* an der Regulation des SCF-Komplexes beteiligt, was die Hypothese über die Funktion von Psg1 als Substratadaptor von Ubiquitin-Ligasen unterstützt. Homologe Proteine von Gcd2 in Hefe fungieren als Delta-Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors eIF2B, wodurch Psg1 auch einen Einfluss auf die Translation haben könnte. Durch die erhaltenen Ergebnisse kann angenommen werden, dass Psg1 als Substratadaptor einer Ubiquitin-Ligase fungiert und durch Ubiquitinierung die *O*-Glykosylierung indirekt reguliert. In einem Modell zur Funktion von Psg1 werden potentielle Zielproteine am ER und im Cytoplasma diskutiert.

6. Summary

O-mannosylation by the five isoforms of protein-*O*-mannosyltransferases (Pmt) has an influence on surface properties and virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. In previous work the proteins Dom34 and Yil001w were identified as potential factors for *O*-mannosylation in *S. cerevisiae*. In this work the *YIL001w*-homologue in *C. albicans*, *ORF19.7010*, here referred to as *PSG1*, was characterized. *PSG1* is one of two genes in *C. albicans*, whose sequences contain BTB-domains and therefore may represent potential substrate-adaptors of Cul3-based ubiquitin-ligase complexes.

In *C. albicans* two independent *psg1*-deletion mutants were constructed and examined for their phenotypes. The deletion of the *PSG1* gene resulted in the formation of various phenotypes, such as impaired hyphal growth on solid media, sensitivity against inhibitors including tunicamycin, clotrimazole, caspofungin and the Pmt1-inhibitor. Furthermore, a homozygous *psg1*-mutant showed a complete loss of virulence in the mouse model of systemic *C. albicans* infection. However, disruption of the *PSG1*-gene had no general effect on *N*- and *O*-glycosylation of secreted proteins in *C. albicans*. Using a genome-wide transcript analysis of the *psg1*-mutant 248 regulated genes were identified, of which 94 genes showed an increased and 154 showed a decreased transcript level. Function and regulation of these genes suggest an increased oxidative stress, as well as an altered cell wall composition in the *psg1*-mutant. The *psg1*-mutant also appears to be defective in ergosterol biosynthesis because transcript levels of the genes *ERG10*, *ARE2*, *ERG11*, *ERG9*, *ERG5*, *ERG3* and *NCPI* were significantly lowered, as compared to the wild-type strain.

Defective phenotypes of a *pmt1* mutant (formation of cell aggregates, hygromycin B-sensitivity) as well as a *pmt4*-mutant (hygromycin B-sensitivity) were abolished by overexpression of the *PSG1*-gene. Using a *pmt1 dom34* double mutant it was shown that the presence of the Dom34 protein is critical for suppression. These results indicate a genetic interaction between the genes *PSG1*, *PMT1* and *DOM34*; furthermore, genetic interaction occurs between *PSG1* and *PMT4*. By C-terminal labeling with a hemagglutinin epitope the Psg1 protein was localized in the perinuclear and in the cytoplasm-near cortical area of the endoplasmic reticulum.

By use of the yeast two-hybrid system the gene products of the genes *GCD2*, *TIP120* and *ORF19.2366* could be identified as interactors of Psg1. Tip120 in *C. albicans* is involved in the regulation of the SCF-complex, which supports the hypothesis that Psg1 may function as a substrate-adaptor in ubiquitin-ligase complexes. Yeast homologues of Gcd2 act as the delta subunit of the translation initiation factor eIF2B indicated that Psg1 could be involved in translation. The results suggest that Psg1 acts as a substrate adaptor of an ubiquitin-ligase and thereby influences of *O*-glycosylation indirectly by ubiquitination. A model for the function of Psg1 is discussed, in which potential Psg1 target proteins reside at the ER and in the cytoplasm.

7. Literaturverzeichnis

- Akasaka-Manyá K, Manyá H, Nakajima A, Kawakita M, Endo T (2006) Physical and functional association of human protein *O*-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem* **281**: 19339-19345
- Amerik AY, Nowak J, Swaminathan S, Hochstrasser M (2000) The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* **11**: 3365-3380
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 4-8
- Arnaud MB, Costanzo MC, Shah P, Skrzypek MS, Sherlock G (2009) Gene Ontology and the annotation of pathogen genomes: the case of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **17**: 295-303
- Atir-Lande A, Gildor T, Kornitzer D (2005) Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis. *Mol Biol Cell* **16**: 2772-2785
- Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Marechal JD, Munro AW, de Visser SP (2008) How do azoles inhibit cytochrome P450 enzymes? A density functional study. *J Phys Chem A* **112**: 12911-12918
- Bardwell VJ, Treisman R (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* **8**: 1664-1677
- Barford D (2011) Structure function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q Rev Biophys* **44**: 153-190
- Barriere H, Nemes C, Du K, Lukacs GL (2007) Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell* **18**: 3952-3965
- Bause E, Lehle L (1979) Enzymatic *N*-glycosylation and *O*-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast. *Eur J Biochem* **101**: 531-540
- Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* **21**: 2343-2353
- Bosu DR, Kipreos ET (2008) Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* **3**: 7
- Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioassays* **28**: 799-808
- Braakman I, Hebert DN (2013) Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a013201

- Brodersen DE, Clemons WM, Jr, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline pactamycin and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**: 1143-1154
- Brown AJ, Gow NA (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**: 333-338
- Buurman ET, Westwater C, Hube B, Brown AJ, Odds FC, Gow NA (1998) Molecular analysis of CaMnt1p a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7670-7675
- Calderone R, Suzuki S, Cannon R, Cho T, Boyd D, Calera J, Chibana H, Herman D, Holmes A, Jeng H, W, Kaminishi H, Matsumoto T, Mikami T, O'Sullivan JM, Sudoh M, Suzuki M, Nakashima Y, Tanaka T, Tompkins GR, Watanabe T (2000) *Candida albicans*: adherence signaling and virulence. *Med Mycol* **38**: Suppl 1 125-137
- Cantero PD, Ernst JF (2011) Damage to the glycoshield activates PMT-directed *O*-mannosylation via the Msb2-Cek1 pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **80**: 715-725
- Cantero PD, Lengsfeld C, Prill SK, Subanovic M, Roman E, Pla J, Ernst JF (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-*O*-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **64**: 1115-1128
- Cantero PD (2010) Proteinglykosylierung bei *Candida albicans*: Regulatorische Signalwege und Virulenzeigenschaften. Dissertation: *Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf*
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**: 361-373
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**: 1576-1583
- Chavan M, Lennarz W (2006) The molecular basis of coupling of translocation and *N*-glycosylation. *Trends Biochem Sci* **31**: 17-20
- Chen ZJ, Sun LJ (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* **33**: 275-286
- Chibana H, Oka N, Nakayama H, Aoyama T, Magee BB, Magee PT, Mikami Y (2005) Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* chromosome 7 and syntenic analysis against the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics* **170**: 1525-1537
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A (1984) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* **24**: 27-53
- Cleary IA, MacGregor NB, Saville SP, Thomas DP (2012) Investigating the function of Ddr48p in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 718-724

- Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA (2004) The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *J Mol Cell Biol* **24**: 8477-8486
- Cutler JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 187-218
- Cutler JE (2001) *N*-glycosylation of yeast with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**: Suppl 1 75-86
- Cylwik B, Naklicki M, Chrostek L, Gruszewska E (2013) Congenital disorders of glycosylation, Part I, Defects of protein *N*-glycosylation. *Acta Biochim Pol* **60**: 151-161
- D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G (2004) Increased *O*-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J* **18**: 959-961
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**: 351-361
- Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434
- Dudgeon DD, Zhang N, Ositelu OO, Kim H, Cunningham KW (2008) Nonapoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stresses. *Eukaryot Cell* **7**: 2037-2051
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**: 555-569
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**: 685-702
- Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 181-191
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1888
- Erb-Downward JR, Noverr MC (2007) Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 3498-3505
- Ernst JF, Prill SK (2001) *O*-glycosylation. *Med Mycol* **39**: Suppl 1 67-74
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13

- Finck M, Bergmann N, Jansson B, Ernst JF (1996) Defective threonine-linked glycosylation of human insulin-like growth factor in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Glycobiology* **6**: 313-3120
- Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans* *Genetics* **134**: 717-728
- Foote C, Nothwehr SF (2006) The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *J Cell Biol* **22**: 615-626
- Free SJ (2013) Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**: 33-82
- Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y (2003) Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* **5**: 1001-1007
- Geda P, Patury S, Ma J, Bharucha N, Dobry CJ, Lawson SK, Gestwicki JE, Kumar A (2008) A small molecule-directed approach to control protein localization and function. *Yeast* **25**: 577-594
- Galan JM, Haguenaer-Tsapis R (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* **16**: 5847-5854
- Gentzsch M, Tanner W (1997), Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**: 481-486
- Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA (2003) BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases *Mol Cell* **12**: 783-790
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM (2010) Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathog* **6**: e1000713
- Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Genet Genomics* **198**: 179-182
- Girrbach V, Strahl S (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**: 12554-12562
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**: 19288-19296
- Goins TL, Cutler JE (2000) Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Clin Microbiol* **38**: 2862-2869

- Golemis EA, Khazak X (1997) Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating. *Methods Mol Biol* **63**: 197-218
- Goldstein G (1974) Isolation of bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature* **247**: 11-14
- Graack HR, Wittmann-Liebold B (1998) Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem journal* **329**: (Pt 3) 433-448
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. *Clin Infect Dis* **37**: 1172-1177
- Hammond C, Helenius A (1994) Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* **266**: 456-458
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harriott MM, Noverr MC (2009) *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3914-3922
- Harty C, Strahl S, Romisch K (2001) O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell* **12**: 1093-1101
- Haw R, Devi Yarragudi A, Uemura H (2001) Isolation of *GCR1*, a major transcription factor of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **8**: 729-735
- Hazen KC, Wu JG, Masuoka J (2001) Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun* **69**: 779-786
- Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369
- Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**: 447-450
- Hilbig JS (2010) Dom34 als regulatorischer Faktor der O-Glykosylierung in *Candida albicans*, Dissertation: Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
- Hiller E, Zavrel M, Hauser N, Sohn K, Burger-Kentischer A, Lemuth K, Rupp S (2011) Adaptation adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. *Int J Med Microbiol* **301**: 384-389

- Hostetter MK (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp, with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* **7**: 29-42
- Ishida Y, Nagata K (2009) Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress. *Autophagy* **5**: 1217-1219
- Ishida Y, Yamamoto A, Kitamura A, Lamande SR, Yoshimori T, Bateman JF, Kubota H, Nagata K (2009) Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol Biol Cell* **20**: 2744-2754
- James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Jiang R, Carlson M (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit Snf4 interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* **17**: 2099-2106
- Kulathu Y, Komander D (2012) Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 508-523
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM (1999) The contribution of the *O*-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 16-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**: 1835-1844
- Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* **16**: 47R-62R
- Klippel N, Cui S, Groebe L, Bilitewski U (2010) Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall beta-1,3-glucans. *Microbiology* **156**: 3432-3444
- Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39** Suppl 1: 1-8
- Kluge S (2006) Dom34p als Regulator der Protein-*O*-Mannosylierung bei *Candida albicans*. Dissertation: Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
- Koiwai K, Maezawa S, Hayano T, Iitsuka M, Koiwai O (2008) BPOZ-2 directly binds to eEF1A1 to promote eEF1A1 ubiquitylation and degradation and prevent translation. *Genes Cells* **13**: 593-607
- Kopecka M, Gabriel M (1992) The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126

- Krishnamurthy S, Plaine A, Albert J, Prasad T, Prasad R, Ernst JF (2004) Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* **150**: 1991-2003
- Kristan K, Rizner TL (2012) Steroid-transforming enzymes in fungi. *J Steroid Biochem Mol Biol* **129**: 79-91
- Kruse KB, Brodsky JL, McCracken AA (2006) Autophagy: an ER protein quality control process. *Autophagy* **2**: 135-137
- Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J, Newport G, Agabian N (2001) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **53**: 1451-1469
- Leach CA, Tian X, Mattern MR, Nicholson B (2009), Detection and characterization of SUMO protease activity using a sensitive enzyme-based reporter assay. *Methods Mol Biol* **497**: 269-281
- Lee WC, Lee M, Jung JW, Kim KP, Kim D (2008) SCUD: *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitination database. *BMC Genomics* **9**: 440
- Lehle L, Strahl S, Tanner W (2006) Protein glycosylation conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**: 6802-6818
- Lengeler KB, Tielker D, Ernst JF (2008) Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci* **65**: 528-544
- Leuker CE, und Ernst JF (1994) Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans*: in vivo evidence for non-standard decoding of CUG codons. *Mol Gen Genet* **245**: 212-217
- Li W, Tu D, Brunger AT, Ye Y (2007) A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature* **446**: 333-337
- Liu H, Köhler J, und Fink GR (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**: 1723-1726
- Liu TB, und Xue C (2011) The Ubiquitin-Proteasome System and F-box Proteins in Pathogenic Fungi. *Mycobiology* **39**: 243-248
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-49

