Flavinmononukleotid-basiertes Fluoreszenzprotein als Reporter hypoxischer Genexpression in Pilzen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Isabel Eichhof
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Februar 2014

aus dem Institut für Molekulare Mykologie
Department Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 1
1.2 Der fakultativ humanpathogene Pilz *Candida albicans* 3
1.3 Proteintransportprozesse in Hefen 7
1.4 Reporterproteine 10
1.4.1 Sauerstoffabhängige Fluoreszenzreporter 11
1.4.2 Sauerstoffunabhängige Fluoreszenzreporter 15
1.5 Zielsetzung 18

2 Material & Methoden 19
2.1. Chemikalien, Gase und Enzyme 19
2.2 Verwendete Computerprogramme und Internetseiten 19
2.3 Bakterien- und Hefestämme 19
2.3.1 *E. coli*-Stämme 19
2.3.2 *C. albicans*-Stämme 20
2.3.3 *S. cerevisiae*-Stämme 20
2.4 Medien und Anzucht von Bakterien- und Hefezellen 20
2.4.1 Medien und Anzucht von *E. coli* 20
2.4.2 Medien und Anzucht von *C. albicans* 20
2.4.2.1 Hypheninduktion bei *C. albicans* 21
2.4.3 Medien und Anzucht von *S. cerevisiae* 21
2.4.3.1 Anzucht von *S. cerevisiae* unter hypoxischen Bedingungen 21
2.4.4 Anzucht von Hefezellen unter anaeroben Bedingungen 22
2.5 Plasmide 22
2.5.1 Plasmidkonstruktionen zur cytoplasmatischen Lokalisation von CaFbFP 24
2.5.2 Plasmidkonstruktionen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche 24
2.5.3 Plasmidkonstruktionen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern 25
2.5.4 Plasmidkonstruktionen zur Anwendung von CaFbFP als Biosensor im Cytoplasma 26
2.5.5 Plasmidkonstruktionen zur Anwendung von CaFbFP als Biosensor auf der Zelloberfläche 27
2.6 Oligonukleotide 27
2.7 Methoden zur Arbeit mit Nukleinsäuren 29
2.7.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 29
2.7.2 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae* 29
2.7.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans* 29
2.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* 30
2.7.5 Gelelektrophoretische Trennung von DNA 30
2.7.6 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel 31
2.7.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden 31
2.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) 31
2.7.8.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR 31
2.7.8.2 Gerichtete Mutagenese plasmidkodierter DNA durch PCR 31
2.7.9 Sequenzierung von DNA 32
2.7.10 Restriktion von DNA 32
2.7.11 Auffüllen von 5‘-überstehenden Enden nach Restriktion 32
2.7.12 Ligation 32
2.7.12.1 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA 32

2.7.12.2 Ligation mit dem pGEM-T Vektor System 32
2.7.12.3 Ligation mit „In-Fusion PCR cloning Kit" 32
2.8 Transformation von *E. coli* 33
2.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli* 33
2.8.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli* 33
2.8.3 Test auf Klonierungserfolg in *E. coli* 33
2.8.3.1 Test durch PCR der Kolonie 33
2.8.3.2 Test durch Plasmidpräparation und Restriktion 33
2.9 Transformation von Hefezellen 33
2.9.1 Transformation von *C. albicans* 33
2.9.2 Sphäroplastentransformation von *C. albicans* 34
2.9.3 Transformation von *S. cerevisiae* 35
2.9.4 Transformation gefrorener Zellen von *S. cerevisiae* 35
2.9.5 Klonierung von Vektor und Fragment durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* 35
2.9.6 Test auf Klonierungserfolg in Hefezellen 35
2.10 Proteinbiochemische Methoden 36
2.10.1 Gewinnung von Rohextrakten aus Hefezellen 36
2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 36
2.10.3 Methoden zur Western-Blot-Analyse 36
2.10.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 36
2.10.3.2 Western-Blot (Elektro-Blot) 37
2.10.3 Spaltung von Disulfidbrücken mit Dithithreitol (DTT) 37
2.10.4 Fällung von Proteinen aus Lösungen 38
2.11 Zellbiologische Methoden 38
2.11.1 Immunfluoreszenzmarkierung von Sphäroplasten 38
2.11.1.1 Fixieren von Zellen 38
2.11.1.2 Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten 38
2.11.2 Immunfluoreszenzmarkierung von Hefezellen 39
2.11.3 Färbung von Hefezellkernen mit 4'-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 39
2.12 Detektion von Fluoreszenz 39
2.12.1 Detektion von Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop 39
2.12.2 Detektion von Fluoreszenz mit dem Spinning-Disc-Konfokalmikroskop 39
2.12.3 Vergleichende Fluoreszenzanalyse von Zellausstrichen einer Agarplatte 40
2.12.4 Quantitative Analyse der Fluoreszenz von Rohextrakten und lebenden Hefezellen mittels Fluorometer 40

3 Ergebnisse 41
3.1 Lokalisation von CaFbFP im Cytoplasma von *S. cerevisiae* 41
3.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation verschiedener CaFbFP-Varianten im Cytoplasma 41
3.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaFbFP-Varianten in *S. cerevisiae* 42
3.1.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse von CaFbFP-Varianten in *S. cerevisiae* 44
3.1.4 Effekt der Kofaktor-Zugabe auf die CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz 45
3.1.5 pH-Stabilität von CaFbFP 46
3.2 Lokalisation von CaFbFP im Cytoplasma von *C. albicans* 48
3.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation verschiedener CaFbFP Varianten im Cytoplasma 48
3.2.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaFbFP-Varianten in *C. albicans* 49
3.2.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse verschiedener CaFbFP-Varianten in *C. albicans* 50

3.2.4 Fluoreszenzanalysen von *C. albicans*-Zellen mit Ca*FbFP*-Tandemfusion unter Kontrolle verschiedener Promotoren ... 52
3.2.5 Fluoreszenzanalysen von *C. albicans*-Zellen mit verschiedenen CaFbFP-Varianten ... 53
3.3 Lokalisation von Fluoreszenz in weiteren Zellkompartimenten von *S. cerevisiae* und *C. albicans* ... 54
3.3.1 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* ... 54
3.3.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche ... 55
3.3.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von Aga2-CaFbFP in *S. cerevisiae* ... 56
3.3.1.3 Fluoreszenzanalysen zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP in *S. cerevisiae* ... 58
3.3.1.4 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen mit Multikopie-Plasmid-basierter Expression von *AGA2*-Ca*FbFP* ... 60
3.3.1.5 Nachweis der Proteinsynthese von Aga2-CaFbFP nach Multikopie-Plasmid-basierter Expression ... 60
3.3.1.6 Fluoreszenz von Aga2-CaFbFP bei Multikopie-Plasmid-basierter Expression ... 61
3.3.1.7 Untersuchungen zur Prozessierung von Aga2-CaFbFP ... 62
3.3.2 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *C. albicans* ... 63
3.3.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche ... 63
3.3.2.2 Untersuchung der Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *C. albicans* .. 64
3.3.2.3 Untersuchungen zur Oberflächenlokalisation von CaYFP ... 65
3.3.3 Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *S. cerevisiae* ... 66
3.3.3.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern ... 66
3.3.3.2 Nachweis der Synthese von H2B-CaFbFP in *S. cerevisiae* ... 67
3.3.3.3 Fluoreszenzanalysen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae* ... 67
3.3.4 Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *C. albicans* ... 69
3.3.4.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern ... 69
3.3.4.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaH2B-2xCaFbFP in *C. albicans* 69
3.3.4.3 Fluoreszenzanalysen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP in *C. albicans* ... 70
3.3.5 Markierung von *C. albicans*-Zellkernen mittels „green-RNA“-Technologie . 71
3.3.5.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP mittels green-RNA-Technologie ... 72
3.3.5.2 Fluoreszenzanalysen zur mRNA-Markierung in *C. albicans* ... 73
3.4 Anwendung von CaFbFP als Biosensor ... 75
3.4.1 Anwendung von CaFbFP als Biosensor in *S. cerevisiae* ... 75
3.4.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Expression von *YFP-FbFP*. 75
3.4.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* ... 76
3.4.1.3 Fluoreszenzanalysen Ca*YFP*-Ca*FbFP*-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen ... 77
3.4.1.4 Nachweis von FRET bei CaYFP-CaFbFP ... 79
3.4.1.5 Fluoreszenzanalysen von YFOS bei unterschiedlichen Sauerstoff-bedingungen ... 81
3.4.2 Anwendung von YFOS als Biosensor in *C. albicans* ... 84
3.4.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Expression von

Ca*YFP*-Ca*FbFP* 84
3.4.2.2 Nachweis der Proteinsynthese von YFOS-Varianten in *C. albicans* 84
3.4.2.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse von YFOS-Varianten in *C. albicans* 86
3.4.3 Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae* 87
3.4.3.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von YFOS auf der Zelloberfläche 87
3.4.3.2 Nachweis der Proteinsynthese von Aga2-CaYFP-CaFbFP 88
3.4.3.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse zur Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae* 89
3.4.3.4 Untersuchungen der Oberflächenpräsentation von YFOS mittels Fluoreszenzmikroskopie 91

4 Diskussion 92
4.1 Steigerung der Fluoreszenzintensität durch Mehrfachfusion von CaFbFP 92
4.2 Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Fluoreszenz von CaFbFP in *S. cerevisiae* 94
4.3 Lokalisation von CaFbFP in verschiedenen Hefe-Zellkompartimenten 96
4.3.1 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* 96
4.3.2 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *C. albicans* 98
4.3.3 Lokalisation von CaFbFP im Kern von Hefezellen 99
4.4 Anwendung von CaFbFP als Biosensor für Sauerstoff 101
4.4.1 CaFbFP-basierter Sauerstoffsensor in *S. cerevisiae* 102
4.4.2 CaFbFP-basierter Sauerstoffsensor in *C. albicans* 105
4.4.3 Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae* 106

5 Zusammenfassung 108

6 Summary 109

7 Literaturverzeichnis 110

8 Abkürzungsverzeichnis 126

9 Anhang 129
9.1 YFOS (CaYFP-CaFbFP) –Sequenz 130
9.2 YFOS-2 (CaYFP-2xCaFbFP) –Sequenz 131

1. Einleitung

Hefeartige Pilze beeinflussen das Leben des Menschen auf verschiedene Weise. Apathogene Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* werden zur Erzeugung von Nahrungsmitteln und biotechnologischen Anwendungen eingesetzt. Auf der anderen Seite können pathogene Pilze wie *Candida albicans* Infektionen im menschlichen Körper auslösen, die im schlimmsten Fall sogar tödlich verlaufen. Hefepilze wachsen im Gegensatz zu vielen anderen Organismen unter aeroben und anaeroben Bedingungen und müssen sich daher an unterschiedliche Sauerstoffbedingungen anpassen. Über die regulatorischen Prozesse bei der Adaption an Hypoxie oder Anoxie ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Die Erforschung hypoxischer Mechanismen ist nur eingeschränkt möglich, da die Aktivität verfügbarer fluoreszierender Reporterproteine für Hefe, wie dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dessen Derivaten, sauerstoffabhängig ist (Heim *et al*., 1994). Für Analysen zellulärer Vorgänge sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen bedarf es daher der Entwicklung sauerstoffunabhängiger fluoreszierender Reporter.