- Lommel M, Strahl S (2009) Protein *O*-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**: 816-828
- Luria SE, Adams JN, Ting RC (1960) Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* **12**: 348-390
- Lussier M, Sdicu AM, Bussey H (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 323-3234
- Lutfiyya LL, Johnston M (1996) Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression. *Mol Cell Biol* **16**: 4790-4797
- Maezawa S, Hayano T, Koiwai K, Fukushima R, Kouda K, Kubota T, Koiwai O (2008) Bood POZ containing gene type 2 is a human counterpart of yeast Btb3p and promotes the degradation of terminal deoxynucleotidyltransferase. *Genes Cells* **13**: 439-457
- Mahne M, Tauch A, Puhler A, Kalinowski J (2006) The *Corynebacterium glutamicum* gene *pmt* encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-*O*-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 226-233
- Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH Jr (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* **180**: 195-204
- Martínez-Esparza M, Tapia-Abellán A, Vitse-Standaert A, García-Peñarrubia P, Argüelles JC, Poulain D, Jouault T (2011) Glycoconjugate expression on the cell wall of *tps1/tps1* trehalose-deficient *Candida albicans* strain and implications for its interaction with macrophages. *Glycobiology* **21**: 796-805
- Masuoka J, Hazen KC (1999) Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology* **9**: 1281-1286
- Mayor T (2012) Navigating the ERAD interaction network. *Nat Cell Biol* **14**: 46-47
- Meem MH, Cullen PJ (2012) The impact of protein glycosylation on Flo11-dependent adherence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast res* **12**: 809-818
- Miller J (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor, Laboratory Press NY* **1**: 1-11
- Moore CJ, Hewitt JE (2009) Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconj J* **26**: 349-357

- Moore KA, Hollien J (2012) The unfolded protein response in secretory cell function. *Annu Rev Genet* **46**: 165-183
- Mori K (2009) Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* **146**: 743-750
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* **13**: 1435-1448
- Mullis KB, Faloona FA, (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Murayama SY, Negishi Y, Umeyama T, Kaneko A, Oura T, Niimi M, Ubukata K, Kajiwara S (2006) Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**: 1551-1558
- Noffz CS, Liedschulte V, Lengeler K, Ernst JF (2008) Functional mapping of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Eukaryot Cell* **7**: 881-893
- Odds FC (1988) Activity of cilofungin (LY121019) against *Candida* species in vitro. *J Antimicrob Chemother* **22**: 891-897
- Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* **10**: 2573-2582
- Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**: 86-88
- Orchard MG, Neuss JC, Galley CM, Carr A, Porter DW, Smith P, Scopes DI, Haydon D, Vousden K, Stubberfield CR, Young K, Page M (2004) Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (*PMT1*). *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 3975-3978
- Orlean P (1990) Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring *O*-mannosylation and *N*-glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 5796-5805
- Panier S, Durocher D (2009) Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **8**: 436-443
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**: 503-533
- Pierce CG, Thomas DP, Lopez-Ribot JL (2009) Effect of tunicamycin on *Candida albicans* biofilm formation and maintenance. *J Antimicrob Chemother* **63**: 473-479
- Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, Kurz T, Glaser S, Mains PE, Tyers M, Bowerman B, Peter M (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**: 311-316

- Plempel M, Berg D (1984) Reduction of the in vivo virulence of *Candida albicans* by pretreatment with subinhibitory azole concentrations in vitro. *Dermatologica* **169**: Suppl 1 11-8
- Plempel RK, Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* **24**: 266-270
- Poulain D, Jouault T (2004) *Candida albicans* cell wall glycans host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342-349
- Prill SK, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schroppel K, Ernst JF (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560
- Prill S, KH (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-O-mannosyltransferase des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Proszynski TJ, Simons K, Bagnat M (2004) O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* **15**: 1533-1543
- Raiborg C, und Stenmark H (2002) Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct* **27**: 403-408
- Rashki A, Ghalehnoo ZR, Ghalehnoo MR (2013) Functional analysis of genes involved in beta-1,2-Mannosylation of glycans and putative cell wall proteins in *Candida albicans* during hyphae transition. *Comp Clin Pathol* **13**: 1713-1719
- Reid PJ, Mohammad-Qureshi SS, Pavitt GD (2012) Identification of intersubunit domain interactions within eukaryotic initiation factor (eIF) 2B the nucleotide exchange factor for translation initiation, *J Biol Chem* **287**: 8275-8285
- Ritter C, Helenius A (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol* **7**: 278-280
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-771
- Román E, Pla J (2013) The CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in the fungal pathogen *Candida albicans*. *MAP Kinase 2013* **2**:e5
- Román E, Cottier F, Ernst JF, Pla J (2009) Msb2 signalling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Rotin D Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 398-409

- Rouabhia M, Schaller M, Corbucci C, Vecchiarelli A, Prill S, K, Giasson L, Ernst JF (2005) Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun* **73**: 4571-4580
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor, Laboratory Press NY*
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2* a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**: (Pt 2) 405-416
- Santos MA, Tuite MF (1995) The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **23**: 1481-1486
- Schmidt I (2007) Interaktionen der Protein-O-Mannosyltransferasen aus *Candida albicans*. Dissertation: Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
- Schroder M (2008) Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* **65**: 862-894
- Sela N, Atir-Lande A, Kornitzer D (2012) Neddylation and CAND1 independently stimulate SCF ubiquitin ligase activity in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **11**: 42-52
- Sherman F, Fink, G, Hicks J (1987) Methods in Yeast Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor NY*
- Skaar JR, Florens L, Tsutsumi T, Arai T, Tron A, Swanson SK, Washburn MP, DeCaprio JA (2007) PARC and CUL7 form atypical cullin RING ligase complexes. *Cancer res* **67**: 2006-2014
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197
- Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011) Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**: 1086-1090
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**: 1265-1273
- Srikantha T, Tsai L, Daniels K, Klar AJ, Soll DR (2001) The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**: 4614-4625
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG (2005) Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* **6**: R82

- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF (1997) Efg1p an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans* is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**: 1982-1991
- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307
- Strahl-Bolsinger S, Tanner W (1991) Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*, Purification and characterization of the dolichyl-phosphate-D-mannose-protein O-D-mannosyltransferase. *Eur J Biochem* **196**: 185-1190
- Steffen J (2010) Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems in Säugetierzellen durch den Transkriptionsfaktor TCF11. Dissertation: Humboldt-Universität zu Berlin
- Suter B, Kittanakom S, Stagljar I (2008) Two-hybrid technologies in proteomics research. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 316-323
- Swidergall M, Ernst AM, Ernst JF (2013) *Candida albicans* Mucin Msb2 Is a Broad-Range Protectant against Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3917-3922
- Szafranski-Schneider E, Swidergall M, Cottier F, Tielker D, Roman E, Pla J, Ernst JF (2012) Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **8**: e1002501
- Tanner W, Lehle L (1987) Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **906**: 81-99
- Tanno H, Komada M (2013) The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway. *J Biochem* **153**: 497-504
- Taxis C, Hitt R, Park SH, Deak PM, Kostova Z, Wolf DH (2003) Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* **278**: 35903-35913
- Terrell J, Shih S, Dunn R, and Hicke L (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* **1**: 193–202.
- Timpel C, Strahl-Bolsinger S, Ziegelbauer K, Ernst JF (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 20837-20846
- Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, Hendry JA, Ou J, Moffat J, Boone C, Davis TN, Nislow C, Brown GW (2012) Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol* **14**: 966-9676
- Toh-e A, Guerry-Kopecko P, Wickner RB (1980) A stable plasmid carrying the yeast Leu2 gene and containing only yeast deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **141**: 413-416

- Trunk K, Gendron P, Nantel A, Lemieux S, Roemer T, Raymond M (2009) Depletion of the cullin Cdc53p induces morphogenetic changes in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 756-767
- VanderVen BC, Harder JD, Crick DC, Belisle JT (2005) Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* **309**: 941-943
- Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **2**: 97-130
- Vashist S, und Ng DT (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**: 41-52
- Vazquez-Torres A, Balish E (1997) Macrophages in resistance to candidiasis *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192
- Verstrepen KJ, und Klis FM (2006) Flocculation adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15
- Walter P, Ron D (2011), The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**: 1081-1086
- Wang Y, Xu XL (2008) Bacterial peptidoglycan-derived molecules activate *Candida albicans* hyphal growth. *Commun Integr Biol* **1**: 137-139
- Weber Y, Prill SK, Ernst JF (2004) Pmt-mediated O-mannosylation stabilizes an essential component of the secretory apparatus Sec20p in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1164-1168
- Weber PJ, Weber G, Eckerskorn C (2004) Isolation of organelles and prefractionation of protein extracts using free-flow electrophoresis. *Curr Protoc Protein Sci* **22**: Unit 22.5
- Weerapana E, Imperiali B (2006), Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**: 91R-101R
- Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP (1988) Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* **148**: 2642-2645
- White TC, Andrews LE, Maltby D, Agabian N (1995) The "universal" leucine codon CTG in the secreted aspartyl proteinase 1 (*SAP1*) gene of *Candida albicans* encodes a serine in vivo. *J Bacteriol* **177**: 2953-2955
- White TC, Marr KA, Bowden RA (1998) Clinical cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**: 382-402
- Whiteway M, Bachewich C (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**: 529-553
- Willger SD, Ernst JF, Alspaugh JA, Lengeler KB (2009) Characterization of the *PMT* gene family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS one* **4**: e6321

- Wilson RB, Davis D, Mitchell AP (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874
- Wilson RB, Davis D, Enloe BM, Mitchell AP (2000) A recyclable *Candida albicans* *URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**: 65-70
- Wimalasena TT, Enjalbert B, Guillemette T, Plumridge A, Budge S, Yin Z, Brown AJ, Archer DB (2008) Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns and the role of Hac1 in the polarized growth of *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **45**: 1235-1247
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478
- Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, Vidal M, Elledge SJ, Harper JW (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**: 316-321
- Zaragoza O, González-Párraga P, Pedreño Y, Alvarez-Peral FJ, Argüelles JC (2003) Trehalose accumulation induced during the oxidative stress response is independent of TPS1 mRNA levels in *Candida albicans*. *Int Microbiol* **2**: 121-125
- Zimmermann FK (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **31**: 71-86

8. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
Abb.	Abbildung
ARS	autonomous replication site
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. orthopsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tenius</i>	<i>Candida tenius</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dol-P	Dolicholphosphat
Dol-P-Man	Dolicholphosphat-Mannose
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
g	Gramm
GalNac	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HECT	homologous to E6-AP carboxyl terminus
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperaziny]-ethansulfonsäure

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lura Bertami-Medium
<i>L. elongisporis</i>	<i>Lodderomyces elongisporis</i>
<i>M. guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
M	Molar
Man	Mannose
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	nano
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR P	olymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
Pir	proteins with internal repeats
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-PCR
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RTL	relativer Transkript Level
S	Svedberg
SCAA	<u>S</u> ynthetic <u>C</u> omplete with <u>A</u> mino <u>A</u> cids
<i>Sch. stipitis</i>	<i>Scheffersomyces stipitis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sp. pasalidarum</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
YNB	yeast nitrogen base

9. Anhang

9.1 Liste der regulierten Gene aus Abschnitt 3.8 (Genomweite Transkriptanalyse)

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.3433</i>	<i>OYE23</i>	9.42	Putative NAPDH dehydrogenase; induced by nitric oxide. benomyl; oxidative stress-induced via Cap1p; fungal-specific (no human or murine homolog); Hap43p-repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7557</i>	<i>FGR46</i>	7.45	Protein lacking an ortholog in <i>S. cerevisiae</i> ; transposon mutation affects filamentous growth	ORF/Verified
<i>orf19.113</i>	<i>CIP1</i>	7.13	Possible oxidoreductase; transcription induced by cadmium but not by other heavy metals. heat shock. yeast-hyphal switch. oxidative stress (via Cap1p). or macrophage interaction; stationary phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.6760</i>	<i>MDS3</i>	6.56	TOR signaling pathway component required for growth and hyphal formation at pH 9. for full virulence in a mouse model of systemic infection and for biofilm formation; plays a role in chlamyospore formation	ORF/Verified
<i>orf19.1075</i>		6.34		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2177</i>		6.15	Hap43p-induced gene; overlaps IFM3/ <i>orf19.2176</i>	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6899</i>	<i>QTH1</i>	5.78	Putative oxidoreductase; mutation confers hypersensitivity to toxic ergosterol analog	ORF/Verified
<i>orf19.286</i>	<i>ATG10</i>	5.74	Decreased transcription is observed upon fluphenazine treatment	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2509</i>		5.60		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3261</i>	<i>ATO9</i>	5.50	Putative fungal-specific transmembrane protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2907</i>	<i>PGA42</i>	4.78	Putative GPI-anchored adhesin-like protein; decreased transcription is observed in azole-resistant strains that overexpress CDR1 and CDR2 or MDR1	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4690</i>	<i>SMF11</i>	4.77	Biofilm-induced gene; induced by nitric oxide independent of Yhb1p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1605</i>	<i>PMS1</i>	4.76	Putative DNA mismatch repair factor; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> PMS1 which is an ATP-binding protein involved in DNA mismatch repair	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1270</i>	<i>FRE3</i>	4.61	Protein with similarity to ferric reductase Fre10p; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7190</i>	<i>OGG1</i>	4.46	<i>S. cerevisiae</i> ortholog OGG1 has oxidized purine base lesion DNA N-glycosylase activity. has role in base-excision repair. AP site formation and localizes to	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			mitochondrion	
<i>orf19.7646</i>		4.39	Ortholog of <i>C. glabrata</i> CAGL0D03916g	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7167</i>		4.03	Putative adhesin-like protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6501</i>	<i>YJU99</i>	3.98		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2515</i>		3.87		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.276</i>		3.83	Plasma membrane-associated protein; increased transcription is observed in an azole-resistant strain that overexpresses MDR1; Hap43p-repressed gene	ORF/Verified
<i>orf19.2808</i>	<i>ZCF16</i>	3.76	Predicted zinc-finger protein; not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3738</i>	<i>PGA22</i>	3.74	Putative GPI-anchored protein; adhesin-like protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7027</i>		3.71		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1555</i>	<i>SAC3</i>	3.70	Putative nuclear pore-associated protein. required for small ribosomal subunit biogenesis; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1105.2</i>	<i>PGA56</i>	3.64	Regulator of sorbose utilization; putative GPI-anchor; predicted helix-loop helix domain; hyphal induced; induced during cell wall regeneration; colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; transcription activated by Tbf1p. Hap43p	ORF/Verified
<i>orf19.2264</i>	<i>OLE2</i>	3.61	Protein with similarity to fatty acid desaturase (stearoyl-CoA desaturase); homozygous null mutant shows decreased production of prostaglandin E2	ORF/Verified
<i>orf19.3618</i>	<i>YWPI</i>	3.58	Secreted yeast cell wall protein; possible role in dispersal in host; mutation causes increased adhesion and biofilm formation; stable propeptide; regulated by growth phase. phosphate. Ssk1p. Ssn6p. Efg1p. Efh1p. Hap43p; mRNA binds to She3p	ORF/Verified
<i>orf19.4574</i>		3.56	<i>S. cerevisiae</i> ortholog YOR059C localizes to lipid particle	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3263</i>	<i>ATO10</i>	3.51	Putative fungal-specific transmembrane protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1417</i>	<i>FMP14</i>	3.49		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2469</i>	<i>RAD10</i>	3.43	Ortholog of <i>S. cerevisiae</i> RAD10. an endonuclease involved in nucleotide excision repair; null mutant is extremely sensitive to UV irradiation; transcription is downregulated in alkaline conditions	ORF/Verified
<i>orf19.3131</i>	<i>OYE32</i>	3.40	NAD(P)H oxidoreductase family protein; induced by nitric oxide. amphotericin B. oxidative stress (via Cap1p); increased transcription associated with MDR1 overexpression or benomyl treatment; macrophage-downregulated protein abundance	ORF/Verified
<i>orf19.6420</i>	<i>PGA13</i>	3.40	Putative adhesin-like GPI-anchored protein; similar to mucins; induced during cell wall regeneration and during core caspofungin response; regulated by Tsa1p.	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			Tsa1Bp in minimal media at 37 deg and by Cyr1p. Nrg1p. Tup1p. Rlm1p. Hap43p	
<i>orf19.5423</i>	<i>EST3</i>	3.18	Telomerase subunit; required for telomere maintenance in vivo; separable roles in telomerase activity and processivity; not required for catalytic activity in vitro; related to mammalian Tpp1p	ORF/Verified
<i>orf19.6517</i>	<i>RAD14</i>	3.17	Putative DNA repair protein; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch; flucytosine repressed	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.794</i>	<i>SSN3</i>	3.14	Putative cyclin-dependent protein kinase; mutants are sensitive to growth on H2O2 medium	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7539.1</i>		3.08	Putative adhesin-like protein; transcription detected in high-resolution tiling array experiments	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.896</i>	<i>CHK1</i>	3.02	Histidine kinase involved in two-component signaling pathway. regulates cell wall biosynthesis; disruption impairs hyphal growth. decreases virulence in mouse intravenous (but not rat vaginal) infection and increases rate of phagocytosis	ORF/Verified
<i>orf19.656</i>	<i>DPP1</i>	3.00	Putative diacylglycerol pyrophosphate phosphatase of diacylglycerol production for phospholipid biosynthesis; downregulation correlates with clinical development of fluconazole resistance	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.544</i>	<i>RPR2</i>	2.95	<i>S. cerevisiae</i> ortholog RPR2 has ribonuclease P activity. has role in intronic box C/D snoRNA processing and localizes to nucleolar ribonuclease P complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5752</i>		2.94	<i>S. cerevisiae</i> ortholog SAF1 has ubiquitin-protein ligase activity. has role in SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process and localizes to SCF ubiquitin ligase complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2498</i>	<i>SAN1</i>	2.94	Hap43p-repressed gene; oxidative stress-induced via Cap1p; late-stage biofilm-induced and planktonic growth-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7210</i>		2.93	<i>S. cerevisiae</i> ortholog YJR008W localizes to nucleus. cytoplasm	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7282</i>	<i>PEX13</i>	2.92	Protein required for peroxisomal protein import mediated by PTS1 and PTS2 targeting sequences; transcription is upregulated in an RHE model of oral candidiasis; Hap43p-repressed gene	ORF/Verified
<i>orf19.3254</i>		2.92	Protein not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4793</i>		2.86	Putative ribosome-associated protein; Hap43p-induced gene; ortholog of <i>S. cerevisiae</i> TMA16	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7101</i>	<i>TEL2</i>	2.76		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.372</i>		2.76	Putative protein of unknown function; Hap43p-repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2202</i>		2.75	Predicted ORF in Assemblies 19. 20 and 21; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.5303</i>	<i>PGA30</i>	2.74	GPI-anchored protein of cell wall	ORF/Verified
<i>orf19.5438</i>		2.72	Ortholog(s) have ubiquitin-protein ligase activity. role in protein sumoylation. protein ubiquitination. response to DNA damage stimulus. telomere maintenance and nucleus. ubiquitin ligase complex localization (1)	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3906</i>		2.67	Protein not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.320</i>	<i>RSD1</i>	2.67	Ortholog of <i>C. glabrata</i> CAGL0J05852g	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2765</i>	<i>PGA62</i>	2.66	Adhesin-like cell wall protein; putative GPI-anchor; fluconazole-induced; regulated by iron; expression greater in high iron; induced during cell wall regeneration; Cyr1p or Ras1p downregulated; positively regulated by Tbf1p	ORF/Verified
<i>orf19.822</i>	<i>HSP21</i>	2.66	Small heat shock protein involved in stress response and virulence; detected in some. not all. biofilm extracts; fluconazole-downregulated; transcription induced in <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> mutants; stationary phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.2179</i>	<i>SIT1</i>	2.62	Transporter of ferrichrome siderophores. not ferrioxamine B; required for wild-type invasion of human epithelial cells in vitro. but not for wild-type systemic virulence in mouse; transcription regulated by iron. Sfu1p. Rfg1p. Tup1p. Hap43p	ORF/Verified
<i>orf19.7170</i>		2.61		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3795</i>	<i>AGP3</i>	2.60	Putative serine transporter with possible role in assimilation of sulfur; induced upon early biofilm formation; fungal-specific (no human or murine homolog)	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6674</i>	<i>BTS1</i>	2.58	Putative geranylgeranyl diphosphate synthase; decreased transcription is observed upon benomyl treatment	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4786</i>	<i>FGR43</i>	2.57	Protein lacking an <i>S. cerevisiae</i> ortholog; transposon mutation affects filamentous growth; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress	ORF/Verified
<i>orf19.6548</i>	<i>ISU1</i>	2.52	Protein with similarity to NifU; possible role in iron-sulfur cluster biogenesis; transcriptionally regulated by iron; expression greater in low iron; transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6938</i>	<i>MEU1</i>	2.50	Putative methylthioadenosine phosphorylase; protein level decreases in stationary phase cultures	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2738</i>	<i>SUL2</i>	2.40	Putative sulfate transporter; transcription is negatively regulated by Sfu1p; induced upon biofilm formation; amphotericin B induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6681</i>	<i>AES5</i>	2.38		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2784</i>		2.36		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6673</i>	<i>HEX1</i>	2.36	Beta-N-acetylhexosaminidase/chitobiase. highly glycosylated enzyme that is	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			secreted to the periplasm and culture medium; required for full virulence; may have role in carbon or nitrogen scavenging; possibly an essential gene (UAU1 method)	
<i>orf19.259</i>		2.35	Late-stage biofilm-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1116</i>		2.34	Planktonic growth-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1927</i>	<i>SNM1</i>	2.33	Protein similar to RNase MRP RNA binding protein; ciclopirox olamine induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2244</i>		2.32	Similar to oxidoreductases and to <i>S. cerevisiae</i> Yjr096wp; transcription is negatively regulated by Sfulp; increased transcription upon benomyl treatment; decreased expression in an <i>ssr1</i> null mutant; Hap43p-repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.247</i>		2.31	Ortholog(s) have endosome localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5270</i>	<i>CMD3</i>	2.31		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4250</i>		2.30		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3781</i>		2.27	Hap43p-repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7207</i>	<i>DOA4</i>	2.26	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Doa4p. a ubiquitin hydrolase. involved in recycling ubiquitin from proteasome-bound ubiquitinated intermediates; oxidative stress-induced via Cap1p; not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3973</i>		2.25	Late-stage biofilm-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5861</i>	<i>KRE9</i>	2.23	Protein of beta-1.6-glucan biosynthesis; required for serum-induced hyphal growth; required for efficient utilization of galactose and for growth on glucose; similar to <i>S. cerevisiae</i> Kre9p and Knh1p; O-glycosylated by Pmt1p	ORF/Verified
<i>orf19.5169</i>	<i>AMD22</i>	2.23	Ortholog(s) have cytosol. nucleus localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5500</i>	<i>MAK16</i>	2.21	Putative constituent of 66S pre-ribosomal particles; Hap43p-induced gene; decreased expression in response to prostaglandins	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3919</i>	<i>LPF25</i>	2.21	Early-stage biofilm-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2663</i>	<i>LPF20</i>	2.19		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5449</i>		2.19	Has domain(s) with predicted integral to membrane localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4311</i>	<i>YNK1</i>	2.19	Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase); homo-hexameric; soluble protein in hyphae; flucytosine induced; biofilm induced; macrophage-induced protein; stationary phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.5885</i>	<i>SNU13</i>	2.17	Putative U3 snoRNP protein; flucytosine induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6726</i>	<i>SPT2</i>	2.16	<i>S. cerevisiae</i> ortholog SPT2 has role in negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter. transcription elongation from RNA polymerase II promoter. chromatin organization. RNA polyadenylation	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.6930</i>	<i>SOL1</i>	2.15	Cell cycle regulator; partial functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sic1p; protein degradation regulated by SCF(CDC4) pathway; CDK phosphorylation predicted	ORF/Verified
<i>orf19.2850</i>		2.13	Protein of unknown function; induced by nitric oxide independent of Yhb1p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.233.1</i>	<i>HRT1</i>	2.13	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Hrt1p. which is a component of a nuclear ubiquitin-protein ligase complex involved in cell cycle control; induced under hydroxyurea treatment	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5673</i>	<i>OPT7</i>	2.13	Putative oligopeptide transporter; possibly transports GSH or related compounds; induced by biofilm formation; Hog1p-induced; expression of OPT6. -7. or -8 does not suppress defect of mutant lacking OPT1-3; fungal-specific; Hap43p-repressed	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1012</i>	<i>APS1</i>	2.10	<i>S. cerevisiae</i> ortholog APS1 has clathrin binding. has role in Golgi to vacuole transport and localizes to AP-1 adaptor complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3972</i>	<i>GOT1</i>	2.08	<i>S. cerevisiae</i> ortholog GOT1 has role in Golgi to endosome transport. ER to Golgi vesicle-mediated transport and localizes to ER to Golgi transport vesicle. endoplasmic reticulum. Golgi membrane	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.314</i>	<i>STB2</i>	2.07	<i>S. cerevisiae</i> ortholog STB2 has role in histone deacetylation and localizes to Sin3-type complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5012</i>		2.03		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2114</i>	<i>URO99</i>	2.00	Ortholog(s) have cytosol. nucleus localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.992</i>	<i>LKH1</i>	0.50	Putative leukotriene A(4) hydrolase; repressed during the mating process; Hog1p-induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1742</i>	<i>HEM3</i>	0.50	Hydroxymethylbilane synthase (uroporphyrinogen I synthase); converts 4-porphobilinogen to hydroxymethylbilane. third step in the heme biosynthesis; transcription greater in high iron. CO ₂ ; alkaline downregulated; Hap43p-repressed	ORF/Verified
<i>orf19.385</i>	<i>GCV2</i>	0.50	Glycine decarboxylase P subunit; protein of glycine catabolism; downregulated by Efg1p; Hog1p-induced; upregulated by Rim101p at acid pH; transcription activated in the presence of elevated CO ₂ ; stationary phase enriched protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5747</i>	<i>MRP4</i>	0.50	<i>S. cerevisiae</i> ortholog MRP4 has structural constituent of ribosome and localizes to mitochondrial small ribosomal subunit	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5486</i>	<i>YSH1</i>	0.50	Putative endoribonuclease; heterozygous null mutant exhibits hypersensitivity to parnafungin and cordycepin in the <i>C. albicans</i> fitness test	ORF/Verified
<i>orf19.7509.2</i>	<i>LSM6</i>	0.50	Putative Lsm protein; flucytosine induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.583</i>		0.49	Putative indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO); IDO is the rate-limiting enzyme of	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			tryptophan catabolism via kynurenine pathway; enzyme inhibition by 1-methyl-D.L-tryptophan causes increased hyphal growth; expressed in yeast cells and hyphae	
<i>orf19.7498</i>	<i>LEU1</i>	0.49	3-isopropylmalate dehydratase; antigenic in humans; decreased expression in hyphae vs yeast cells; alkaline downregulated; upregulated by human whole blood or PMN cells; present in exponential and stationary growth phase; Hap43p-repressed	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1078</i>	<i>HBR2</i>	0.49	Putative alanine glyoxylate aminotransferase; regulated by Gcn4p and hemoglobin; stationary phase enriched protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3335</i>		0.49	Plasma membrane protein; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p; repressed by nitric oxide	ORF/Verified
<i>orf19.4172</i>	<i>PHO13</i>	0.49	Has domain(s) with predicted hydrolase activity and role in metabolic process	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.481</i>	<i>GCD1</i>	0.49	Putative translation initiation factor; transcription is regulated by Mig1p; genes encoding ribosomal subunits. translation factors. and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.23</i>	<i>RTA3</i>	0.49	Similar to <i>S. cerevisiae</i> Rta1p (role in 7-amincholesterol resistance) and Rsb1p (flippase); putative membrane protein; putative drug-responsive regulatory site; induced by fluphenazine. estradiol. ketoconazole. caspofungin	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1552</i>	<i>CPR3</i>	0.49	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; macrophage-induced protein; protein levels decrease in stationary phase yeast cultures; predicted mitochondrial localization; overlaps <i>orf19.1551</i>	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.637</i>	<i>SDH2</i>	0.49	Succinate dehydrogenase. Fe-S subunit; localizes to surface of yeast cells. but not hyphae; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; repressed by nitric oxide. Hap43p; induced during log phase aerobic growth	ORF/Verified
<i>orf19.4488</i>	<i>SWI3</i>	0.49	Predicted ORF in Assemblies 19. 20 and 21; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4030</i>	<i>PRI1</i>	0.49	<i>S. cerevisiae</i> ortholog PRI1 has single-stranded DNA binding. DNA primase activity. has role in DNA replication. synthesis of RNA primer and localizes to alpha DNA polymerase:primase complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7214</i>		0.48	Putative glucan 1.3-beta-glucosidase; regulated by Nrg1p. Tup1p and possibly Tac1p; induced upon biofilm formation. nitric oxide and during cell wall regeneration; stationary phase enriched protein; possibly an essential gene	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.118</i>	<i>FAD2</i>	0.48	Delta-12 fatty acid desaturase. involved in production of linoleic acid. which is a major component of membranes	ORF/Verified
<i>orf19.30</i>	<i>SPF1</i>	0.48	Putative calcium-transporting ATPase. involved in control of calcium homeostasis. response to ER stress. hyphal growth. biofilm formation and virulence	ORF/Verified
<i>orf19.2138</i>	<i>ILS1</i>	0.48	Putative isoleucyl-tRNA synthetase. the target of drugs including the cyclic beta-amino acid icofungipen/PLD-118/BAY-10-8888 and mupirocin; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4495</i>	<i>NDH51</i>	0.48	Subunit of nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase complex I. of the mitochondrial electron transport chain; required for wild-type filamentous growth; alkaline downregulated; Hap43p-repressed	ORF/Verified
<i>orf19.3247</i>		0.48	Putative ortholog of <i>S. cerevisiae</i> <i>Laa1p</i> ; likely to be essential for growth. based on an insertional mutagenesis strategy	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2606</i>	<i>HDA1</i>	0.48	Histone deacetylase; conserved deacetylation motif; regulates white-to-opaque switching frequency but not opaque-to-white switching; greater expression in white cells than opaque cells; inhibited by trichostatin-A; inducer of filamentation	ORF/Verified
<i>orf19.6121</i>	<i>MNL1</i>	0.48	Transcription factor that activates transcription of stress response genes via SLE (STRE-like) elements. required for adaptation to weak acid stress; activates a subset of the genes that are repressed by <i>Nrg1p</i>	ORF/Verified
<i>orf19.2598</i>	<i>VMA4</i>	0.48	H ⁺ transporting ATPase E chain; transcription is regulated by <i>Mig1p</i> ; caspofungin repressed; protein level decreases in stationary phase cultures	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.745</i>	<i>VAC8</i>	0.48	Protein involved in vacuolar inheritance; required for hyphal growth; contains armadillo repeats	ORF/Verified
<i>orf19.2335</i>		0.48	Putative aspartyl aminopeptidase; stationary phase enriched protein; mutation confers hypersensitivity to 5-fluorouracil (5-FU); <i>Hog1p</i> -induced; planktonic growth-induced	ORF/Verified
<i>orf19.2871</i>	<i>SDH12</i>	0.47	Succinate dehydrogenase; soluble protein in hyphae; macrophage-downregulated protein level; downregulated by <i>Efg1p</i> ; repressed by nitric oxide; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-repressed gene	ORF/Verified