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* gehört zu der Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) sowie der Ordnung der Saccharomycetales (echte Hefen) und ist in der Lage, sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. *S. cerevisiae* kommt als haploide und diploide Hefezelle vor und vermehrt sich unter Bedingungen mit ausreichendem Nährstoffangebot asexuell durch Knospung. Dabei bildet sich durch axiale (haploide Zellen) bzw. bipolare (diploide Zellen) Knospung eine Tochterzelle aus, welche eine Kopie des duplizierten Chromosomensatzes der Mutterzelle erhält und nach ausreichendem Wachstum abgeschnürt wird. Unter nährstoffarmen Bedingungen kommt es bei diploiden Zellen zur Meiose und zur Bildung von jeweils vier haploiden Ascosporen. Unter Stickstoffmangel können diploide Zellen neben der einzelligen Hefeform außerdem filamentöses Wachstum in Form von Pseudoyphen aufweisen, indem sie durch bipolares bzw. unipolares Knospen elongierte Zellen ausbilden. Dabei wird die Tochterzelle nicht von der Mutterzelle abgeschnürt und bildet selbst wieder eine Knospe aus (Gimeno *et al*., 1992). Auch haploide Zellen verändern als Antwort auf Glukose-Mangel ihre Morphologie und weisen invasives Wachstum durch Pseudohyphen auf (Cullen & Sprague Jr., 2000). Ascosporen können sich wie diploide Zellen als Hefe durch Knospung vermehren oder bei ausreichenden Nährstoffbedingungen zu einer Zygote verschmelzen. Haploide Zellen besitzen entweder den Paarungstyp *MAT*α oder *MAT*a, wobei Paarung nur zwischen Zellen entgegengesetzter Typen möglich ist. Vor der Paarung sezernieren die Zelltypen spezifische Hormone, die als α- bzw. a-Pheromon oder α- bzw. a-Faktor bezeichnet werden und von Zellen des gegenteiligen Paarungstyps erkannt werden können (Sprague *et al*., 1983). Infolgedessen beginnen die Zellen zu elongieren („Shmoo"-Bildung) und wachsen aufeinander zu, woraufhin der Zellkontakt durch paarungsspezifische Agglutinine der Zelloberfläche vermittelt wird (Fehrenbacher *et al*., 1978). Das Agglutinin der a-Zellen besteht aus den Untereinheiten Aga1 und Aga2, wobei Aga1 die Verankerung beider Proteine in der Hefezellwand bewirkt, wohingegen Aga2 durch eine Adhäsionsdomäne

sowie den C-Terminus den eigentlichen Zellkontakt mit dem α-Agglutinin vermittelt (Roy *et al*., 1991; Cappellaro *et al*., 1994). Das Agglutinin der α-Zellen besteht hingegen nur aus einem Polypeptid (Hauser & Tanner, 1989).

Eukaryotischer Modellorganismus und biotechnologischer Produktionswirt

S. cerevisiae ist einer der am besten untersuchten Organismen und war der erste Eukaryot, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Goffeau *et al*., 1996). Als eukaryotischer Modellorganismus ist die Hefe von großer Bedeutung für die molekularbiologische Forschung und weist bei 6.275 Genen auf 16 Chromosomen etwa 31 % Homologie zum humanen Genom auf (Botstein *et al*., 1997). Dadurch können Untersuchungen zellulärer Mechanismen in *S. cerevisiae* oftmals Aufschluss über ähnliche Vorgänge im Menschen geben. Insbesondere führte die Forschung an dem Zellzyklus, der Zellalterung und dem Vesikeltransport in *S. cerevisiae* zu wichtigen Erkenntnissen, die zur Aufklärung dieser Prozesse im menschlichen Körper beitrugen (Breeden, 2003; Bittermann *et al*., 2003; Südhof 2013). Außerdem dient der Modellorganismus der Erforschung von Krankheiten wie Krebs, Alzheimer oder Parkinson und erwies sich bei Analysen zur Anwendbarkeit verschiedener Medikamente als äußerst nützlich (Yuen *et al*., 2005; Pimentel *et al*., 2012; Spradling *et al*., 2006; Menacho-Marquez & Murguia, 2007). Für die Erforschung von Krankheiten eignet sich *S. cerevisiae* auch durch die Fähigkeit, unter hypoxischen Bedingungen zu wachsen, da beispielsweise neurodegenerative Krankheiten in Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen und in soliden Tumoren Hypoxie herrscht (Pimentel *et al*., 2012; Thomlinson & Gray, 1955). Die Möglichkeit zur Forschung unter hypoxischen Bedingungen in *S. cerevisiae* bietet außerdem Vorteile für Analysen sauerstoffabhängiger Prozesse im Menschen, wie die Wahrnehmung und Reaktion auf Hypoxie (Netzer & Breitenbach, 2010; Braliou *et al*., 2006). In der Natur ist der Hefepilz *S. cerevisiae* vor allem auf Rebenfrüchten wie Weintrauben zu finden und wird aufgrund seiner fakultativ anaeroben Lebensweise in der Lebensmittelindustrie zur Bier- und Weinherstellung sowie als Backtriebmittel verwendet. Auch hier wird sich das anaerobe Wachstum zunutze gemacht, da die Bäckerhefe bei dem fermentativen Stoffwechsel zur Energiegewinnung Glukose zu Ethanol umwandelt (Gärung), wobei außerdem Kohlenstoffdioxid und Wasser entstehen (Fiechter *et al*., 1981). Modifizierte *S. cerevisiae*-Stämme kommen außerdem bei der Produktion sogenannter „Biokraftstoffe“ wie Ethanol und Isobutanol durch anaerobe Fermentation pflanzlicher Rohstoffe (z. B. Rohrzuckermelasse, Maisstärke) zum Einsatz (Periyasami *et al*., 2009; Kondo *et al*., 2002; Chen *et al*., 2011). Als biotechnologischer Produktionsorganismus wird die Hefe auch zur heterologen Expression zahlreicher Gene verwendet (Romanos *et al*., 1992). *S. cerevisiae* ist nicht pathogen und wird als GRAS- („Generally Recognized as safe“) Organismus eingestuft, welcher für den Menschen als gesundheitlich ungefährlich gilt. Daher wird die Hefe für viele Prozesse der pharmazeutischen Industrie, wie zum Beispiel der Produktion des Hepatitis B-Antigens oder sogenannten „virus-like particles“ (VLP) einiger humaner Papillomvirus- (HPV) Typen, genutzt, die der Herstellung von Impfstoffen dienen (Bitter *et al*., 1988; Cook *et al*., 1999). Auch menschliche Hormone wie Insulin, Interferon-alpha oder das Hormon der Nebenschilddrüse hPTH („human Parathyroid Hormone“) werden heterolog in *S. cerevisiae* synthetisiert (Kjeldsen *et al*., 2002; Tuite *et al*., 1982; Kang *et*

al., 1998). In einigen Fällen bietet die Möglichkeit zur hypoxischen Anzucht von *S. cerevisiae*-Zellen auch bei der heterologen Proteinproduktion einen Vorteil. So konnte die Effizienz der Gluko- und α-Amylase-Produktion unter sauerstoffarmen Bedingungen erhöht werden (Cha *et al*., 1997; Liu *et al*., 2013).

1.2 Der fakultativ humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Der fakultativ humanpathogene Hefepilz *C. albicans* gehört wie *S. cerevisiae* zu der Abteilung der Ascomycota sowie der Ordnung der Saccharomycetales und besitzt als diploider Organismus 2 x 8 Chromosomen mit 6.202 Genen. Die Translation dieser Hefe zeichnet sich durch einen speziellen Kodongebrauch aus, bei dem das Basentriplett CUG in die Aminosäure Serin übersetzt wird, wohingegen dieses in den meisten anderen Organismen für ein Leucin kodiert (Santos *et al*., 1993). *C. albicans* gehört als Kommensale zur natürlichen Flora des menschlichen Körpers, so dass in etwa 75 % der gesunden Menschen *Candida*-Spezies nachgewiesen werden können (Ghannoum *et al*., 2010). Dort besiedelt *C. albicans* vornehmlich Schleimhäute des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts, wobei die Zelldichte durch einen Gleichgewichtszustand zwischen der Kolonialisierung der Hefe und dem menschlichen Immunsystem sowie anderen Mikroorganismen beschränkt wird (Hube, 2004). Bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem oder einer gestörten bakteriellen Flora kann sich der opportunistische Pilz dagegen weiter vermehren und Mykosen auslösen. Diese können oberflächlich auf Haut und Schleimhäuten auftreten, bei starker Immunsuppression jedoch auch systemisch und somit lebensbedrohlich sein. Bei systemischen Mykosen kommt es zu einer extensiven Vermehrung des pathogenen Pilzes, welcher sich über die Blutbahn im gesamten Körper ausbreitet und innere Organe befallen kann. Pro Jahr werden weltweit etwa 400.000 lebensbedrohliche Infektionen mit *C. albicans* verzeichnet, wobei die Mortalitätsrate invasiver Mykosen bei 46-75 % liegt (Brown *et al*., 2012). Risikogruppen für systemische Candidosen (Infektionen mit *C. albicans*) stellen vor allem Krebs-, Diabetes- oder Transplantationspatienten sowie Menschen, die eine Chemotherapie oder eine Behandlung mit Breitband-Antibiotika durchlaufen, dar (Davies *et al*., 2002; Kadir *et al*., 2002; Nicod *et al*., 2001; Odds *et al*., 1989; Wey *et al*., 1989). Für Menschen mit HIV („Human Immunodeficiency Virus“) ist eine Besiedlung mit *C. albicans* aufgrund der stark immunsupprimierenden Auswirkung des Virus besonders gefährlich (Klein *et al*., 1984). Vor kurzem wurde zudem herausgefunden, dass invasive *C. albicans*-Stämme die Adhäsion von Melanom-Tumorzellen an Epithelzellen der Leber begünstigen und indirekt zu der dortigen Entwicklung von Metastasen beitragen (Rodriguez-Cuesta *et al*., 2010). Die Therapie systemischer *C. albicans*-Mykosen und die Suche nach Zielstrukturen für die Entwicklung von Antifungiziden werden durch zellbiologische Gemeinsamkeiten der Hefe mit dem Wirt erschwert. Die wichtigsten Gruppen der derzeit verfügbaren Antimykotika sind die Azole (z. B. Fluconazol, Clotrimazol) und Polyene (z. B. Amphotericin B, Nystatin), deren Angriffspunkte verschiedene Stufen der Ergosterolbiosynthese sind. Ergosterol ist ein wichtiger Bestandteil der Pilz-Zellwand und kommt nicht in menschlichen Zellen vor. Jedoch führte die Einnahme dieser Antimykotika-Klassen in einigen Fällen zu starken Nebenwirkungen sowie der Entwicklung von Resistenzen (Martin, 1999; Pfaller *et al*., 2002). Auf der Hemmung der Ergosterolsynthese beruht auch

die Wirkungsweise der Allylamine (z. B. Naftidin) oder Thiocarbamate (z. B. Tolnaftat). Zielstrukturen anderer Antimykotika sind aber auch weitere Zellwandbestandteile wie Glukan oder Chitin (Candine, Polyoxin) oder die RNA- bzw. DNA-Synthese (Flucyosin, Griseofulvin).

Die Bedeutung von Hypoxie für *C. albicans*

C. albicans ist in der Lage, unter aeroben (20,95 % O_2) und anaeroben (0 % O_2) Bedingungen zu wachsen und sich an verschiedene Sauerstoffbedingungen anzupassen. Im menschlichen Körper besiedelt die pathogene Hefe diverse Regionen, die sich in ihrer Sauerstoffkonzentration unterscheiden und ist dort teilweise hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Hypoxie bezeichnet Bedingungen mit sehr niedrigen O_2-Konzentrationen, im Unterschied zu „normoxischen" Gegebenheiten (20,95 % O_2). Auf Oberflächenstrukturen des menschlichen Körpers wie der Haut oder der Mundhöhle nähert sich die O_2-Konzentration normoxischen Verhältnissen an (Ernst & Tielker, 2009), wohingegen die O_2-Konzentrationen in tieferen Gewebsschichten und Organen deutlich niedriger sind. In Tabelle 1.1 sind die O_2-Konzentrationen einiger Regionen des menschlichen Körpers dargestellt.