<i>orf19.5281</i>	<i>SCP160</i>	0.47	Ortholog(s) have G-protein alpha-subunit binding. RNA binding activity	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4641</i>	<i>NMT1</i>	0.47	Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase; attaches the fatty acid myristate to a small number of proteins at an N-terminal Gly; essential; antifungal drug target; functional homolog	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			of <i>S. cerevisiae</i> Nmt1p	
<i>orf19.1233</i>	<i>ADE4</i>	0.47	Putative phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase; flucytosine induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5225</i>		0.47		ORF/Uncharacterized
<i>orf19.172</i>	<i>RPC19</i>	0.47	Putative RNA polymerases I and III subunit AC19; Hap43p-induced gene; transcription is upregulated in both intermediate and mature biofilms	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1847</i>	<i>ARO10</i>	0.47	Aromatic decarboxylase of the Ehrlich fusel oil pathway of aromatic alcohol biosynthesis; pH-regulated (alkaline downregulated); protein abundance is affected by URA3 expression in the CAI-4 strain background	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5911</i>	<i>CMK1</i>	0.47	Putative calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; expression regulated upon white-opaque switching; biochemically purified Ca ²⁺ /CaM-dependent kinase is soluble. cytosolic. monomeric. and serine-autophosphorylated; Hap43p-repressed	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3856</i>	<i>CDC28</i>	0.47	Cyclin-dependent protein kinase. interacts with regulatory subunit Cyb1p; involved in determination of cell morphology during the cell cycle; phosphorylated primarily by Swe1p and phosphorylation is regulated by Hsl1p; intron in 5'-UTR	ORF/Verified
<i>orf19.2245</i>	<i>YPT72</i>	0.47	Vacuolar Rab small monomeric GTPase involved in vacuolar biogenesis; involved in filamentous growth and virulence	ORF/Verified
<i>orf19.7602</i>	<i>AHA1</i>	0.47	Putative Hsp90p co-chaperone; Hap43p-repressed gene; heavy metal (cadmium) stress-induced; oxidative stress-induced via Cap1p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1996</i>	<i>CHA1</i>	0.46	Similar to catabolic serine/threonine dehydratases; negatively regulated by Rim101p; expression greater in low iron; regulated on white-opaque switching; filament induced; transposon mutation affects filamentous growth; biofilm-induced	ORF/Verified
<i>orf19.5061</i>	<i>ADE5.7</i>	0.46	Phosphoribosylamine-glycine ligase and phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase; interacts with Vps34p; required for hyphal growth and virulence; flucytosine induced; not induced in GCN response. in contrast to <i>S. cerevisiae</i> ortholog	ORF/Verified
<i>orf19.223</i>		0.46	Putative serine/threonine protein kinase; Hap43p-repressed gene; increased expression in response to prostaglandins; late-stage biofilm-induced; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6082</i>	<i>GSF2</i>	0.46	<i>S. cerevisiae</i> ortholog GSF2 has unfolded protein binding. has role in protein folding. protein localization at cell surface and localizes to integral to endoplasmic	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			reticulum membrane. mitochondrial outer membrane	
<i>orf19.434</i>	<i>PRD1</i>	0.46	Putative proteinase; transcription is regulated by Nrg1p. Mig1p. and Tup1p; Hog1p-induced; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4177</i>	<i>HIS5</i>	0.46	Putative histidinol-phosphate aminotransferase; Gcn4p-regulated; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7561</i>	<i>DEF1</i>	0.45	Regulator of RNA polymerase II; required for filamentous growth and epithelial cell escape. dissemination in RHE model; induced by fluconazole. high cell density; Efg1p/hyphally regulated; role in adhesion and hyphal growth on solid surface	ORF/Verified
<i>orf19.6586</i>		0.45	Late-stage biofilm-induced gene; increased transcription observed upon benomyl treatment or in an azole-resistant strain that overexpresses MDR1; shows colony morphology-related regulation by Ssn6p; induced by nitric oxide; Hap43p-repressed	ORF/Verified
<i>orf19.6065</i>		0.45	RNA polymerase II holoenzyme/mediator subunit; regulated by Mig1p. Tup1p; amphotericin B. caspofungin repressed; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures; Hap43p-repressed gene; planktonic growth-induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.251</i>		0.45	ThiJ/PfpI protein; binds human immunoglobulin E; 2 N-glycosylation motifs; alkaline. fluconazole. Hog1p-downregulated; induced in core stress response or by oxidative stress (via Cap1p); induced by hypoxia. Hap43p; stationary-phase enriched	ORF/Verified
<i>orf19.4954</i>	<i>PPA1</i>	0.45	Ortholog(s) have endoplasmic reticulum. integral to membrane localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2265</i>	<i>SNF12</i>	0.45	<i>S. cerevisiae</i> ortholog SNF12 has role in nucleosome mobilization and localizes to SWI/SNF complex	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2344</i>	<i>ASR1</i>	0.45	Putative heat shock protein; transcription regulated by cAMP. osmotic stress. ciclopirox olamine. ketoconazole; negatively regulated by Cyr1p. Ras1p; colony morphology-related regulation by Ssn6p; stationary phase enriched; Hap43p-induced	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2538</i>	<i>PTC2</i>	0.45	Protein phosphatase of the Type 2C-related family (serine/threonine-specific) with a potential role in DNA damage checkpoint control; localizes to both cytoplasm and mitochondria; mutant shows virulence defect	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1389</i>	<i>SGN11</i>	0.45	Ortholog of <i>C. glabrata</i> CAGL0J02200g	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5630</i>	<i>APA2</i>	0.44	Putative ATP adenyltransferase II; regulated by Gcn4p; repressed in response to amino acid starvation (3-AT); increased	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			expression in response to prostaglandins; Hap43p-repressed gene	
<i>orf19.4622</i>		0.44	Ortholog(s) have role in telomere maintenance. transcription-coupled nucleotide-excision repair. ubiquitin-dependent protein catabolic process and nucleus localization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5230</i>	<i>MRPS9</i>	0.44	Mitochondrial ribosomal protein S9; has N-terminal mitochondrial targeting signal and an S9 consensus motif; overexpression in <i>S. cerevisiae</i> causes respiratory defect that is reversible upon cessation of <i>C. albicans</i> gene expression	ORF/Verified
<i>orf19.4026</i>	<i>HIS1</i>	0.44	ATP phosphoribosyl transferase; enzyme of histidine biosynthesis; fungal-specific (no human. murine homolog); upregulated in biofilm; acid upregulated/alkaline downregulated by Rim101p; regulated by Gcn2p. Gcn4p; strain CA9 is a <i>his1</i> mutant	ORF/Verified
<i>orf19.3003</i>		0.44	Putative lipid-binding protein with a predicted role in calcium-dependent phospholipid-binding	ORF/Verified
<i>orf19.7219</i>	<i>FTR1</i>	0.44	High-affinity iron permease; required for mouse virulence. low-iron growth; iron. amphotericin B. caspofungin. ciclopirox. Hog1p regulated; complements <i>S. cerevisiae</i> <i>ftr1</i> iron transport; Hap43p-repressed gene	ORF/Verified
<i>orf19.528</i>	<i>SEC26</i>	0.44	Secretory vesicles coatomer complex protein	ORF/Verified
<i>orf19.1974</i>	<i>TFS1</i>	0.44	Putative carboxypeptidase y inhibitor; transcription is regulated upon yeast-hyphal switch; shows colony morphology-related gene regulation by Ssn6p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3870</i>	<i>ADE13</i>	0.44	Adenylosuccinate lyase; enzyme of adenine biosynthesis; soluble protein in hyphae; not induced during GCN response. in contrast to the <i>S. cerevisiae</i> ortholog; repressed by nitric oxide	ORF/Verified
<i>orf19.6779</i>	<i>PRO2</i>	0.44	Putative gamma-glutamyl phosphate reductase with a predicted role in proline biosynthesis; regulated by Gcn2p and Gcn4p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2261</i>	<i>SAP49</i>	0.44	<i>S. cerevisiae</i> ortholog HSH49 has RNA binding. has role in nuclear mRNA splicing. via spliceosome and localizes to U2-type prespliceosome. U2 snRNP	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2928</i>		0.44	<i>S. cerevisiae</i> ortholog YOL107W localizes to Golgi apparatus. COPI-coated vesicle	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3350</i>	<i>MRP20</i>	0.44	Component of mitochondrial ribosome; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4082</i>	<i>DDR48</i>	0.43	Immunogenic stress-associated protein; regulated by filamentous growth pathways; induced by benomyl. caspofungin. ketoconazole or in azole-resistant strain; Hog1p. farnesol. alkaline downregulated; stationary phase enriched; biofilm-induced	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.4036</i>	<i>APM1</i>	0.43	Phosphorylated protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Apm1. which is involved in vesicle transport; transposon mutation affects filamentous growth	ORF/Verified
<i>orf19.2306</i>		0.43	<i>S. cerevisiae</i> ortholog ADI1 has oxidoreductase activity. acting on single donors with incorporation of molecular oxygen. incorporation of two atoms of oxygen and has role in L-methionine salvage from methylthioadenosine	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1591</i>	<i>ERG10</i>	0.43	Putative acetyl-CoA acetyltransferase; role in ergosterol biosynthesis; soluble in hyphae; changes in protein abundance associated with azole resistance; fluconazole or ketoconazole induced; macrophage-downregulated protein	ORF/Verified
<i>orf19.2546</i>	<i>TRP2</i>	0.43	Putative anthranilate synthase with a predicted role in tryptophan biosynthesis; regulated by Gcn2p and Gcn4p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6748</i>		0.42	Ortholog(s) have role in ascospore formation. cellular response to caffeine	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7610</i>	<i>PTP3</i>	0.42	Protein not essential for viability; similar to <i>S. cerevisiae</i> Ptp3p. which is a protein tyrosine phosphatase; hyphal induced; alkaline upregulated; regulated by Efg1p. Ras1p. cAMP pathways	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7304</i>		0.42	Hap43p-induced gene; expression is upregulated early upon infection of reconstituted human epithelium (RHE). while expression of the <i>C. dubliniensis</i> ortholog is not upregulated; not required for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4966</i>	<i>AGC1</i>	0.42	Putative mitochondrial carrier protein; transcription is alkaline upregulated	ORF/Verified
<i>orf19.2248</i>	<i>ARE2</i>	0.42	Acyl CoA:sterol acyltransferase (ASAT); uses cholesterol and oleoyl-CoA substrates; protoberberine derivative drug inhibits enzyme activity; 7 putative transmembrane regions; ketoconazole-induced; Hap43p-repressed; biofilm-induced	ORF/Verified
<i>orf19.4444</i>	<i>PHO15</i>	0.42	Putative 4-nitrophenyl phosphatase. possible histone H2A phosphatase; involved in regulation of white-opaque switching; hyphal downregulated; induced in core stress response; induced by heavy metal (cadmium) stress via Hog1p	ORF/Verified
<i>orf19.3682</i>	<i>CWH8</i>	0.42	Putative dolichyl pyrophosphate (Dol-P-P) phosphatase; ketoconazole-induced; expression is increased in a fluconazole-resistant isolate; clade-associated gene expression; Hap43p-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1777</i>	<i>UBP15</i>	0.42	Ortholog(s) have ubiquitin-specific protease activity. role in endocytosis. protein deubiquitination. regulation of protein kinase activity and Cell Div. site. cytosol. nucleus. peroxisome. transport vesicle localization	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.4760</i>		0.41	<i>S. cerevisiae</i> ortholog HPM1 has protein-histidine N-methyltransferase activity. has role in peptidyl-histidine methylation. to form tele-methylhistidine and localizes to nucleus. cytoplasm	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6229</i>	<i>CAT1</i>	0.41	Catalase; resistance to oxidative stress. neutrophils. peroxide; role in virulence; regulated by iron. ciclopirox. fluconazole. carbon source. pH. Rim101p. Ssn6p. Hog1p. Hap43p. farnesol. core stress response; stationary phase-enriched	ORF/Verified
<i>orf19.5170</i>	<i>ENA21</i>	0.41	Predicted ORF similar to <i>S. cerevisiae</i> sodium transporters <i>Ena1p</i> and <i>Ena5p</i> ; <i>Gcn4p</i> -regulated; flucytosine. amphotericin B. or ketoconazole-induced; osmotic stress-induced; overlaps <i>orf19.5170.1</i> . which is annotated as a blocked reading frame	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1260</i>	<i>LEA1</i>	0.41	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> <i>Lea1p</i> ; transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.7020</i>	<i>KEX1</i>	0.40	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> <i>Kex1p</i> . which is a pheromone-processing peptidase; possible <i>Kex2p</i> substrate	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3160</i>	<i>HSP12</i>	0.40	Heat-shock protein; induced upon osmotic/oxidative/cadmium stress. fluphenazine treatment. low iron. CDR1 and CDR2 overexpression. or <i>ssn6</i> or <i>ssk1</i> homozygous null mutation; repressed by <i>Hog1p</i> . flucytosine. elevated CO ₂	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6000</i>	<i>CDR1</i>	0.40	Multidrug transporter of ATP-binding cassette (ABC) superfamily; transports phospholipids in an in-to-out direction; transcription induced by beta-estradiol. progesterone. corticosteroid. or cholesterol; repressed in young biofilms	ORF/Verified
<i>orf19.3225</i>	<i>CWH43</i>	0.40	Putative sensor/transporter protein with a predicted role in cell wall biogenesis; transcription is downregulated in both intermediate and mature biofilms; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5825.1</i>		0.40	<i>S. cerevisiae</i> ortholog YOS1 has role in ER to Golgi vesicle-mediated transport and localizes to ER to Golgi transport vesicle. integral to Golgi membrane. endoplasmic reticulum membrane	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6317</i>	<i>ADE6</i>	0.40	5-Phosphoribosylformyl glycinamide synthetase. enzyme of adenine biosynthesis; not induced in GCN response. in contrast to the <i>S. cerevisiae</i> ortholog; protein only detected in stationary phase yeast-form cultures	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1323</i>	<i>APL6</i>	0.40	Phosphorylated protein of unknown function; <i>Hap43p</i> -repressed gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6769</i>		0.40	<i>S. cerevisiae</i> ortholog OCA5 localizes to cytoplasm	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1517</i>	<i>ARO3</i>	0.40	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase; aromatic amino acid	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			biosynthesis; GCN-regulated; feedback-inhibited by phenylalanine if expressed in <i>S. cerevisiae</i> ; Aro3p and Aro4p catalyze same reaction; decreased in stationary phase	
<i>orf19.5171</i>	<i>PMT1</i>	0.40	Protein mannosyltransferase (PMT). required for virulence in mouse systemic infection and for adhesion to epithelial cells; role in hyphal growth and drug sensitivity; Als1p. Sec20p. Kre9p. Pir1p are substrates; one of 5 PMT family members	ORF/Verified
<i>orf19.4506</i>	<i>LYS22</i>	0.39	Putative homocitrate synthase; fungal-specific (no human or murine homolog); repressed by nitric oxide and by hypoxia; protein level decreases in stationary phase cultures; induced by ketoconazole	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.922</i>	<i>ERG11</i>	0.39	Lanosterol 14-alpha-demethylase. cytochrome P450 family member. role in ergosterol biosynthesis; target of azole antifungals; may contribute to drug resistance; azole- or biofilm-induced; drug treated biofilm induced; hypoxia regulated	ORF/Verified
<i>orf19.135</i>	<i>EXO84</i>	0.39	Predicted subunit of the exocyst complex. involved in exocytosis; localizes to a crescent on the surface of the hyphal tip	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3616</i>	<i>ERG9</i>	0.39	Putative farnesyl-diphosphate farnesyl transferase (squalene synthase) involved in the sterol biosynthesis pathway; likely to be essential for growth; regulated by fluconazole and lovastatin; amphotericin B. caspofungin repressed	ORF/Verified
<i>orf19.4704</i>	<i>ARO1</i>	0.39	Putative pentafunctional arom enzyme; fungal-specific (no human or murine homolog); Gcn2p-. Gcn4p-regulated	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5627</i>		0.39	Hap43p-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3480</i>	<i>RSM23</i>	0.39	<i>S. cerevisiae</i> ortholog RSM23 has structural constituent of ribosome and localizes to mitochondrial small ribosomal subunit	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3646</i>	<i>CTR1</i>	0.39	Copper transporter; transcribed in limited copper; induced by biofilm. Mac1p. Tye7p. macrophage interaction. alkaline pH via Rim101p; 17-beta-estradiol downregulated; complements <i>S. cerevisiae</i> ctr1 ctr3 copper transport mutant	ORF/Verified
<i>orf19.6116</i>	<i>GLK4</i>	0.39	Putative glucokinase; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5750</i>	<i>SHM2</i>	0.39	Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase; complements glycine auxotrophy of <i>S. cerevisiae</i> shm1 shm2 gly1-1 triple mutant; antigenic in human; soluble protein in hyphae; farnesol-upregulated in biofilm; stationary-phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.7466</i>	<i>ACC1</i>	0.39	Putative acetyl-coenzyme-A carboxylases; regulated by Efg1p; amphotericin B repressed; caspofungin repressed; intron in	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			5'-UTR; gene used for strain identification by multilocus sequence typing; Hap43p-induced gene	
<i>orf19.3496</i>	<i>CHC1</i>	0.38	<i>S. cerevisiae</i> ortholog CHC1 has role in endocytosis	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5178</i>	<i>ERG5</i>	0.38	Putative C-22 sterol desaturase; fungal C-22 sterol desaturases are cytochrome P450 enzymes of ergosterol biosynthesis. catalyze formation of the C-22(23) double bond in the sterol side chain; transposon mutation affects filamentous growth	ORF/Verified
<i>orf19.4758</i>		0.37	Hap43p-repressed gene; alkaline downregulated	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2099</i>	<i>HIR1</i>	0.37	<i>S. cerevisiae</i> ortholog HIR1 has role in transcription elongation from RNA polymerase II promoter. regulation of transcription from RNA polymerase II promoter. DNA replication-independent nucleosome assembly	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1738</i>	<i>UGP1</i>	0.37	Protein similar to UTP-glucose-1-phosphaturidyl transferase; localizes to cell surface of yeast-form cells. but not hyphal cells; Hog1p-downregulated; stationary phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.1468</i>	<i>CDC55</i>	0.36	<i>S. cerevisiae</i> ortholog CDC55 has role in cell shape checkpoint. pseudohyphal growth. negative regulation of exit from mitosis. mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint. regulation of translation	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.989</i>		0.36	<i>S. cerevisiae</i> ortholog MRPS5 has structural constituent of ribosome and localizes to mitochondrial small ribosomal subunit	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1754</i>	<i>CMK2</i>	0.36	Putative calmodulin-dependent protein kinase; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2613</i>	<i>ECM4</i>	0.36	Cytoplasmic glutathione S-transferase; transcription regulated by Nrg1p. Tup1p; induced in core stress response. in <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> null mutant (yeast or hyphal cells); transposon mutation affects filamentous growth; stationary phase enriched	ORF/Verified
<i>orf19.2571</i>	<i>SEC4</i>	0.36	Small GTPase of Rab family; role in post-Golgi secretion; possible C-terminal palmitoylation; downregulated on adherence to polystyrene; localizes to the Spitzenkorper during hyphal growth; functional homolog of <i>S. cerevisiae</i> Sec4p	ORF/Verified
<i>orf19.7021</i>	<i>GPH1</i>	0.36	Putative glycogen phosphorylase with a role in glycogen metabolism; regulated by Ssk1p. Mig1p. Tup1p. Hap43p; fluconazole-induced; localizes to cell surface of hyphae. not yeast cells; stationary phase enriched protein	ORF/Verified
<i>orf19.5674</i>	<i>PGA10</i>	0.36	Plasma membrane protein of heme-iron utilization; allows utilization of hemin and hemoglobin as iron sources in host tissues; predicted GPI anchor; biofilm. hypoxia.	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			ketoconazole. ciclopirox. or hyphal-induced; upregulated by Rim101p at pH8	
<i>orf19.1317</i>	<i>OSH3</i>	0.36	Protein required for wild-type filamentation; has oxysterol binding protein domain and pleckstrin homology motif; overproduction suppresses <i>cph1</i> homozygous null filamentation defect; similar to <i>S. cerevisiae</i> Osh3p	ORF/Verified
<i>CaalfMr16</i>	<i>RRNL</i>	0.35	Mitochondrial ribosomal RNA of the large ribosomal subunit	rRNA
<i>orf19.1796</i>		0.35	<i>S. cerevisiae</i> ortholog YPL113C has oxidoreductase activity. acting on the CH-OH group of donors. NAD or NADP as acceptor and has role in metabolic process	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2172</i>	<i>ARAI</i>	0.35	D-Arabinose dehydrogenase; in dehydro-D-arabino-1.4-lactone biosynthesis; NADP+ cofactor; active toward D-arabinose. L-fucose. L-xylose. L-galactose; inhibited by metal ions. thiol group-specific reagents; induced on polystyrene adherence	ORF/Verified
<i>orf19.6245</i>		0.35	Predicted ORF in Assemblies 19. 20 and 21; regulated by osmotic stress (via Hog1p) and oxidative stress (Hog1p- and Cap1p-independent); transcription is induced in response to alpha pheromone in SpiderM medium	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1153</i>	<i>GAD1</i>	0.35	Putative glutamate decarboxylase; alkaline. macrophage-downregulated gene; amphotericin B induced; transcriptionally activated by Mnl1p under weak acid stress; stationary phase enriched protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2013</i>	<i>KAR2</i>	0.35	Similar to chaperones of Hsp70p family; role in translocation of proteins into the ER; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; protein present in exponential and stationary growth phase yeast cultures	ORF/Verified
<i>orf19.1085</i>	<i>UBC1</i>	0.33	Ortholog(s) have ubiquitin-protein ligase activity and role in ER-associated protein catabolic process. protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process. vesicle organization	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.3527</i>	<i>CYT1</i>	0.33	Cytochrome c1; transcriptionally regulated by iron; expression greater in high iron; alkaline downregulated; possibly an essential gene. disruptants not obtained by UAU1 method; Hap43p-repressed gene	ORF/Verified
<i>orf19.5746</i>	<i>ALAI</i>	0.33	Alanyl-tRNA synthetase; translational regulation generates cytoplasmic and mitochondrial forms; Gcn4p-regulated; repressed by amino acid starvation (3-AT); translation-related genes downregulated upon phagocytosis by murine macrophages	ORF/Verified
<i>orf19.1857</i>	<i>SPT1</i>	0.33	Protein not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5519</i>	<i>GCVI</i>	0.33	Putative T subunit of glycine decarboxylase; transcription is negatively regulated by Sfu1p	ORF/Uncharacterized

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
<i>orf19.767</i>	<i>ERG3</i>	0.32	C-5 sterol desaturase; introduces C-5(6) double bond into episterol in ergosterol biosynthesis; clinically-isolated homozygous null mutants show azole resistance. defects in hyphal growth and virulence; Efg1p-repressed; fluconazole-induced	ORF/Verified
<i>orf19.2364</i>	<i>MIS11</i>	0.32	Similar to precursor of mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase; putative protein of glycine catabolism; downregulated by Efg1p; fluconazole-induced; stationary phase enriched protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.744</i>	<i>GDB1</i>	0.32	Putative glycogen debranching enzyme; expression is regulated upon white-opaque switching; regulated by Nrg1p. Tup1p	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2989</i>	<i>GOR1</i>	0.32	<i>S. cerevisiae</i> ortholog GOR1 has glyoxylate reductase activity. has role in glyoxylate catabolic process and localizes to nucleus. mitochondrion	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6602</i>		0.32	<i>S. cerevisiae</i> ortholog COQ9 has role in ubiquinone biosynthetic process. aerobic respiration and localizes to mitochondrial inner membrane	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6640</i>	<i>TPS1</i>	0.31	Trehalose-6-phosphate synthase; role in hyphal growth and virulence in mouse systemic infection; upregulated in presence of human neutrophils; macrophage/pseudohyphal-repressed after 16h; stationary phase enriched protein; Hap43p-repressed	ORF/Verified
<i>orf19.1295</i>	<i>VAS1</i>	0.30	Putative tRNA-Val synthetase; genes encoding ribosomal subunits. translation factors. and tRNA synthetases are downregulated upon phagocytosis by murine macrophage	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2762</i>	<i>AHP1</i>	0.30	Putative alkyl hydroperoxide reductase; immunogenic in mouse; biofilm-induced; fluconazole-induced; amphotericin B. caspofungin. alkaline downregulated; induced in core stress response; regulated by Ssk1p. Nrg1p. Tup1p. Ssn6p. Hog1p. Hap43p	ORF/Verified
<i>orf19.2821</i>		0.30	Hap43p-repressed gene; repressed by nitric oxide	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.1549</i>		0.29	Plasma membrane-associated protein identified in detergent-resistant membrane fraction (possible lipid raft component); repressed by nitric oxide; predicted transmembrane helix	ORF/Verified
<i>orf19.7284</i>	<i>ASR2</i>	0.29	Gene regulated by cAMP and by osmotic stress; greater mRNA abundance observed in a <i>cyr1</i> or <i>ras1</i> homozygous null mutant than in wild type; stationary phase enriched protein	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2672</i>	<i>NCP1</i>	0.27	NADPH-cytochrome P450 reductase. acts with Erg11p in sterol 14 alpha-demethylation in ergosterol biosynthesis; subject to hypoxic regulation; ketoconazole-induced; caspofungin	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			repressed	
<i>orf19.4513</i>		0.27	Protein not essential for viability	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.6139</i>	<i>FRE7</i>	0.26	Protein similar to ferric reductase Fre10p; transcription is downregulated in response to treatment with ciclopirox olamine or 17-beta-estradiol; transcriptionally induced by alkaline conditions or interaction with macrophage	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.557</i>		0.26	Hap43p-repressed gene; planktonic growth-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2947</i>	<i>SNZ1</i>	0.25	Stationary phase protein; soluble in hyphae; induced on yeast to hyphal switch. in response to 3-aminotriazole. or in azole-resistant strain overexpressing MDR1; regulated by Gcn4p. macrophage; no human/murine homolog	ORF/Verified
<i>orf19.6712</i>		0.24	<i>S. cerevisiae</i> ortholog SGM1 localizes to Golgi apparatus. COPI-coated vesicle	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.4777</i>	<i>DAK2</i>	0.24	Putative dihydroxyacetone kinase; transcription decreases upon yeast-hyphal switch; fluconazole-induced; caspofungin repressed; protein enriched in stationary phase yeast cultures; biofilm- and planktonic growth-induced gene	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.5288</i>	<i>IFE2</i>	0.24	Putative alcohol dehydrogenase; decreased expression in hyphae compared to yeast-form cells; Efg1p-regulated; fluconazole-induced; Hog1p-induced; increased expression in response to prostaglandins	ORF/Uncharacterized
<i>orf19.2608</i>	<i>ADH5</i>	0.24	Putative alcohol dehydrogenase; regulated by white-opaque switching; fluconazole-induced; antigenic in murine infection; regulated by Nrg1p. Tup1p; Hap43p-repressed. macrophage-downregulated protein; biofilm- and planktonic growth-induced	ORF/Verified
<i>orf19.2531</i>	<i>CSP37</i>	0.23	Plasma membrane. hyphal cell wall protein; role in progression of murine systemic infection; predicted P-loop. divalent cation binding. N-glycosylation sites; expressed in yeast and hyphae; hyphal downregulated; stationary-phase enriched	ORF/Verified
<i>orf19.3554</i>	<i>AAT1</i>	0.23	Putative aspartate aminotransferase; soluble protein in hyphae; macrophage-induced protein; alkaline upregulated; amphotericin B repressed; gene used for strain identification by multilocus sequence typing; farnesol-. Hap43p-induced	ORF/Verified
<i>orf19.986</i>	<i>GLY1</i>	0.22	L-threonine aldolase; possibly tetrameric; complements glycine auxotrophy of <i>S. cerevisiae</i> <i>shm1 shm2 gly1-1</i> triple mutant; macrophage/pseudohyphal-induced; the GLY1 locus has an RFLP and is triploid in strain SGY269; biofilm-induced	ORF/Verified
<i>orf19.3548.1</i>	<i>WH11</i>	0.19	Cytoplasmic protein expressed specifically	ORF/Verified