Tab. 1.1: Sauerstoffkonzentration in verschiedenen Regionen des menschlichen Körpers.

	pO_2 [%]	Referenz
Arterielles Blut	13,2	Carreau *et al.*, 2011
Niere	9,5 ± 2,6	Müller *et al.*, 1998
Darmgewebe	7,6 ± 0,3	Carreau *et al.*, 2011 und darin enthaltene Referenzen
Lunge	5,6	Le *et al.*, 2006
Venöses Blut	5,3	Carreau *et al.*, 2011
Leber	5,4 ± 0,7	Carreau *et al.*, 2011 und darin enthaltene Referenzen
Gehirn	4,4 ± 0,3	Carreau *et al.*, 2011 und darin enthaltene Referenzen
Muskel	3,8 ± 0,2	Carreau *et al.*, 2011 und darin enthaltene Referenzen
Haut (Dermis)	1,1 ± 0,4	Wang *et al.*, 2003
Cytoplasma (Leberzelle)*	0,1-0,5	Jones, 1986
Mitochondrien (Leberzelle)*	≤ 0,1	Jones, 1986

* Zellen aus der Ratte

Die O_2-Konzentration in der Leber liegt beispielsweise bei nur etwa 5,4 %, im Darmgewebe bei 7,6 % und in den Nieren bei 9,5 %. Venöses Blut weist ebenfalls eine niedrige O_2-Konzentration von 5,3 % auf, und in der Dermis der Haut beträgt diese sogar nur noch etwa 1,1 %. Bei intrazellulärer Besiedlung ist *C. albicans* ebenfalls stark hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, wie zum Beispiel im Cytoplasma oder den Mitochondrien von Leberzellen der Ratte, in denen die O_2-Konzentration weniger als 0,5 % beträgt. Auch solide Tumore zeichnen sich durch ihre intrazelluläre Hypoxie aus

(Thomlinson & Gray, 1955). Die O_2-Konzentration ist dort in der Regel deutlich geringer als in dem umgebenden Gewebe, aus dem der Tumor entstanden ist (Brown & Wilson, 2004). Somit ist auch der Grad der Hypoxie je nach Art des Tumors variabel, wobei der durchschnittliche O_2-Partialdruck bei 1-1,3 % liegt (Höckel & Vaupel, 2001). Tumorzellen wie die des Gebärmutterhalskrebses weisen sogar noch niedrigere Werte (0,7 % O_2) auf (Brown & Wilson, 2004).

Bei Wachstum von *C. albicans* in Biofilmen ist der Pilz in einigen Bereichen dieser Zellgemeinschaften ebenfalls hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (Bonhomme *et al*., 2011; Stichternoth & Ernst, 2009). *C. albicans*-Biofilme bestehen aus Zellen der Hefe- und auch der Hyphenform und bilden sich auf Oberflächen verschiedener Gewebe des menschlichen Körpers sowie auf Kathedern, Implantaten oder Prothesen (Dongari-Bagtzoglou *et al*., 2009; Kojic & Darouiche, 2004). Das Leben in diesen Gemeinschaften hat für die Hefe, im Gegensatz zur planktonischen Lebensweise, viele Vorteile, da Zellen eines Biofilms beispielsweise besser gegenüber Angriffen des menschlichen Immunsystems und der Bekämpfung durch Antimykotika geschützt sind (Douglas, 2003). So ist die Toleranz Biofilm-assoziierter *C. albicans*-Zellen gegenüber bestimmten Antimykotika 30 bis 2.000 mal höher als die planktonischer Zellen, was die Behandlung von systemischen *C. albicans*-Infektionen erheblich erschwert und Analysen der Biofilmbildung zu einem wichtigen Forschungsbereich macht (Hawser & Douglas, 1995). Aufgrund der zahlreichen hypoxischen Bereiche, die von *C. albicans* besiedelt werden, ist die Erforschung der Virulenzmechanismen unter sauerstoffarmen Bedingungen von großer Bedeutung für die Suche nach Zielstrukturen zur Entwicklung von Chemotherapeutika. Der Großteil der bisherigen Erkenntnisse basiert auf Untersuchungen unter normoxischen Bedingungen, wohingegen die Regulation vieler Prozesse unter Hypoxie noch unbekannt ist (Ernst & Tielker, 2009). Es zeigte sich jedoch bereits, dass zahlreiche zelluläre Prozesse unter Hypoxie und Anoxie anders als unter normoxischen Bedingungen reguliert werden. So wird die Expression eines Großteils glykolytischer Gene unter Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen gesteigert, um die fermentative ATP-Produktion zu erhöhen. Auf der anderen Seite werden Gene von Komponenten der Atmungskette, der ATP-Bildung und des Citronensäurezyklus vermindert exprimiert (Setiadi *et al*., 2006). Der Polymorphismus (Abb. 1.1) kann ebenfalls durch Hypoxie reguliert werden und ist der wichtigste Virulenzfaktor von *C. albicans*, welcher der pathogenen Hefe eine außergewöhnlich hohe Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen verleiht (Ernst & Tielker, 2009; Soll, 2002). Hier spielt vor allem der Wechsel zwischen der kugeligen Hefeform und der filamentösen Hyphe eine wichtige Rolle (Odds, 1988). Die einzellige Hefeform dient vornehmlich der Vermehrung durch Knospung und der Ausbreitung in der Blutbahn, wohingegen sich *C. albicans*-Zellen in der mehrzelligen Hyphenform durch eine stärkere Adhäsion an Wirtszellen auszeichnen und aufgrund ihrer Morphologie in der Lage sind, in Epithelzellen einzudringen und diese zu durchwachsen oder durch Evasion aus Makrophagen Mechanismen des menschlichen Immunsystems zu umgehen (Cutler, 1991; Odds, *et al*., 1994; Vazquez-Torres & Balish, 1997). *C. albicans*-Stämme mit defektem Hyphenwachstum verhalten sich im Mausmodell avirulent (Lo *et al*., 1997), und auch Mutationen, die zu einem konstitutiven Hyphenwachstum führen, zeigten verminderte Virulenz (Gow *et al*., 2002). Der Wechsel zwischen diesen

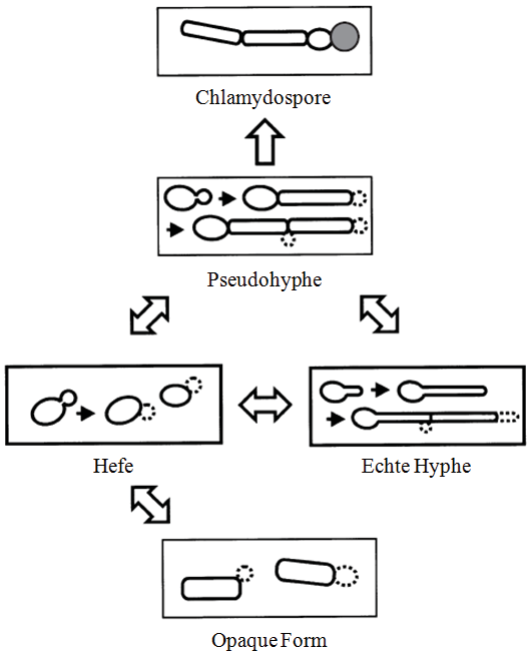


Abb. 1.1: Wachstumsformen von *C. albicans*. *C. albicans* ist als Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen in der Lage, seine Morphologie zu verändern (Ernst, 2000, modifiziert).

beiden Wachstumsformen wird durch den Transkriptionsfaktor Efg1 unter Hypoxie stark beeinflusst. Efg1 gilt als Hauptregulator der Morphogenese in *C. albicans* und fungiert unter normoxischen Bedingungen als Aktivator der Hyphenbildung, wohingegen unter hypoxischen Bedingungen eine reprimierende Funktion beobachtet wurde (Lo *et al*., 1997; Ernst, 2000). So führt die Abwesenheit von *EFG1* (*efg1*/*efg1*) unter normoxischen Bedingungen zum Wachstum der Zellen in der Hefeform und unter Hypoxie zu hyperfilamentöser Morphologie (Setiadi *et al*., 2006). Im Gegensatz zu aerobem Wachstum ist *C. albicans* unter hypoxischen Bedingungen (auf festen Medien) zudem in der Lage, sogenannte „Chlamydosporen" auszubilden, welche als runde Zellen mit verdickter Zellwand terminal an Pseudohyphen entstehen (Sonneborn *et al*., 1999; Odds, 1988). Für diese Form wird eine Funktion als Überdauerungsform angenommen, da sie vorwiegend unter nährstoff- und sauerstoffarmen Bedingungen beobachtet wurde (Joshi *et al*., 1993). Auch für die Bildung von Chlamydosporen ist Efg1 essentiell (Sonneborn *et al*., 1999). Weiterhin wird das sogenannte „opaque-white switching" durch Hypoxie reguliert, welches den Phänotypwechsel zwischen der ovalen Hefeform („white") und einer stäbchenförmigen „opaque"-Form bezeichnet (Ramirez-Zavala *et al*., 2008; Slutsky *et al*., 1987). Je nach Nische des Wirts bieten die jeweiligen Morphologien Vorteile für die Kolonialisierung von Oberflächen wie Hautzellen („opaque") oder systemischer Infektion durch invasives Wachstum („white") (Kvaal *et al*., 1997, 1999; Anderson *et al*., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der „opaque"-Form durch Sauerstofflimitation stabilisiert wird (Ramirez-Zavala *et al*., 2008).

1.3 Proteintransportprozesse in Hefen

Hefen und andere eukaryotische Zellen sind typischerweise in Kompartimente eingeteilt, welche durch Membranen getrennt sind und als Organellen bezeichnet werden. Hefezellen enthalten Mitochondrien, Golgi, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Lysosomen, Peroxisomen und den Zellkern. Die begrenzenden Membranen weisen eine selektive Permeabilität auf, so dass der Stoffaustausch zwischen den einzelnen Bereichen über Kanäle und Pumpen reguliert werden kann. Für den Transport von DNA, RNA oder Proteinen zwischen den verschiedenen Kompartimenten bedarf es jedoch bestimmter Mechanismen, welche je nach Zielorganell individuell ablaufen. In dieser Arbeit wurden Proteine im Zellkern sowie auf der Oberfläche von Hefezellen lokalisiert, so dass im Folgenden die Mechanismen dieser Transportwege genauer erläutert werden.

Proteintransport in den Zellkern

Die Abgrenzung des Zellkerns von dem Cytoplasma ermöglicht eine zeitliche und räumliche Trennung von Transkription und Translation. Der Transport zwischen diesen beiden Organellen der Hefezelle erfolgt über Poren der Kernmembran, welche aus einem großen Proteinkomplex (66 MDa), dem Kernporen-Komplex (NPC = nuclear pore complex), bestehen (Rout & Blobel, 1993). Kernporen haben einen Durchmesser von etwa 9 nm und erlauben somit die passive Diffusion von Proteinen bis zu einer Größe von 40-60 kDa (Paine *et al*., 1975; Ma *et al*., 2012). Größere Proteine werden hingegen im nativen, gefalteten Zustand durch einen aktiven, signalabhängigen Transportprozess in den Zellkern befördert. Die Größe des aktiven Diffusionskanals beträgt dann bis zu 26 nm im Durchmesser (Dworetzky *et al*., 1988). Zellkernproteine weisen spezielle Signalsequenzen (NLS, „Nuclear Localization Sequences“) für den Kernimport auf. „Klassische“ NLS bestehen aus ein bis zwei kurzen Abschnitten, welche sich durch einen hohen Lysin- und Arginin-Anteil auszeichnen (Dingwall & Laskey, 1991). Diese werden durch lösliche Transportproteine, sogenannte Importine (auch Karyopherine), erkannt, die den Transport in den Zellkern vermitteln (Görlich *et al*., 1994). Importine enthalten α- und β-Untereinheiten, wobei das α-Importin als Adapter für zahlreiche Proteine fungiert, wohingegen die β-Untereinheit Wechselwirkungen mit der Kernpore vermittelt und für die eigentliche GTP-abhängige Translokation in den Zellkern zuständig ist (Görlich *et al*., 1996; Görlich & Kutay, 1999; Chook & Blobel, 2001). Bei *S. cerevisiae* wurden 14 Transportproteine der β-Importin-Familie identifiziert, wovon 10 an dem Kerntransport beteiligt sind (Greiner *et al*., 2004). Eine Funktion als α-Importin konnte bisher nur für das Protein Srp1 (Kap60) gezeigt werden (Enenkel *et al*., 1995). Bei *C. albicans* wurden einige ORFs („Open Reading Frames“) mit Homologie zu Genen der Hefe-Importine identifiziert; jedoch ist die Funktion der Genprodukte für den Kernimport bisher noch nicht bekannt.

Proteintransport auf die Zelloberfläche

Der Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma auf die Zelloberfläche erfolgt über verschiedene sekretorische Kompartimente der Hefezelle und wird durch spezifische Sekretions-Signalsequenzen vermittelt.

Der erste Schritt der Sekretion ist die Translokation des Proteins in das ER-Lumen. Diese erfolgt je nach Hydrophobizität der Signalsequenz ko- oder posttranslational durch eine Pore in der ER-Membran, welche aus den drei Untereinheiten Sec61, Sbh1 und Sss1 besteht (Ng *et al*., 1996; Simon & Blobel, 1991; Johnson & van Waes, 1999). Bei kotranslationaler Sekretion wird die N-terminale Signalsequenz der entstehenden Polypeptidkette während der Translation durch ein Signal-Erkennungspartikel (SRP= „Signal Recognition Particle“) erkannt und gebunden, was zunächst zu einem Translationsarrest führt (Walter *et al*., 1981; Chang *et al*., 1997). Außerdem vermittelt das SRP die GTP-abhängige Translokation des Ribosom-Protein-SRP-Komplexes über spezifische Rezeptoren (SRP-Rezeptor) der ER-Membran (Walter *et al*., 1981; Miller *et al*., 1993). Durch Bindung der Signalsequenz an den Porenkomplex kommt es zur Öffnung des Kanals, und das Vorläuferprotein wird durch die wieder fortgeführte Translation immer weiter in das ER-Lumen geschoben (Plath *et al*., 1998; Shaw *et al*., 1988). Dort wird schließlich die N-terminale Signalsequenz durch einen Signalpeptidase-Komplex von dem Protein abgetrennt (YaDeau *et al*., 1991; Blobel & Dobberstein, 1975).

Eine Ausnahme des beschriebenen kotranslationalen Mechanismus stellt der ER-Transport von Vorläuferpeptiden GPI (Glycosylphosphatidylinositol) -verankerter Proteine dar. In diesem Fall verläuft die Translokation vermutlich meist SRP-unabhängig, wobei über den genauen Vorgang bisher nur wenig bekannt ist (Ast *et al*., 2013). Neben der kotranslationalen Translokation in das ER existiert eine posttranslationale Variante, bei der das bereits fertig translatierte Vorläuferprotein durch Hsp70-Hitzeschockproteine (Ssa1-4 in *S. cerevisiae*) und das Chaperon Ydj1 im entfalteten Zustand im Cytoplasma gehalten wird. Diese Chaperone sind vermutlich auch an der Zielsteuerung des Proteins zur Pore der ER-Membran beteiligt, wo es zur Bindung der Signalsequenz an den Porenkomplex kommt und sich der Kanal infolgedessen öffnet (Cyr *et al*., 1995; Becker *et al*. 1996). Auf der luminalen Seite binden daraufhin mehrere BIP-Chaperone (K2 in *S. cerevisiae*) an die Peptidkette und ziehen das Protein unter ATP-Verbrauch in das Innere des ER (Matlack *et al*., 1997, 1999; Sanders *et al*., 1992). Wie bei kotranslationaler Sekretion wird die Membran-assoziierte Signalsequenz abgespalten und das Protein mit Hilfe von Chaperonen gefaltet (Wei & Herndershot, 1996).

Nach der Translokation in das ER werden korrekt gefaltete Zellwandproteine durch anterograden Vesikelverkehr in den Golgi-Apparat und anschließend in die Plasmamembran (PM) rekrutiert. Vesikel für den Transport zwischen ER und Golgi schnüren sich GTP-abhängig durch Anlagerung von COPII- („COated Protein“) Hüllproteinen an die ER-Membran ab, wobei die Auswahl der Frachtproteine durch spezifische Exportsignale erfolgt (Barlowe *et al*., 1994; Miller *et al*., 2003). An der *cis*-Seite des Golgi-Apparats kommt es dann zur spezifischen Erkennung über sogenannte „SNARE“-Oberflächenproteine („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) auf Vesikel- und Zielmembran (Barlowe *et al*., 1994; Rothman, 1994). Durch Interaktion dieser Strukturen erfolgt die GTP- und ATP-abhängige Verschmelzung beider Komponenten, und die Transportvesikel entleeren sich in das Lumen des Golgi-Apparats (Söllner *et al*., 1993; Südhof, 1995). Dort passieren die Frachtproteine das Kompartiment in Richtung des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) und werden nach jeweiligem Transportziel (Plasmamembran, Vakuole oder Endosom) sortiert (Griffith & Simons, 1986). Von dem

TGN gelangen die Proteine erneut über Vesikeltransport zur Plasmamembran. Dabei werden periplasmatische Enzyme, vorzugsweise Rezeptor-vermittelt, durch Clathrin-ummantelte Vesikel zur PM gebracht, wohingegen die Sortierung und der Transport integraler Membranproteine sowie GPI-verankerter und Zellwand-assoziierter Proteine durch sogenannte „Lipid Rafts“ ablaufen (Harsay & Bretscher *et al*., 1995; Surma *et al*., 2012). Diese Ergosterol- und Sphingolipid-reichen Bereiche der Membran schnüren sich ebenfalls zu Vesikeln ab und transportieren spezifisch Frachtproteine zur PM (Surma *et al*., 2011). Über die genauen Mechanismen der Proteinselektion und Vesikelabschnürung ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Auf den Transport der Frachtproteine zur Cytoplasmamembran folgt deren Übertragung auf die Zellwand, welche je nach Art der Bindung unterschiedlich verläuft. So gibt es zum Einen lösliche Zellwandproteine (scw= „soluble cell wall proteins“), welche über Wasserstoffbrücken, Disulfidbrücken oder ionische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen mit Komponenten der Zellwand verbunden sind (Orlean, 2012; Chaffin *et al*., 1998). Zum Anderen können Proteine kovalent an das Glukan der Zellwand gebunden vorkommen, wobei zwischen den beiden Hauptgruppen der Alkali-sensitiven Pir- („Protein with internal repeats“) sowie der GPI-Proteine differenziert wird (Klis *et al*., 2006). GPI-verankerte Proteine machen etwa 10-20 % eukaryotischer Oberflächenproteine aus und weisen neben der N-terminalen Signalsequenz zur Translokation in das ER eine C-terminale Sequenz zur Generierung eines Mannose-haltigen GPI-Ankers auf (Orlean & Menon, 2007; Caras *et al*., 1987). Die Übertragung des GPI-Rests erfolgt posttranslational durch eine GPI-Transamidase im Lumen des ER, welche den Membran-assoziierten C-Terminus abspaltet und eine Amidbindung zwischen dem Ethanolamin des fertigen GPI-Rests und der Carboxylgruppe des prozessierten Vorläuferproteins herstellt (Mayor & Riezman, 2004). Nach dem Transport zur PM wird das membranverankerte Protein schließlich zwischen Mannose und Glucosamin des GPI-Ankers abgespalten und an das β1,6-Glukan der Zellwand gebunden (Kollar *et al*., 1997). Pir-Proteine werden dagegen durch eine Transglutaminase-Reaktion, vermutlich über Esterbindungen, mit dem β1,3-Glukan der Zellwand verknüpft (Ecker *et al*., 2006).

Neben dem Anhängen eines GPI-Ankers existieren in der Hefe weitere Formen der Proteinmodifikation durch Glykosylierung. So werden sekretorische Proteine im ER und Golgi gewöhnlich stark *N*- bzw. *O*-glykosyliert, was essentiell für die korrekte Funktion der Proteine ist. Diese beiden Hauptformen der Proteinmodifizierung durch Zuckerstrukturen dienen als Signale bei der Sortierung im TGN, der Faltung und Stabilität von Proteinen sowie Zell-Zell-Interaktionen, die beispielsweise wichtig für die Pathogenität von *C. albicans* sind (Helenius & Aebi, 2001; Hall & Gow, 2013). Bei der *N*-Glykosylierung wird im ER eine fertige Glykankette ($(GlcNAc)_2$-$(Man)_9$-Glc_3) kotranslational durch Oligosaccharyltransferasen von Dolicholphosphat auf den Asparaginrest der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X: kein Prolin) übertragen (Tanner & Lehle, 1987). Dieser Vorgang findet jedoch nicht an jedem Motiv statt, sondern tritt mit einer Häufigkeit von etwa 65 % auf (Petrescu *et al*., 2004). Anschließend kommt es erst zur Abspaltung der Glukosereste und im weiteren Verlauf zum Abbau der letzten Mannose an der Zuckerkette, woraufhin die „Kern-Glykosylierung“ im Golgi durch verschiedene

Glykosyltransferasen ergänzt wird (Herscovics, 1999). In Hefe werden hier ausschließlich Mannoseketten angehängt, welche aus bis zu 200 Mannoseresten bestehen können (Herscovics & Orlean, 1993).

Bei der *O*-Glykosylierung in Hefe wird zunächst im ER ein Mannoserest von dem Donor Dolicholphosphat-Mannose *O*-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste des Zielproteins gebunden (Bause & Lehle, 1979). Im Gegensatz zu der *N*-Glykosylierung scheint hier keine Konsensussequenz zu existieren, jedoch konnte gezeigt werden, dass die *O*-Glykosylierung von Proteinen durch umgebende Serin-, Threonin- oder Prolin-reiche Regionen begünstigt wird (Thanka Christlet & Veluraja, 2001). Der Prozess der *O*-Glykosylierung erfolgt während der ER-Translokation durch Protein-*O*-Mannosyltrasferasen (Pmt) der Pmt1-, Pmt2- und Pmt4-Familien (Lengeler *et al*., 2008). Nach der Übertragung der initialen Mannose findet im Golgi eine Verlängerungsreaktion statt, bei der unter Verwendung von GDP-Mannose in *S. cerevisiae* bis zu fünf und in *C. albicans* bis zu sieben weitere Mannosereste durch verschiedene Mannosyltransferasen angehängt werden (Goins & Cutler, 2000; Häusler *et al*., 1992; Hayette *et al*., 1992).