ORF	Genename	"fold-change"	Description	Verification
			in white phase yeast cells; expression in opaque cells increases virulence and frequency of opaque-to-white switching; null mutant has wild-type switching; Hap43p. hypoxia and ketoconazol induced	
<i>orf19.4716</i>	<i>GDH3</i>	0.19	NADP-glutamate dehydrogenase; hyphal downregulated; regulated by Nrg1p. Plc1p; Efg1p-downregulated; upregulated by Rim101p at pH 8; ciclopirox. ketoconazole induced; repressed by hypoxia; protein present in exponential and stationary phases	ORF/Uncharacterized

9.2 Sequenzen der Transformanten aus dem Hefe Zwei-Hybrid-Analysen

p1-2GAD

TTTGGGCCCTATACACTACATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAA
 GATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCAGGGGGATCCATCGGAG
 GCGGTCTCCTCTGATCCAGCAGAAAAGAACTTTCAAACAAGGAGTTGAAAGAA
 TTGAAAAAGAAGGAAAAGGCAGCCAAAAGAGCAGCCCAGAAGGAAGCCATTGG
 GATCACTCCAGAACAACAAAAGAAAATAGCCGAACAAAAGATTGAAAAGAAGA
 AGCAGCAACAACTACATCAGCATCAAATGTAAAGAAACAATTGAACCAAATA
 TTGTCAAAGACGAAAGAAAAGTTCCAGCTTTATTTGGCCATTTAGAGACTCGTGA
 ACAAGAAATGCCGCATCACCAACTATTTCCAATGTTGTACATCCTACCATCTTGT
 CCCTAACATTGAAATATTCTAGTTACAAAGTTGTGGGATCAAGTTCAAGATTGAG
 CAACATGTTACAAGCTTTTAAACAAGTGATCCAAGATTATTCAACCCCTGAGAAC
 AACACATTGACTAGACATTTGACAGCTCACTTATCCCATCAAATTGAATTCTTGA
 AAACGGGCCGTCCTTTATCAGTTTCTATGGGTAATGCAATCAGATGGTTGAAACA
 AGAAATATCTGTGATTTCAATTGATACTTTAGAAGCCAAAGCTAAAGAAATACTA
 TGCACAAAGATTGATGATTTCAATTAAGGAAAAAATCGTTCTTTCTGATCGTTTGT
 TGTGGATTGAGCTTCAAGACATATTTGTAATGGGTCTACTATTTTAACTTATGGCC
 ACTCACAAGTATTAGAAGAGTTGTTTAAATATTGTGTCGTTGAACAAGGTAAAAA
 ATTCAATTTAATAATTGTGGATTCTCGACCTTTATTTGAAGGGAAGAAATTATTGA
 AAAACTTGGTGAGTACATCTTTGGAAGAAAAGGTTGAAACAATTCTGTTTCTAG
 TTTGACAATGGAAAAGGTCCCAATTACACAAAGTCACATTAGTGTTCAATATGTT
 CTTATCAATGCCTTGTGTCATCAACTCTTTTAGAAGATGTGGATTGGGGGGTTTTTGG
 GTGCCATGCAATGGTATCCAATGGACGTCTTACTCCAGAGGGGTACTGGTTTG
 ATCGCTATGATGAGTCACACCAAAAATATCCCGATGTCGACCTGGAAAGATCTAT
 GAATCGTAGATACTGGAAAACCCCGCAAGTTCCTTCAACTGGGGATCGGGGACC
 ATTCCAATCTTTTCAATTTAACACCGGTTTGGCTTCTTTATGGAAATAACCCCTCTC
 AGTTCAACCTGGGCGATGGACCCTCGGATCTAAAAATTTTTTAAAGGCAAAAATT
 AAGGCCCTCTTTTTTTGGGACCAATTTCTTCGAAAATATAACAAGGGGTTTCAA
 AAGTTTGGATCTTTCGCCAAGTTGGGTGCACTCCCATCAAGGGGTGCCGGGTTCA
 CTCTCGAAAAATAAAAAAGGAGGGGGGGCCCTTTGGGGAGGTTTTTTGGTCCTCT
 CAAAAACTCTCTGTTTGTGTTTTTT