1.4 Reporterproteine

Reporterproteine sind essentielle Werkzeuge der Molekularbiologie, deren Genprodukte direkt oder indirekt nachweisbar sind. Reportergene werden zum einen für Studien der zeitlichen und räumlichen Genexpression genutzt, indem sie mit regulatorischen Sequenzen wie Promotoren fusioniert werden. Zum anderen werden sie an beliebige Gene fusioniert, um die Synthese, Lokalisation und Interaktion von Proteinen in der Zelle charakterisieren zu können. Der Nachweis erfolgt je nach Art des Reporters indirekt nach Zugabe spezifischer Substrate oder direkt durch Detektion des Reporterproteins. Gene wie *lacZ* oder *GUS* aus *Escherichia coli* beispielsweise sind viel genutzte Reportergene in Pro- und Eukaryoten. Sie kodieren für die Enzyme β-Galaktosidase bzw. β-Glukoronidase, welche in der Lage sind, spezifische Substrate in farbige oder fluoreszierende Produkte umzusetzen und so für quantitative Messungen herangezogen werden können (Casadaban *et al*., 1983; Jefferson *et al*., 1986). Auch Luciferasen, wie die aus der Weichkoralle *Renilla reniformis* (RLuc) oder dem Leuchtkäfer *Photinus pyalis* („Firefly Luciferase“) stammenden, werden für Analysen der Genexpression genutzt. Solche Enzyme zeichnen sich durch die Emission von Biolumineszenz aus, welche in Gegenwart von Sauerstoff nach der Spaltung von Substraten wie Luciferin (RLuc) oder Coelentrazin (Firefly) detektierbar ist (Matthews *et al*., 1977; Hart *et al*., 1978; Gould & Subramani, 1988). Der Nachweis beschriebener Reporter bezieht sich auf die Genaktivität aller Zellen einer Population. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Gruppe fluoreszierender Reporterproteine Analysen der Genexpression und Proteinlokalisation in Einzelzellen und einen Substrat-unabhängigen Nachweis des Reporters. Diese Proteine emittieren als Reaktion auf Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge Fluoreszenz, welche optisch mit Hilfe spezieller Mikroskope detektierbar ist und sich zudem quantitativ messen lässt.

Fluoreszenz beschreibt die Emission von Licht durch eine Substanz, welche zuvor Energie in Form von Licht (Photon) oder elektromagnetischer Strahlung absorbiert hat. Dabei führt die Übertragung der Energie zur Ausbildung eines elektronisch angeregten Zustands

(Singulett-Zustand) der Licht-absorbierenden Verbindung, in dem deren Elektronen auf ein höheres Energie-Niveau gelangen. Unmittelbar darauf fallen die Elektronen wieder auf ein niedrigeres Energieniveau zurück, wobei Lichtenergie frei wird. Bei Anregung von Materie durch Licht ist die Wellenlänge der emittierten Fluoreszenz daher länger und somit energieärmer als die des absorbierten, kürzerwelligen Lichts (Lakowicz, 2010).

1.4.1 Sauerstoffabhängige Fluoreszenzreporter

Fluoreszenzreporter haben sich zu essentiellen Markerproteinen in der modernen Molekular- und Biotechnologie entwickelt, wobei durch die Entdeckung des „Grün Fluoreszierenden Proteins“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* 1962 der Grundstein gelegt wurde (Shimomura *et al*., 1962). GFP ist ein 26,9 kDa-großes Protein, welches nach Anregung mit ultraviolettem (λ_{max}= 395 nm) oder blauem (λ_{max}= 475 nm) Licht grüne (λ_{max}= 509 nm) Fluoreszenz emittiert und 1994 von Chalfie *et al*. erstmals *in vivo* als Reporterprotein in *E. coli* und *Caenorhabditis elegans* eingesetzt wurde (Prasher *et al*., 1992; Chalfie *et al*., 1994). Die Proteinstruktur von GFP (Abb. 1.2 A) ist zylinderförmig und besteht aus 11 antiparallel angeordneten β-Faltblättern, welche eine α-Helix umgeben, sowie kurzen helikalen Segmenten an den Enden des Zylinders (Yang *et al*., 1996). Teil der Helix im Inneren des Zylinders ist das kovalent gebundene Chromophor p-Hydroxybenzyliden-Imidazolinon, welches sich in einem autokatalytischen Prozess aus den Aminosäureresten Ser-Tyr-Gly (65-67) des Proteins bildet (Ormö *et al*., 1996; Cody *et al*., 1993). Diese irreversible Chromophorassemblierung (Abb. 1.2 B) erfolgt nach der Faltung von GFP in eine nahezu native Form und wird durch spontane Zyklisierung des Polypeptid-Rückgrats eingeleitet (Zhang *et al*., 2006; Ormö *et al*., 1996). Dazu kommt es infolge eines nukleophilen Angriffs des Carbon-Atoms von Ser^{65} durch die Amidgruppe von Gly^{67}, woraufhin sich das Imidazol-5-on heterozyklische Ring-System nach Dehydratisierung bildet (Tsien, 1998). Bis zu diesem Schritt der Chromophorbildung ist keine Fluoreszenzemission möglich, sondern es bedarf zunächst der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, der zur Dehydrogenisierung der α-β-Bindung von Tyr^{66} und somit der Ausbildung der fluoreszenzfähigen Form von GFP führt (Heim *et al*., 1994). Aus diesem Grund ist die Nachweisbarkeit des Reporters von den Sauerstoffbedingungen der Umgebung abhängig, und GFP ist bei anaeroben Bedingungen nicht mehr in der Lage, Fluoreszenz zu emittieren (Heim *et al*., 1994). Unter Bedingungen mit wenig Sauerstoff ist je nach Konzentration keine Fluoreszenz mehr detektierbar, oder die Signalstärke ist durch die eingeschränkte Chromophor-Oxidation beeinträchtigt und kann nicht für quantitative Expressionsanalysen herangezogen werden (Drepper *et al*., 2010). Die Chromophor-Reifung des wildtypischen GFP ist ein relativ zeitintensiver Prozess. Dabei ist die Oxidation des GFP-Chromophors der langsamste Schritt und somit zeitbestimmender Faktor der Assemblierungsreaktion, für den in *E. coli* etwa zwei bis vier Stunden benötigt werden (Cubitt *et al*., 1995; Heim *et al*., 1994).

Seit dem ersten Einsatz des Fluoreszenzreporters vor 20 Jahren wurde das Protein vielen verschiedenen Modifikationen unterzogen, um die Anwendungsmöglichkeiten als Reporter zu optimieren und auszuweiten. So wurde durch den Austausch verschiedener Chromophor-assoziierter Aminosäuren die Variante EGFP („Enhanced GFP“) entwickelt,

welche mittlerweile bevorzugt in der Forschung eingesetzt wird und unter anderem eine erhöhte Fluoreszenzintensität sowie schneller ablaufende Chromophor-Oxidation (etwa 27 min in *E. coli*) aufweist (Heim *et al*., 1995; Cormack *et al*., 1996).

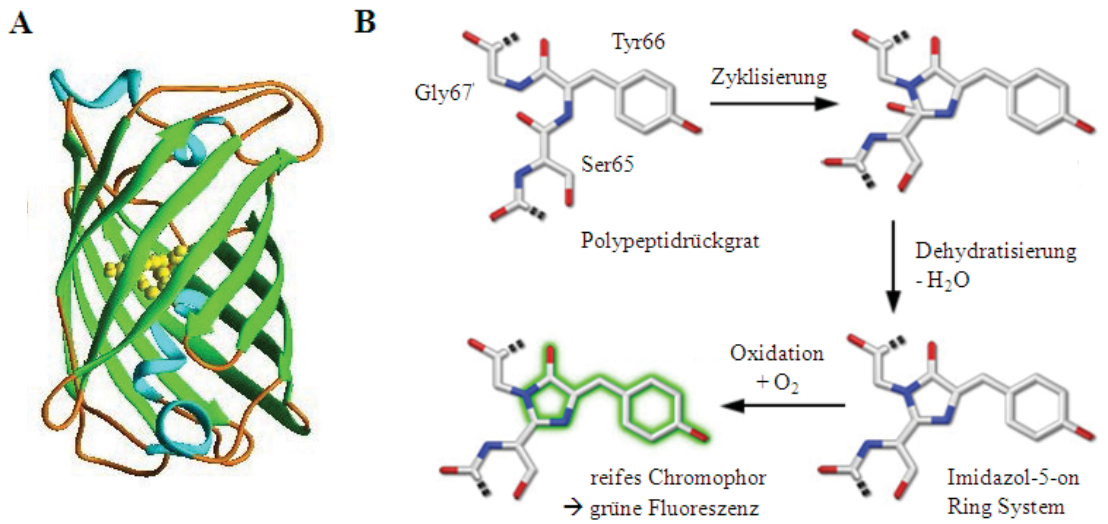


Abb. 1.2:. Proteinstruktur und Chromophorassemblierung von GFP aus *A. victoria*. A: Proteinstruktur von GFP aus *A. victoria*. Das Protein besteht aus 11 β-Faltblättern (grün), welche eine Zylinderform ausbilden sowie „loops" (orange) und kurzen helikalen Segmenten (blau) an den Enden des Zylinders. Im Inneren befinden sich eine α-Helix (blau) sowie das Chromophor (Ser^{65}-Tyr^{66}-Gly^{67}) (gelb) (aus Yang *et al*., 1996). B: Reifung des GFP-Chromophors: Nach der Faltung des Proteins erfolgt die Chromophor-Reifung, bei der eine Zyklisierungs- und Dehydratisierungsreaktion zur Ausbildung eines Imidazol-5-on Ring Systems führen. Um anschließend in die fluoreszenzfähige Form zu gelangen, bedarf es der Oxidation mit molekularem Sauerstoff (Day & Davidson, 2009, modifiziert).

Durch die Einführung weiterer gerichteter und ungerichteter Mutationen konnten zusätzlich Formen mit verbesserter Faltungseffizienz, erweitertem pH-Spektrum oder erhöhter Sensitivität hergestellt werden (Pédelacq *et al*., 2006; Scholz *et al*., 2000; Sawano & Miyawaki, 2000). Zudem existieren verschiedene Farbvarianten von GFP, deren Spektralbereiche emittierter Fluoreszenz sich von Blau (BFP) über Cyan (CFP) und Gelb (YFP) bis hin zu Rot (R10-3) erstrecken (Heim *et al*., 1994; Heim & Tsien, 1996; Ormö *et al*., 1996; Mishin *et al*., 2008). Diese Proteine haben sich wie GFP zu wichtigen Werkzeugen der Molekularbiologie entwickelt, und auch die Fluoreszenzeigenschaften einiger dieser Varianten wurden bereits für individuelle Anwendungsbereiche optimiert (Kremers *et al*., 2011).

Der Einsatz von Fluoreszenzreportern der *A. victoria* GFP-Familie ist mittlerweile in zahlreichen verschiedenen Organismen wie Bakterien, Hefen und anderen Pilzen sowie Säugern, Pflanzen und Insekten möglich (Izadi *et al*., 2009). Dabei ist der Großteil optimierter GFP-Varianten auf die Anwendung in Säuger- und Bakterienzellen abgestimmt, wohingegen viele dieser Reporter nicht für den Gebrauch in Hefezellen angepasst wurden. Insbesondere in *C. albicans* sind viele Standard-Reportergene aufgrund

des ungewöhnlichen Kodongebrauchs nicht funktionell, und auch das *GFP*-Gen enthält ein CUG-Kodonsequenz, welche essentiell für die Funktion des Reporters in der Hefe ist (Cormack *et al*., 1997). Cormack *et al*. (1997) entwickelten eine GFP-Variante mit erhöhter Fluoreszenz-Quantenausbeute, welche an den Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst und für die Expression in Hefezellen optimiert wurde (yEGFP). Auf dieser Grundlage wurden eine gelbe (YFP) sowie eine blaue (CFP) Farbvariante durch entsprechende Modifikationen für die Anwendung in *C. albicans* entwickelt (Gerami-Nejad *et al*., 2001).

Neben GFP aus *A. victoria* wurden in einigen weiteren marinen Organismen fluoreszierende Proteine entdeckt und mittlerweile über 150 GFP-ähnliche, farbige Proteine beschrieben (Zimmer, 2009). Beispielsweise konnte aus *R. reniformis* ein grün fluoreszierendes Protein (RrGFP) isoliert werden und das rote Protein DsRed bzw. mRFP1, dessen ursprüngliche Form aus der Seeanemone *Discosoma stratia* stammt, gewinnt immer mehr an Bedeutung für mikrobiologische Analysen (Ward *et al*., 1979; Matz *et al*., 1999; Campbell *et al*., 2002). Auf Basis von mRFP1 wurde 2004 eine ganze Farbpalette von Fluoreszenzreportern („mFruits“) hergestellt, deren Fluoreszenzspektrum verschiedenste Abstufungen der Farben Gelb, Grün, Blau und Rot umfasst (Shaner *et al*., 2004; Shaner, 2013). DsRed-Varianten mit roter (DsRFP) bzw. violetter (yEmRFP) Fluoreszenz wurden auch für die Anwendung in den Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* entwickelt (Gerami-Nejad *et al*., 2009; Keppler-Ross *et al*., 2008). Diese leuchten bisher jedoch nur schwach und sind auch in Hefe durch langsame Chromophor-Reifung beeinträchtigt.

In der Natur kommt die Energie zur Anregung von GFP von der Biolumineszenz des Proteins Aequorin, welches in *A. victoria* mit GFP assoziiert vorliegt und in Anwesenheit von Calcium blaues Licht emittiert (Morise *et al*., 1974). Ein ähnlicher Prozess wird sich in der Molekularbiologie zur Analyse zellulärer Ereignisse zu Nutze gemacht. Dieser sogenannte „Förster- oder Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) bezeichnet die strahlenlose Energieübertragung von einem angeregten Donorchromophor auf ein Akzeptorchromophor durch elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förster, 1948). Durch die Übertragung von Energie an den Akzeptor kann dieser die Energie wiederum in Form von Fluoreszenz abgeben. Das Vorkommen von FRET kann daher auch durch die Abnahme der Donor- sowie die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz überprüft werden (Zhou *et al*., 2012). Die Voraussetzung für eine solche Energieübertragung ist zum einen eine signifikante Überlagerung des Emissionsspektrums des Donorfluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Demchenko, 2008); zum anderen kann FRET nur bei räumlicher Nähe beider Komponenten zueinander (maximal 10 nm) erfolgen (Abb. 1.3), wobei die Effizienz des Transfers mit zunehmender Entfernung sinkt (Zadran *et al*., 2012; Stryer, 1978). Das Prinzip von FRET wird daher auch zur Entfernungsmessung zwischen zwei Fluoreszenzreportern sowie daran angehängter Proteine verwendet (Selvin, 2000). Außerdem wird die Fusion von Proteinen oder Domänen desselben Proteins an FRET-Chromophore zur Analyse von Proteininteraktionen, deren angenäherter Lage zueinander oder Proteinkonformationen genutzt (Truong & Ikura, 2001; Day *et al*., 2001). Das meist genutzte FRET-Paar stellen CFP als Donor und YFP als Akzeptor dar, wobei vorzugsweise

FRET-optimierte Varianten verwendet werden (Nguyen & Daugherty, 2005; Rizzo *et al*., 2004). Neben der blau-grünen CFP-YFP-Fusion werden auch andere Kombinationen wie Grün-Rot (EGFP-mCherry), Cyan-Orange (MiCy-mKO) oder Gelb-Rot (mAmetrine-tdTomato) genutzt (Zhou *et al*. 2012).

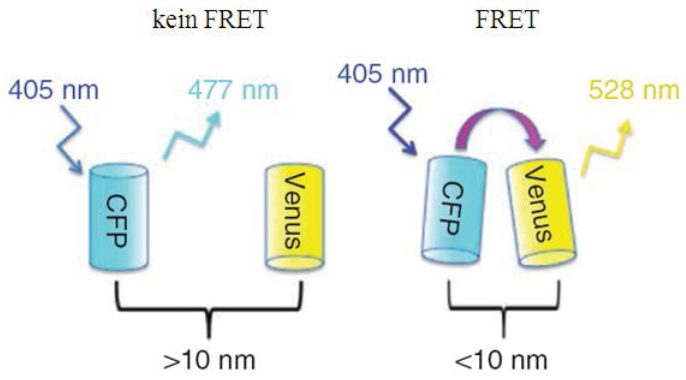


Abb. 1.3:. Prinzip des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). FRET-Prinzip am Beispiel der Fluoreszenzreporter CFP und einer YFP-Variante (Venus). Links: Nach Anregung des Donor-chromophors CFP (blau) kommt es zur Emission von Fluoreszenz, aber nicht zu FRET zwischen CFP und dem Akzeptorchromophor YFP (gelb). Rechts: CFP und YFP befinden sich in räumlicher Nähe (< 10 nm) zueinander, so dass nach Anregung des Donors Energieübertragung auf den Akzeptor stattfindet und in dessen Fluoreszenzemission resultiert (Broussard *et al*., 2013, modifiziert).

Einen wichtigen Anwendungsbereich des FRET-Prinzips stellen genetisch kodierte Biosensoren dar, bei denen zwei Fluoreszenzreporter durch eine Verbindungssequenz mit Sensorfunktion verbunden sind oder die Sensitivität einer der Reporter selbst genutzt wird (Zhou *et al*. 2012). Bei Ersterem kommt es infolge einer Bindung des Metaboliten an die Sensordomäne zu einer Konformationsänderung der Verbindungssequenz, sodass die Fluoreszenzproteine in räumliche Nähe gebracht werden und eine Energieübertragung erfolgen kann (Lager *et al*., 2003; Fehr *et al*., 2002). Wird hingegen die Sensitivität einer der FRET-Partner als Sensor für z.B. Chlorid- oder Wasserstoffionen genutzt, so können Änderungen der Salz- bzw. pH-Bedingungen durch Abweichungen der Absorptions-spektren detektiert werden (Romoser *et al*., 1997; Esposito *et al*., 2008). Genetisch kodierte Biosensoren spielen eine wichtige Rolle bei Analysen diverser zellulärer Prozesse, und es ist bereits eine Vielzahl solcher Sensoren verfügbar, mit denen sich Veränderungen in Einzelzellen oder innerhalb ganzer Populationen nachverfolgen lassen. So existieren Sensoren zur Bestimmung intrazellulärer Bedingungen wie Redoxzuständen, pH-Bedingungen oder Phosphorylierungsereignissen (Awais *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2012; Nagai *et al*., 2000) sowie zur Messung bestimmter Moleküle in der Zelle wie Calcium, Glukose, ATP oder Wasserstoffperoxid (Miyawaki *et al*., 1997; Bermejo *et al*., 2010; Belousov *et al*., 2006).

1.4.2 Sauerstoffunabhängige Fluoreszenzreporter

In den letzten Jahren wurde mit der Entwicklung einiger alternativer sauerstoffunabhängiger Fluoreszenzreporter begonnen, um Fluoreszenz-basierte Analysen unter hypoxischen und anoxischen Bedingungen zu ermöglichen. Diese Reporter basieren auf pflanzlichen sowie bakteriellen Photorezeptoren und bilden durch Kofaktorbindung Fluoreszenz aus (Drepper *et al*., 2013). So existieren NADPH-bindende blau fluoreszierende Proteine wie BFPvv aus *Vibrio vulnificus* CKM-1 sowie mBFP aus metagenomischer Lauberde-DNA (Su *et al*., 2001; Hwang *et al*., 2012). Die optische Nachweisbarkeit dieser Proteine beruht auf einer Verstärkung der Fluoreszenz von gebundenem NADPH und konnte für *E. coli* gezeigt werden. Außerdem wurden die rot fluoreszierenden Bakteriophytochrome IFP („Infrared Fluorescent Protein“) und iRFP („near-infraRed Fluorescent Protein“) identifiziert, welche das lineare Tetrapyrrol Bilin als Chromophor binden und für die Anwendung als Reporter in Bakterien- und Säugerzellen getestet wurden (Shu *et al*., 2009; Filonov *et al*., 2011). Die erste Gruppe sauerstoffunabhängiger Fluoreszenzreporter basiert jedoch auf pflanzlichen Phototropinen sowie Phototropin-ähnlichen Proteinen aus Bakterien (Drepper *et al*., 2007; Chapman *et al*., 2008).

Phototropine und verwandte Blaulichtrezeptoren

Phototropine sind Blaulichtrezeptoren, die dem lichtabhängigen Richtungswachstum (Phototropismus) höherer Pflanzen dienen (Christie, 2007). In der Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* wurden die beiden Blaulichtrezeptoren phot1 und phot2 identifiziert, welche neben der Rolle bei dem Phototropismus, an Prozessen wie der Chloroplasten-Bewegung sowie der Regulation der Stomata-Öffnung beteiligt sind (Sakai *et al*., 2001; Kinoshita *et al*., 2001). Die *A. thaliana* Phototropine besitzen neben einer C-terminalen Ser/Thr-Kinasedomäne zwei N-terminale LOV- („Light-Oxygen-Voltage“) Domänen (LOV1 und LOV2), welche jeweils ein Molekül Flavinmononukleotid (FMN) binden (Briggs & Christie, 2002). LOV-Domänen weisen sensorische Fähigkeiten für Licht, Sauerstoff oder elektrische Spannung auf und gehören zu der Superfamilie der PAS- (Per-ARNT-Sim) Domänen, einer Gruppe von Proteinen, die Signale wahrnehmen und weiterleiten (Huala *et al*., 1997; Taylor & Zhulin, 1999). In Photorezeptoren ermöglichen LOV-Domänen die Erkennung von blauem Licht, wodurch es neben der Aktivierung von Kinasen, Phosphodiesterasen oder Zinkfingerproteinen zur Emission von cyan-grüner Fluoreszenz kommt (Briggs & Christie, 2002; Crosson *et al*., 2003). Auf Basis des Phototropins phot2 aus *A. thaliana* wurde daher vor Kurzem der Fluoreszenzreporter iLOV entwickelt, welcher bereits in Bakterien- Pflanzen- und menschlichen Zellen sowie in der Hefe *S. cerevisiae* verwendet wurde (Chapman *et al*., 2008; Kitson *et al*., 2011). Auch in anderen Organismen wie Pilzen (WC-1 Proteine), Algen (Aureochrome) und Prokaryoten wurden Phototropin-ähnliche Blaulichtrezeptoren gefunden (Krauss *et al*., 2009). In Bakterien stellt YtvA aus *Bacillus subtilis* das erste identifizierte Protein mit einer LOV-Domäne dar, welche hohe Homologie zu LOV1 und LOV2 aus *A. thaliana* aufweist (Losi *et al*., 2002). YtvA bindet wie Phototropine nach Anregung mit blauem Licht kovalent an das Chromophor FMN und hat die gleiche Photochemie (Losi *et al.,* 2002). Neben der N-terminalen LOV-Domäne besitzt das aus 261 Aminosäuren bestehende Protein außerdem eine C-terminale STAS-Domäne (Sulfat Transporter und anti-Sigma Faktor Antagonist),

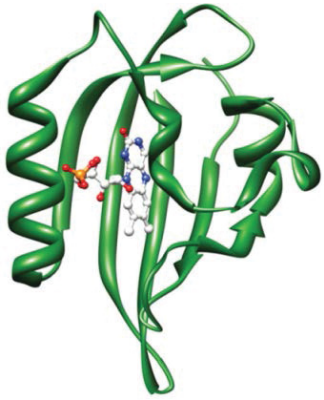


Abb. 1.4: Proteinstruktur der YtvA Kern-LOV-Domäne aus *B. subtilis*. Die LOV-Domäne ist aus fünf β-Faltblättern sowie zwei α-Helices aufgebaut (beides grün). Durch die Konformation bildet sich im Inneren der Domäne eine Bindetasche, in der sich der Kofaktor FMN (rot-blau-weiß) anlagert und als Chromophor dient (Drepper *et al*., 2013).

die der Signalweiterleitung dient (Losi *et al.*, 2002; Aravind & Koonin, 2000). In *B. subtilis* ist YtvA Teil eines komplexen Signalwegs, der die Stressantwort durch Umweltreize kontrolliert (GSR: „General Stress Response Pathway“) und als Antwort auf Blaulicht die positive Regulation des alternativen Trans-kriptionsfaktors σB bewirkt (Hecker & Völker, 2001; Avila-Pérez *et al*., 2006). Die Proteinstruktur der LOV-Domäne von YtvA (Abb. 1.4) besteht aus fünf antiparallel verlaufenden β-Faltblättern und vier kurzen α-Helices, die so angeordnet sind, dass sich im Inneren des Proteins eine Tasche bildet, in der sich das Chromophor FMN anlagert (Möglich & Moffat, 2007). Ein weiteres prokaryotisches Protein, bei dem eine LOV-Domäne entdeckt wurde, ist PpSB2 (SB2= „Sensory Box 2“) aus *Pseudomonas putida* (Krauss *et al*., 2005). Wie YtvA ist die PpSB2-LOV-Domäne N-terminal lokalisiert, wohingegen SB2 keine Effektor-Domäne am C-Terminus besitzt. Bei Blaulichtanregung durchläuft das Protein einen sehr ähnlichen Photozyklus wie YtvA und pflanzliche Phototropine, jedoch ist die physiologische Relevanz des Proteins in *P. putida* bisher unklar (Krauss *et al*., 2005).