p1-4GAD

TTTTTCCGTATACACTACATGGGAGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAAGA
TACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCTGGGGGATCCATCGAGCTC
TCACTTAATCTGAACGCATCAACACCACTGGAAGCCGCAACAATATCACCATCAA
GATCTTCAACATCATTCTCGTTATCGTTATCCTTTTCAAATGAGGCTTTGTCAAT
GACGAAAAAATTGTAGCTTCCGTATTGGTTTCACTCAGCTCTTTCAGTGTATTTGA
GCGAGAAGTTAAGGGTGTGGAAGATGAAGAGCTGCTTCCCTTTCCCGAACTACTT
TGCTTAATTGATTGCACTTTATCCTTGTGGGTAICTCATGATTTCTTGTACTATGTTA
TCTCCTAAAATAAATATGGTTGTTGTATAGAATAGACAATTCTATTCATATGATA
GAGCTTGTATGAGGATCTCAAACCTTTTTATTGTGTTCTCGGTAATCTGTCCTC
GTTTTTCGATTTCCACCTCAATTAATTCTTTTACCAAAGAATAAGTTACATAAAAA
TTATCCAACCCCTTATTTGCACAGTGGGAGATATACCTTCTTATTTGATAAAGATA
TTTCTCTTGAGTTTCCGATGTGCGACCTGCAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAA
AAACCCCGCAAGTTCACCTTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATT
TATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACTATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGC
CATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCATCTTT
TTTTTGACCTAAATTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTTT
GGACTTCTTCGCCAAAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCTA
CCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAAGATAC
GTTGTTGAACCTTCTAAATAAGCGAATTTCTTAAGAATTAAGGATTTTTATTATTA
AATAAAGTTAATAAAAAAATAAAGTGGTATACAAATTTTTAAAGGGGACTCTTA
AGGTTTTAAACGGAAAATTCTTAATTCTTGGAGTAACCTTTTCCCTGGAAGGTCA
AGGTTGCTTTCTCCAGGGTAAGGCATGGAGGGCCGCCTTTATTGGACCAACCCTT
TACCGGGGATGGCGGGTCAGAAATTCCCCTTACCCTTAGGACAAATTCCCATTTT
GGAAATTTCCGGGGCCTTTCCATAAAGAATTTCCCTTTTAAAGGGTTTTTGTCCA
AAATTCTAAAAAAGGAAAACCTTTTTTAAACGAAGGATTTTTTCTAAATCTT
TCCCCGGAAGGGCTTCCCCGAACCTTCTTGGGGGAGGTGGTGGGGACACCCAAC
AAATACCCACGCTCTTTGGAAAGCCGGTTGCCAAAACCTTTTTTAAATGGGGT
CTTTTAAAGGGGGCTCCCCTCTTCCCCGGGGGAAATTAAGGATATTTTAAA
ACAC

p1-6GAD

TTTTTACGGATACACTACATGGATGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGAT
ACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCTGGGGGATCCATCGGAGGCG
GTCTCCTCTGATCCAGCAGAAAAGAACTTTCAAACAAGGAGTTGAAAGAATTG
AAAAGAAGGAAAAGGCAGCCAAAAGAGCAGCCAGAAGGAAGCCATTGGGAT
CACTCCAGAACAACAAAAGAAAATAGCCGAACAAAAGATTGAAAAGAAGAAGC
AGCAACAACTACATCAGCATCAAATGTAAAGAAACAATTGAACCAAACTATTG
TCAAAGACGAAAGAAAAGTTCCAGCTTTATTTGGCCATTTAGAGACTCGTGAACA
AAGAAATGCCGCATCACCAACTATTTCCAATGTTGTACATCCTACCATCTTGTCCC
TAACATTGAAATATTCTAGTTACAAAGTTGTGGGATCAAGTTCAAGATTGAGCAA
CATGTTACAAGCTTTTTAAACAAGTGATCCAAGATTATTCAACCCCTGAGAACACA
ACATTGACTAGACATTTGACAGCTCACTTATCCCATCAAATTGAATTCTTGAAAA
CGGGCCGTCTTTATCAGTTTCTATGGGTAATGCAATCAGATGGTTGAAACAAGA
AATATCTGTGATTTCAATTGATACTTTAGAAGCCAAAGCTAAAGAAATACTATGC

ACAAAGATTGATGATTTTCATTAAGGAAAAAATCGTTCTTTCTGATCGTTTGATTGT
GGATTCAGCTTCAAGACATATTTGTAATGGGTCTACTATTTTAACTTATGGCCACT
CACAAGTATTAGAAGAGTTGTTTAAATATTGTGTCGTTGAACAAGGTAAAAAATT
CAATTTAATAATTGTGGATTCTCGACCTTTATTTGAAGGGAAGAAATTATTGAAA
AACTTGGTGAGTACATCTTTGGAAGAAAAGGTTGAAACAAATTCTGTTTCTAGTT
TGACAATGGAAAAGGTCCCAATTACACAAAAGTCACATTAGTGTTCAATATGTTCT
TATCAATGCCTTGGCATCAACTCTTTTAGAAGATGTGGATTGGGTGGTTTTTGGGT
GCCCATGCAAGGTTATCCAATGGACGTCTTTACTCCAGAGGGGTACTGCTTTGAT
CGCTATGATGAGTCCACCCAAAATATCCCGATGTCGACCTGCAAGATCTATTGAT
CGTAAACTGGAAAACCCCGAAGTTCATTTAACTGGGCATCGGGGCCAATCCAA
TTTCTTCATTTAACACCGGTTTGCCTCCTTTATGGAACATACCCCTCAAGTTCAA
CTTGGGCCAGTAACCCCGAATTAAGAATTTTTAAAAGGCAAAAATAAGGCCTCT
TTTTTTGGCCAAATCTTTCGAGAAATTACCAGGGGTTCAAAGACTTGGATTTTCCC
CAAGGTGGGAAGCTCCCAAAGGTGGGGCCGGTTCTTCGCAATATAAAAAGAGAA
GAGAACTTGGGAATTTT

p1-8GAD

TTAATAACCGTATACACTACATGGATGATGTAATAACTATCTATTCGATGATGAA
GATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCGGGGGATCCATCGAGC
TCTCACTTAATCTGAACGCATCAACACCACTGGAAGCCGCAACAATATCACCATC
AAGATCTTCAACATCATTCTCGTTATCGTTATCCTTTTCAAATGAGGTCTTTGTCA
ATGACGAAAAAATTGTAGCTTCCGTATTGGTTTCACTCAGCTCTTTCAGTGTATTT
GAGCGAGAAGTTAAGGGTGTGTAAGATGAAGAGCTGCTTCCCTTTCCCGAACTAC
TTTGCTTAATTGATTGCACTTTATCCTTGTGGGTACTCATGATTTCTTGTACTATGT
TATCTCCTAAAATAAATATGGTTGTTGTATAGAATAGACAATTCTATTCATATGA
TAGAGCTTGTTTATGGAGGATCTCAAACCTTTTTATTGTGTTCTCGGTAATCTGTCC
TCGTTTTTCGATTTCCACCTCAATTAATTCTTTTACCAAAGAATAAGTTACATAAA
AATTATCCAACCCCTTATTTGCACAGTGGGAGATATACCTTCTTATTTGATAAAGA
TATTTCTCTTGAGTTTCCGATGTCGACCTGCAGAGATCTATGAATCGTAGATACTG
AAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCA
TTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTG
GCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCATCT
TTTTTTTGGACCTAAATTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAGAAGCT
TTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTC
TACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATA
CGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTTATGATTTTTATTATTA
AATAAGTTATAAAAAAATAAAGTGGTTACAAATTTTAAAGGGGACTCTAAGGTTT
TAAAACGAAAATTCTTATTCTTGAATAACTCTTTCCTGGAAGGTCAGGGTGGCTTT
CTCAGGGTAAAGCATGGAGGTCCGTCCTTAATGGACCAACCCTTTACCGGGCATG
CCCGTCCGAAATTTCCCTTACCCTAAGAACAATATTCCAATTTTGGAAATTCCG
GGGCCGTTTCTATAAAGAATTTCTTTTTTAAAGGTTTATGGCCAAATATCCAAAA
AAAAAGAAAATCTTTTTTAAAGCAAGGATTTTCTTTAAATTTTTCTCGGGCAGGCAT
CTCCCGAATCCTGGGGGGTAGTTTGGGAAACCCCTAATATACACCCTTTTGGAA
ACCCGGGGGCCAAAACCTTTTTTAAAGGGCCTTCTAGGGGGCTCCCCCTTTTTCC

GGGGGAGTATTAAGAGAATTTATATAACCTTTCCCGCCACAAAAAAAAAAGGGG
GGTAGGGGGGGGGTATTTATCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAAGAAAAAACGT

p2-0GAD

TTTTTTTCCGGATAACCTACATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAA
GATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCGGGGGATCCATCGGAG
GCGGTCTCCTCTGATCCAGCAGAAAAGAACTTTCAAACAAGGAGTTGAAAGAA
TTGAAAAAGAAGGAAAAGGCAGCCAAAAGAGCAGCCCAGAAGGAAGCCATTGG
GATCACTCCAGAACAACAAAAGAAAATAGCCGAACAAAAGATTGAAAAGAAGA
AGCAGCAACAACTACATCAGCATCAAATGTAAAGAAACAATTGAACCAAATA
TTGTCAAAGACGAAAAGAAAAGTTCCAGCTTTATTTGGCCATTTAGAGACTCGTGA
ACAAAGAAATGCCGCATCACCAACTATTTCCAATGTTGTACATCCTACCATCTTGT
CCCTAACATTGAAATATTCTAGTTACAAAGTTGTGGGATCAAGTTCAAGATTGAG
CAACATGTTACAAGCTTTTAAACAAGTGATCCAAGATTATTCAACCCCTGAGAAC
ACAACATTGACTAGACATTTGACAGCTCACTTATCCCATCAAATTGAATTCTTGA
AAACGGGCCGTCCTTTATCAGTTTCTATGGGTAATGCAATCAGATGGTTGAAACA
AGAAATATCTGTGATTTCAATTGATACTTTAGAAGCCAAAGCTAAAGAAATACTA
TGCACAAAGATTGATGATTTCAATTAAGGAAAAAATCGTTCTTTCTGATCGTTTGT
TGTGGATTCAGCTTCAAGACATATTTGTAATGGGTCTACTATTTAACTTATGGCC
ACTCACAAGTATTAGAAGAGTTGTTTAAATATTGTGTCGTTGAACAAGGTAAAAA
ATTCATTTAATAATTGTGGATTCTCGACCTTTATTTGAAGGGAAGAAATTATTGA
AAAATTTGGTGAGTACATCTTTGGAAGAAAAGGTTGAAACAAATTCTGTTTCTAG
TTTGACAATGGAAAAAGGTCCCAATTACACAAAGTCACATTAGTGTTCAAATGT
TCTTATCAATGCCTTGTCACTCACTTTTAGAAAATGTGGATTGGGGGGTTTTTG
GGGTGCCCATGCCAAGGTTATCCAATGGGACGTCTTTACTCCCAGATGGGGTACT
GGCTTTGATCGCTATGATGAGTCCAACCAAAAATATCCCGATGGCCACCTGGCAA
GAATCTATGAATCCGAAAAACCGGAAAAACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTG
GCATCGGGGCACAATCCCAATTTCTTTCCATTTAAACAACGGGTTTGCCTTCTTTT
AAGGAACCAATACCCCCCAAGGTTCCAACCTTGGGCCAGGGAACCCCTCGAATC
TAAAAGATTTTTTAAAGGGCCCAAAAAATAAGGCCCCACTTTTTTTTTGGGCCCA
AATTTTCCCGAGAAAAAATTAACCAGAGGGCTTTTTTCAAAAAACTTTTGGACT
TTTTCCCCCAAAGGGTGGGTGGCGACCTCCACAAAAGGTGTTGGCGGTTTGCT
CATTCCCCGAAATAATCTAAAAAAGGAGAAGAAGGGGGACTCTTTTTTGGGG
AACACTGGTGT

p2-3GAD

GGTACCTACATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCAC
CAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCGGGGGATCCATCGGTGTTTTTATTCC
GAAAGTCAACGAATTTCTTGATCTTGGGGTATTGTTGAAAAGTTGAAATTGGT
TGACCATCTTCTGAAATCGCATTGCTGGAATCCATTAGAAATGCAGATAATGGAC
GAGAACGTGAAGTAGCACTATTTGAATTTGCTCGACCAATTCTTGGTGAGTTGGT
TAGCGATGAATTTGAATATCGTCTAGGTGAACCATTGTTACTGTTGCTATTATTAT
AGTAATCGACAAATGGCTCTGTTGTGTCGTTTAAAGAATCGGTGCAAAAATTTGC
ACTTGACAACATTCAAAATTACTAGCCGATGACGTGTCATTGGGGACAAAAGCT
TCCTCAATGTGAATAGACGGTGACATAGGATTAATTTGAGAATCTTGTGGTATCT