Fluoreszenzreporter der FbFP-Familie

Ausgehend von den Blaulichtrezeptoren YtvA und PpSB2 entwickelten Drepper *et al*. (2007) die Fluoreszenzreporter der FbFP-Familie („Flavin mononucleotide (FMN) -based Fluorescence Proteins“), deren Chromophor FMN sich sauerstoffunabhängig assembliert und die Reporter daher sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen fluoreszieren können. Der Kofaktor FMN wird von Pro- und Eukaryoten selbst synthetisiert, wodurch keine zusätzliche Expression des Vitamins nötig ist (Abbas & Sibirny, 2011). Nach Blaulichtanregung durchlaufen LOV-Domänen einen reversiblen Photozyklus, welcher in Abbildung 1.5 A am Beispiel von YtvA-LOV dargestellt ist. Dabei gelangt die LOV-Domäne von dem Dunkelzustand (LOV447), in dem FMN nicht-kovalent gebunden vorliegt, zunächst in einen angeregten Singulettzustand (LOV447*), von dem aus ein rascher Übergang in den Triplettzustand (LOV660) erfolgt und es zur Emission von Fluoreszenz kommt. Dadurch wird eine kovalente Bindung zwischen dem 4a-Kohlenstoffatom des Flavin-Kofaktors und der Sulfatgruppe des photoaktiven Cysteinrests ausgebildet (LOV390) (Crosson & Moffat, 2001; Swartz *et al*., 2001). In Dunkelheit wird das entstandene Cystein-C(4a)-Addukt thermisch wieder aufgelöst, so dass das Chromophor wieder in den Ausgangszustand zurück gelangt und erneut angeregt werden kann (Dorn *et al*., 2013). Bei der YtvA-LOV-Domäne laufen die ersten beiden Schritte sehr schnell ab (ns-µs), wohingegen die Auflösung der kovalenten Bindung einige

Minuten in Anspruch nimmt (Abb. 1.5 A) (Losi *et al*., 2003). Zur Entwicklung der Reporter BsFbFP (*B. subtilis* FbFP) und PpFbFP (*P. putida* FbFP) wurde zunächst die schwache grüne Fluoreszenz (495 nm) der nativen Proteine nach Bestrahlung mit blauem Licht (450 nm) durch Austausch der photoaktiven Cysteine Cys^{62} (YtvA) bzw. Cys^{53} (SB2) gegen Alanine gesteigert (Drepper *et al*., 2007). Dadurch kommt es nicht zur Ausbildung der kovalenten Bindung, sondern lediglich zu einem Wechsel zwischen Dunkelzustand (447) und der fluoreszierenden Form (660) (Abb. 1.5 B). So konnte die Fluoreszenz deutlich erhöht und der langsamste Schritt des Zyklus umgangen werden (Drepper *et al*., 2007). FbFPs gelangen schneller in eine fluoreszenzfähige Form als Reporter der GFP-Familie, welche nach komplexer Proteinfaltung auch bei den schnellsten Varianten noch 10-40 min für die Chromophor-Reifung benötigen (Chudakov *et al*., 2010).

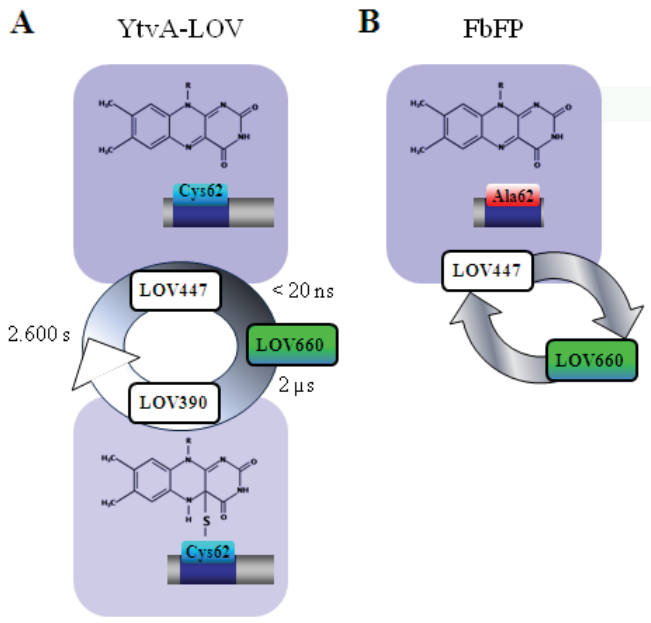


Abb. 1.5: Photozyklen der YtvA LOV-Domäne sowie rekombinanter Proteine der FbFP-Familie. A: Photozyklus von LOV-Proteinen am Beispiel von YtvA aus *B. subtilis.* Als Reaktion auf Blaulichtbestrahlung durchläuft das Chromophor FMN einen Photozyklus, bei dem es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung an die YtvA-LOV-Domäne kommt. B: Photozyklus der FbFPs. Durch Austausch des photoaktiven Cysteins (Cys^{62} bei YtvA-LOV) gegen ein Alanin wird die kovalente Bindung von FMN unterbunden, und es findet nur noch ein Wechsel zwischen Dunkelzustand und angeregter Form statt. (Krauss, 2007, modifiziert)

Die Fluoreszenzintensität des YtvA-LOV-basierten BsFbFP wurde zudem durch Konstruktion eines verkürzten Gens, welches nur für die N-terminale LOV-Domäne (137 Aminosäuren) kodiert, erhöht und der Kodongebrauch für die Expression in *E. coli* angepasst (Drepper *et al*., 2007). Diese optimierte Variante (EcFbFP) hat lediglich eine molekulare Masse von 15,7 kDa, was einen weiteren Vorteil gegenüber GFP bei Proteinfusionen mit FbFP darstellt. Die neuen LOV-basierten FbFP-Reporterproteine wurden bereits in einigen fakultativ und obligat anaeroben Bakterien wie *E. coli*, *Rhodobacter capsulatus*, *Polyphyromonas gingivalis* und *Bacteroides fragilis* unter Normoxie und Anoxie verwendet und konnten in lebenden Säugerzellen zur Analyse von Tumorzellen sowie neuronalen Stammzellen der Maus unter hypoxischen Bedingungen eingesetzt werden (Drepper *et al*., 2013). Vor kurzem wurde außerdem eine Fusion aus dem cyan-grünen EcFbFP als Donor und YFP als Akzeptor erfolgreich als FRET-Paar (FluBO) in *E. coli* verwendet und aufgrund der sauerstoffabhängigen Fluoreszenz von YFP als Sensor intrazellulärer O_2-Konzentrationen in dem Bakterium etabliert (Potzkei *et al*.,

2012). Des Weiteren wurde mit der Entwicklung der Reporter in Hefezellen begonnen, indem die Kodon-optimierte Variante Ca*FbFP* für Analysen in den Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* konstruiert wurde (Tielker *et al*., 2009). Dazu wurde die Sequenz von *EcFbFP* an den ungewöhnlichen Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst, indem alle sieben CUG-Kodons gegen UUG-Kodons ausgetauscht wurden. Da das native Hefegenom sehr AT-reich ist (Otero *et al*., 2010), wurden für eine optimale Expression außerdem Guanosine und Cytosine durch Adenosine und Thymine ersetzt, sofern die Kodierung des Triplets dadurch unverändert blieb. Für das resultierende CaFbFP-Protein konnten in *S. cerevisiae* und *C. albicans* Synthese und Fluoreszenz gezeigt werden, wobei die spektralen Eigenschaften denen der EcFbFP-Variante in *E. coli* gleichen. Die relativ schwache Fluoreszenz des Proteins in *C. albicans* konnte zudem durch Konstruktion einer Tandem-Fusion aus zwei Ca*FbFP*-Leserastern erhöht werden (Tielker *et al*., 2009).

1.5 Zielsetzung

Pilze haben sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf das Leben der Menschen. So wird die apathogene Hefe *S. cerevisiae* als eukaryotischer Modellorganismus zur Herstellung von Bier und Backwaren sowie als biotechnologischer Produktionswirt genutzt. Anderseits können Humanpathogene wie der Hefepilz *C. albicans* dem Menschen schaden, indem sie schwerwiegende Infektionen auslösen können. Beide Hefen wachsen sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen und müssen sich an Sauerstofflimitation anpassen. Aufgrund der großen Bedeutung des hypoxischen Wachstums für beide Hefen, ist die Analyse zellulärer Prozesse unter diesen Bedingungen ein wichtiger Forschungsbereich, über den bisher nur wenig bekannt ist. Fluoreszenzreporter wie GFP und dessen Varianten benötigen jedoch zur Ausbildung der Fluoreszenz molekularen Sauerstoff, so dass deren Anwendung auf aerobe Systeme beschränkt ist (Heim *et al*., 1994). Ziel dieser Arbeit war es daher, die prokaryotischen sauerstoffunabhängigen Fluoreszenzproteine FbFP als Reporter hypoxischer Genregulation in den Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* zu etablieren. In Vorarbeiten wurde die FbFP-Variante CaFbFP entwickelt und deren prinzipielle Funktionalität in *S. cerevisiae* und *C. albicans* gezeigt (Eichhof, 2008). Aufbauend darauf sollten in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenzeigenschaften von CaFbFP in Hefe analysiert und optimiert werden, wobei die Konstruktion verschiedener Tandemfusionen zur Steigerung der Fluoreszenzintensität im Vordergrund stand. Außerdem sollte, über Untersuchungen im Cytoplasma hinaus, die Fluoreszenz des Proteins in weiteren Zellkompartimenten der beiden Hefen charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung eines CaFbFP-basierten FRET-Systems und dessen Anwendung als Biosensor für molekularen Sauerstoff in den beiden Hefen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Gase und Enzyme

In dieser Arbeit genutzte Enzyme und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:
Agilent Technologies (Böblingen), Ambion (Kassel), Amersham (Braunschweig), Biorad (München), B. Braun (Melsungen), Calbiochem (Bad Soden), Difco (Michigan), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Merck AG (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon Rot), Millipore (Eschborn), MP Biomedicals (Ohio), New England Biolabs (Schwalbach), Pierce (Rockford), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), WERNER BioAgents (Jena), Whatman (Maidstone, GB).
Es wurden, soweit nicht anders vermerkt, Chemikalien der Güteklasse reinst oder p.a. verwendet.
Gase stammten von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf).