GTATTTGTGGAATTTCAAATTATTCGTCATTGGGGTATCACTTGTATCTGAAACT
 GCACTTTCTGTTTCAAAGCTTCATTCAATGCCGGTTGAATCCAAGAATACTGTGA
 TTGCATTAATAAAGAGCTATGTGAACTACAATCCATTAGCACAAGATGAAGACTT
 TATCGACGATGAAGAAGACGATATTTCTTTTAGTGACGATGAACAGGAAGACGA
 CGGCGATGGTGAGAATGACGGATCATGGAAATTGAGAGCTAAGGCAACGATTTT
 GACCAGAGCACTTCTCAAGAGTTTCCCTGATACACTTGAGCTTCTTTCAAAGGAG
 GTGTTACCCGTATTTTCATTTGCCGATTCCAATGATCAAGTGGTTTCTGAAGTCAT
 CAAGAGTAGTATCGCCATAGTGAACCTCGACATCACCTAGGGATTCAACTAATGTG
 AGTGAGCTTTTTCCAATCATAGCTGCACGCATGAAGCTAGCCAAAGAGACGCAAG
 TTCCACTTTTCCCTCAAGCTTGTTGAAAGTTTGAACCGTTTTGACAACACTTCCTTG
 GTGCTTGAAGTATTTAAAATTATAAAGGACAGAAAATTGATTACGTCTGGATCAT
 TTGACTATTTGCAATTCTATTCTAGTACCTTGAAATTCATGACAACCTGGCACCA
 CTAGTCATTTGAACGGAAGGCCGTCAGATTTTATCAAAAACCTTGATGATAAAT
 CCGTTTAAAATGATAACTGGAAAGCTCCAAATGCTTGGAGTTAATTGGTCCATCA
 AGAAAGTCTTGGAAAATTGGGGCCCTATGTG

p2-6GAD

GGAGGCCGTATACACTACACGGAGATGTATATACTATCTATTCGATGATGAAGAT
 ACCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCCGGGGGATCCATCGAGCTCT
 CACTTAATCTGAACGCATCAACACCACTGGAAGCCGCAACAATATCACCATCAAG
 ATCTTCAACATCATTCTCGTTATCGTTATCCTTTTCAAATGAGGTCTTTGTCAATG
 ACGAAAAAATTGTAGCTTCCGTATTGGTTTCACTCAGCTCTTTCAGTGTATTTGAG
 CGAGAAGTTAAGGGTGTGGAAGATGAAGAGCTGCTTCCCTTTCCCGAACTACTTT
 GCTTAATTGATTGCACTTTATCCTTGTGGTACTCATGATTTCTTGTACTATGTTAT
 CTCCTAAAATAAATATGGTTGTTGTATAGAATAGACAATTCTATTCATATGATA
 GAGCTTGTATGAGGATCTCAAACCTTTTTATTGTGTTCTCGGTAATCTGTCCTC
 GTTTTTCGATTTCCACCTCAATTAATTCTTTTACCAAAGAATAAGTTACATAAAAA
 TTATCCAACCCTTATTTGCACAGTGGGAGATATACCTTCTTATTTGATAAAGATA
 TTTCTTGTAGTTTCCGATGTCGACCTGCAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAA
 AAACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATT
 TATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGC
 CATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAATTAATGCCATCTTT
 TTTTTGGACCTAAATTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTTT
 GGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCCGGCTTGTCTA
 CCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACG
 TTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTTATGATTTTATTATTAAT
 AAGTTATAAAAAAATAAGTGGATACAAATTTTAAAGTGACTCTAAGGTTTAAA
 ACGAAAATTCTTATTCTTGAATAACTCTTTCCTGGAGGTCAGGTTGCTTCTCAGG
 TAAAGCATGAGGTCCCTCTTATTGACCAACCCTCTACCGGCATGCCGGTCCGAAAT
 TCCCCTACCCTTAGAACAATTTCCATTTTGGAAATCCGGCCCGTTCCTTAAGGAAT
 TTCTTTTTAAAGGTTATGTCCAAATTTCTTAAAAAAGAAAATCTTTTAAACAAGA
 GTTTCCTAAATCTCTTCGGCAAAGAATCCCGAATTTCTGGGGGGAGGTGTGGAACC
 CCCAAAACACCTTTTTGAACCCGGTGCCACACCATTTTAAATGGCTTCTAAGGG

GGCTATTTCTTCCGGAGAGTTAAAGAATTTTCTAATCTTCGGCACAAAAAAAAG
GGGGGAGGGGGGATTTTCTCTTGGTTTAAGGGGAAAAAACGGGGG

p2-7GAD

TTTTTTTCGGATAACCTACATGGATGATGTATACTATCTATTTCGATGATGAAGA
TACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCTCCGGGGGATCCATCGGTGTT
TTTATTCCGAAAGTCAACGAATTTCTTGATCTTGGGGTATTGTTGAAAACCTGGTTG
AATTGGTTGACCATCTTCTGAAATCGCATTGCTGGAATCCATTAGAAATGCAGAT
AATGGACGAGAACGTGAAGTAGCACTATTTGAATTTGCTCGACCAATTCTTGGTG
AGTTGGTTAGCGATGAATTTGAATATCGTCTAGGTGAACCATTGTTACTGTTGCTA
TTATTATAGTAATCGACAAATGGCTCTGTTGTGTCGTTTAAAGAATCGGTCGAAA
AATTTGCACTTGACAACATTCCAAAATTACTAGCCGATGACGTGTCATTGGGGAC
AAAAGCTTCCTCAATGTGAATAGACGGTGACATAGGATTAATTTGAGAATCTTGT
GGTATCTGTATTTGTGGAATTTCAAATTATTCGTCATTGGGGTATCACTTGTATC
TGAAACTGCACTTTCTGTTTCAAAGCTTCATTCAATGCCGGTTGAATCCAAGAAT
ACTGTGATTGCATTAATAAAGAGCTATGTGAACTACAATCCATTAGCACAAGATG
AAGACTTTATCGACGATGAAGAAGACGATATTTCTTTTAGTGACGATGAACAGGA
AGACGACGGCGATGGTGAGAATGACGGATCATGGAAATTGAGAGCTAAGGCAAC
GATTTTGACCAGAGCACTTCTCAAGAGTTTCCCTGATACACTTGAGCTTCTTTCAA
AGGAGGTGTTACCCGTATTTTCATTTGCCGATTCCAATGATCAAGTGGTTTCTGAA
GTCATCAAGAGTAGTATCGCCATAGTGAACCTCGACATCACCTAGGGATTCAACTA
ATGTGAGTGAGCTTTTTCCAATCATAGCTGCACGCATGAAGCTAGCCAAAGAGAC
GCAAGTTCACCTTTTCTCAAGCTTGTTGAAAGTTTGAACCGTTTTGACAACACTT
CCTTGGTGGCTTGAAGTATTTTAAATTTATAAGGGACAGAAAATTGATTACGTCT
GGATCATTTGACTATTTGCAATTCTATTCCAGTACCTTGAAATTCCATGACAACCT
GCCACCCTAAGTCATTGAACGGATGTCGTCCAAATTTTATCAAAAACCTTGAAGA
AAAATCCGTTTAAAAAGTAAACCGGAAACCTCCAAAGGCTTGAAGTTTATTGGTT
CCACCAAACAAGTTCTTGAAAAATTGGAAGCTTTTGGGGGAATTTTATTGATTAC
ACAGGGGGGAAAATTAAGACCCAATTCCCCCGAACTTGGGGACCCCACTCCCA
AATTGGCTTTTGGGGGAGCGCATCGGGGAAGGCCAAATACCAAAAATTTTTTACG
CGTTTTCCACCCCTTTGTGATTAAGGGAAACCCCAAACCCCCCAATTGTTTTA
TCCAATTTTTTCCCTGCACCCAGAAAGAATTATTTTT

p2-8GAD

TTTTCCCGGATACCTACATGGATGATGTAATAACTATCTATTTCGATGATGAAGAT
ACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTCCTCCGGGGGATCCATCGGAGGCG
GTCTCCTCTGATCCAGCAGAAAAGAACTTTCAAACAAGGAGTTGAAAGAATTG
AAAAAGAAGGAAAAGGCAGCCAAAAGAGCAGCCAGAAGGAAGCCATTGGGAT
CACTCCAGAACAACAAAAGAAAATAGCCGAACAAAAGATTGAAAAGAAGAAGC
AGCAACAACTACATCAGCATCAAATGTAAAGAAACAATTGAACCAAACCTATTG
TCAAAGACGAAAGAAAAGTTCCAGCTTTATTTGGCCATTTAGAGACTCGTGAACA
AAGAAATGCCGCATCACCAACTATTTCCAATGTTGTACATCCTACCATCTTGTCCC
TAACATTGAAATATTCTAGTTACAAAGTTGTGGGATCAAGTTCAAGATTGAGCAA
CATGTTACAAGCTTTTAAACAAGTGATCCAAGATTATTCAACCCCTGAGAACACA
ACATTGACTAGACATTTGACAGCTCACTTATCCCATCAAATTGAATTCTTGAAAA

CGGGCCGTCCTTTATCAGTTTCTATGGGTAATGCAATCAGATGGTTGAAACAAGA
AATATCTGTGATTTCAATTGATACTTTAGAAGCCAAAGCTAAAGAAATACTATGC
ACAAAGATTGATGATTTTCATTAAGGAAAAAATCGTTCTTTCTGATCGTTTGATTGT
GGATTGAGCTTCAAGACATATTTGTAATGGGTCTACTATTTTAACTTATGGCCACT
CACAAGTATTAGAAGAGTTGTTTAAATATTGTGTCGTTGAACAAGGTAAAAAATT
CAATTTAATAATTGTGGATTCTCGACCTTTATTTGAAGGGAAGAAATTATTGAAA
AACTTGGTGAGTACATCTTTGGAAGAAAAGGTTGAAACAAATTCTGTTTCTAGTT
TGACAATGGAAAAGGTCCCAATTACACAAAGTCACATTAGTGTTCAATATGTTCT
TATCAATGCCTTGGCATCAACTCTTTTAGAAGAAGTGGATTGGGGGGTTTTTGGG
TGCCCATGCAATGTTATCCAATGGACGTCTTTACTCCAGAGTGGGTACTGCTTTGA
TCGCTATGATGAGTCCACCAGAAATATCCCGATGTCGACCTGGCAAGATCTATGA
ATCGGAAAACCTGGAAAACCCCGCAAGTTCATTTAACTGGGGATCTGGACCACTCC
AATTCCTTCCATTTAACACCGGTTTGCCTCCTTTATGGAAAAAAACCCCCCAAGTT
CAACTTCGGCCAGGGACCCCGAATTAATAAATTTTAAAGAGCAAGAATAACC
CCCCCTTTTTTGGACACAATCTTCCGGGAAAATTTAAAGAGGGGTTTAAACATT
GGGGTCTTCCCAAGGGTGGGAATCCACACAAAGGGGGCGTGGCTCTTCCGACA
TAATAATAAGAGAGGGAAAGCTTTGTGGGGTGGTGCCTTTCACCTT

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung sowie für die vielen Anregungen und Ideen und insbesondere für seine Geduld während der gesamten Zeit dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Wagner möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korefferats bedanken. Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere der AG Ernst für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und für die lustigen Unternehmungen. Einen speziellen Dank gilt Marc Swidergall für ein mehrjähriges Wechselbad der Empathien, sowie für die jahrelange Mitgestaltung des wohl exzentrischsten Labors (Labor 88) innerhalb der AG.

Bei Mateusz Juchimiuk, Agnes Kowasliki und bei Anna Vecchiarelli bedanke ich mich für die Virulenztests sowie für alle weitere Unterstützung am Projekt.

Einen herzlichen Dank an Daniela Bedürftig, Rene' Geißen und Oliver Hasenau für die Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke meiner ganzen Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Bruder Karsten, für die Unterstützung während meines Studiums.

Vielen herzlichen Dank an alle meine Freunde, vor allem aus Marburg und Bochum, die mich stets unterstützten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Einen besonderen Dank gilt auch meinem Sohn, Maximilian und meiner Freundin Daniela durch die ich oftmals in schweren Situationen den Antrieb fand weiter zu machen.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Sie wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, November 2013