2.2 Verwendete Computerprogramme und Internetseiten

Computerprogramme:
Ascent Software Version 2.4
Axio Vision 3.1
Clone Manager 8
Geneious Basic 6.0.5
i-control 1.6
MultiGauge 3.0 (FUJIFILM)
Photoshop 7.0
SnapGene 2.1
ZEN 2012 x32 blue

Internetseiten:
http://www.candidagenome.org
http://www.yeastgenome.org

2.3 Bakterien- und Hefestämme

2.3.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α F^-	F^- Φ80Δ*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA*1 *endA*1 *hsdR*17(rk^- mk^+) *phoA supE*44 λ^- *thi*-1 *gyrA*96 *relA*1	Hanahan, 1983
Top10	F^- mcrA Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L(Str^R) *end*A1 *nup*G	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.3.2 *C. albicans*-Stämme

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
CAF2-1	*URA3*/Δ*ura3*::*imm434*	Fonzi & Irwin, 1993
CAI4	Δ*ura3*::*imm434*/Δ*ura3*::*imm434*	Fonzi & Irwin, 1993
CAI8	Δ*ura3*::*imm434*/Δ*ura3*::*imm434 ade2*::*hisG*/*ade2*::*hisG*	Fonzi & Irwin, 1993
CAIE3	wie CAI8, aber Integration pIE10 im *EFG1*-Lokus	diese Arbeit
CAIE3-GFP	Transformation von CAIE3 mit pMS2CP-GFP/ADE	diese Arbeit

2.3.3 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
THY.AP4	*MATa leu2-3,112 ura3-52 MAL2-8c SUC2 MEL HIS3*::*lexA-HIS3 ADE2*::*lexA-ADE2 trp1*Δ::*lexA-lacZ*	Obrdlik *et al*., 2004
EBY100	*MATα ura3-52 trp1 leu2*Δ*1 his3*Δ*200 pep4*::*HIS3 prb1*Δ*1.6R can1 GAL (pIU211: URA3)*	Boder & Wittrup, 2000

2.4 Medien und Anzucht von Bakterien- und Hefezellen

2.4.1 Medien und Anzucht von *E. coli*

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt

Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde das Medium nach dem Autoklavieren mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Außerdem wurden dem Medium bei der Herstellung fester Nährböden jeweils 2 % (w/v) Agar vor dem Sterilisieren hinzugefügt.
Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, wobei Flüssigkulturen auf dem Schüttler inkubiert wurden.

2.4.2 Medien und Anzucht von *C. albicans*

YPD (Vollmedium): 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (w/v) Glukose

SD-Medium: 0,67 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis*, 2 % (w/v) Glukose

SGR-Medium: 0,67 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis*, 2 % (w/v) Galaktose,
1 % (w/v) Raffinose

(* ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat)

Zur Herstellung von festem Medium wurden 2 % (w/v) Agar hinzugefügt.
Für Stämme mit Uracil- oder Adeninauxotrophie wurden SD- oder SGR-Medien durch Zugabe von 1 % (v/v) Uridin (5 g/l) bzw. 1,66 % (v/v) Adenin (0,7 g/l) ergänzt. Zur

Selektion auf Nourseothricin-Resistenz wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 200 µg/ml des Antibiotikums zugegeben.
Die Anzucht der Kulturen von *C. albicans* erfolgte bei 30 °C ruhend (Festmedien) oder auf dem Schüttler (flüssige Kulturen).

2.4.2.1 Hypheninduktion bei *C. albicans*

Zur Induktion von Hyphen in flüssigem Medium wurden die Stämme über Nacht bei 30 °C angezogen und auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt. Dann wurden zu dem jeweiligen Medium 10 % (v/v) Pferdeserum (Sigma-Aldrich, Deisendorf) gegeben und die Zellen bei 37 °C etwa 4-5 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Hyphenbildung konnte nun zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert werden.

2.4.3 Medien und Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte, wie unter 2.4.2 für *C. albicans* beschrieben, mit YPD-, SD- oder SGR-Medium. Allerdings wurden Minimalmedien nach dem Autoklavieren je nach verwendetem Stamm entweder 1,66 % Leucin (v/v) (3,6 g/l) (EBY100) oder 5 % (v/v) Aminosäuremix (Ura^-) (THY.AP4) zugegeben.
In einigen Fällen wurde ein Riboflavin-freies Minimalmedium („YNB w/o Amino acids and w/o Riboflavin“, Formedium, Norfolk, UK) verwendet, dessen Zusammensetzung sich lediglich durch die Abwesenheit von Riboflavin von der sonst verwendeten „Hefe-Stickstoff-Basis“ unterscheidet. Die Zugabe von Aminosäuren und Zuckern erfolgte analog zu Riboflavin-haltigen Minimalmedien.
Zur Selektion auf Transformanden mit Kanamycin-Kassette wurde YPD-Medium mit 200 µg/ml Geneticin versetzt.

Tab. 2.4: Aminosäuremix

Aminosäure	**Einwaage [mg/625 ml ddH_2O]**
Adenin	140
Arginin	480
Histidin	480
Isoleucin	720
Leucin	720
Lysin	720
Methionin	480
Phenylalanin	600
Threonin	720
Tryptophan	480
Tyrosin	180
Valin	720

2.4.3.1 Anzucht von *S. cerevisiae* unter hypoxischen Bedingungen

Hypoxische Bedingungen wurden im Hypoxie-Inkubator $INVIVO_2$ 200 (Ruskinn, England) bei Temperaturen von 30 °C und unter entsprechender Begasung mit CO_2, N_2, O_2 und Druckluft geschaffen.
Zur Anzucht von flüssigen Kulturen unter Hypoxiebedingungen wurden jeweils 5 ml SD Ura^--Medium mit dem entsprechenden Hefestamm beimpft und ÜN unter normoxischen Bedingungen bei 30 °C auf dem Schüttler (110 Upm) inkubiert. Außerdem wurde eine

entsprechende Anzahl steriler Reagenzgläser mit Rührfisch sowie geeignete Mengen SGR Ura$^-$-Medium und PBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4; pH 7,4) unter den jeweiligen Hypoxiebedingungen ÜN vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen der ÜK durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) sedimentiert, in 5 ml SGR Ura$^-$-Medium aufgenommen und zur Bestimmung der Zelldichte die OD_{600} bestimmt. Zur weiteren Anzucht der Hefezellen unter hypoxischen Bedingungen wurde jeweils etwa 1 ml Kultur in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben, in den Hypoxie-Inkubator eingeschleust und damit je 5 ml vorinkubiertes SGR Ura$^-$-Medium auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft. Anschließend wurden die Kulturen bei 30 °C unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer bis zum exponentiellen Wachstum unter den entsprechenden Gasbedingungen inkubiert.

2.4.4 Anzucht von Hefezellen unter anaeroben Bedingungen

Die Anzucht von *C. albicans*- und *S. cerevisiae*- Zellen unter anaeroben Bedingungen erfolgte auf festen Nährböden. Anaerobe Bedingungen wurden durch eine chemische Reaktion in einem luftdicht abgeschlossenen Gefäß der Firma OXOID (Wesel) nach Herstellerangaben generiert. Einen Nachweis der Anaerobizität erbrachte ein Anaerobiose-Indikator (OXOID).

2.5 Plasmide

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pER1367	Ca*URA3*, *AmpR*	Losberger & Ernst, 1989
p426GAL1	*GAL1p, CYC1t, URA3*, *AmpR*, *2-micron*	Mumberg *et al*., 1994
pBI-1	Ca*ARS, PCK1p, URA3, LEU2, ori, AmpR*	Stoldt *et al.,* 1997
pCB3	3x*HA-ADH1t*, *ACT1p-sat1-ACT1t*, Ca*ARS,* Cu*TDH3p, TDH3p-GAS1, TDH3p-gas1*Δ	Kunigo *et al*., 2013
pDS1044-1	*CaARS, ACT1p, ACT1t, SAT1, URA3, LEU2, ori, AmpR*	Sanglard, unveröffentlicht
pGA18-CaFbFP	*CaFbFP, AmpR*	Geneart AG, Regensburg
pGEM-T	*f1ori, AmpR, lacZ, ori*	Promega GmbH, Mannheim
pGEM-T-3xCaFbFP	wie pGEM-T, aber mit 3Ca*FbFP Bgl*II, *Bam*HI	Eichhof, 2008
pIE1	wie pDS1044-1, aber *CaFbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *ACT1p* fusioniert	Eichhof, 2008
pIE1-2	wie pDS1044-1, aber 2Ca*FbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *ACT1p* fusioniert	Eichhof, 2008
pIE2	wie pBI-1, aber *CaFbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *PCK1p* fusioniert	Eichhof, 2008
pIE2-2	wie pBI-1, aber 2*CaFbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *PCK1p* fusioniert	Eichhof, 2008

pIE3	wie p426GAL1, aber *CaFbFP Bam*HI/*Eco*RI mit *GAL1p* fusioniert	Eichhof, 2008
pIE4	wie pGFP-URA3, aber *HTB1 Hind*III mit *GFP* fusioniert	Eichhof, 2008
pMS2CP-GFP/ADE	*PCK1p-MS2-CP-GFP*, Ca*ARS*, Ca*ADE2*, *AmpR*	Lengeler, unveröffentlicht
pYD1	*GAL1p, AGA2, MATαTT, TRP1, CEN6/ARS4, ori, AmpR,*	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pYFP-URA3	Ca*YFP, ADH1t, URA3, AmpR*	Gerami-Nejad *et al*., 2001
YEp24	*ori*, *URA3*, *2-micron*, *AmpR*, *TcR*	Botstein *et al*., 1979

Tab. 2.6: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	**Eigenschaften**
pIE1-2-HTB1	wie pIE1-2, aber Ca*HTB1 Bgl*II/*Bam*HI mit *ACT1p* fusioniert
pIE3-2	wie p426GAL1, aber 2*CaFbFP Bgl*II/*Xho*I mit *GAL1p* fusioniert
pIE3-3	wie p426GAL1, aber 3*CaFbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *GAL1p* fusioniert
pIE3-HTB1	wie pIE3, aber Sc*HTB1* über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert
pIE3-2-HTB1	wie pIE3-2, aber Sc*HTB1* über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert
pIE5	wie pBI-1, aber Austausch *PCKp* gegen *TDH3p Bam*HI/*Bgl*II
pIE5-1	wie pIE2, aber Austausch *PCKp* gegen *TDH3p Bam*HI/*Bgl*II
pIE5-2	wie pIE1-2, aber Austausch *ACT1p* gegen *TDH3p Bam*HI/*Bgl*II
pIE5-3	wie pIE5, aber 3Ca*FbFP Bgl*II/*Bam*HI mit *TDH3p* fusioniert
pIE5-4	wie pIE5-2, aber 2 Fragmente 2xCa*FbFP* (4xCa*FbFP*) mit *TDH3p* fusioniert
pIE5-2-HTB1	wie pIE5-2, aber Ca*HTB1 Bgl*II/*Bam*HI mit *TDH3p* fusioniert
pIE9	wie pYD-1, aber Ca*FbFP Eco*RI/*Xho*I mit *GAL1p* fusioniert
pIE9K18A	wie pIE9, aber K18A
pIE9-2µ	wie pIE9, aber Austausch *CEN6/ARS4* gegen *2-micron ori* über homologe Rekombination
pIE9K18A-2µ	wie pIE9K18A, aber Austausch *CEN6/ARS4* gegen *2-micron ori* über homologe Rekombination
pIE10	wie pER1367, aber Integration von 723 bp *EFG1* mit 1 kb *EFG1*-3'UTR *Xba*I und doppelte MS2CP-Binderegion-Sequenz in *EFG1*-3'UTR
pOXY1	wie p426GAL1, aber Ca*YFP* mit „Linker" über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert
pOXY2	wie pIE3, aber *CaYFP* mit „Linker" über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert
pOXY3	wie pYD1-2µ, aber *CaYFP* mit „Linker" über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert

pOXY4	wie pIE9-2µ, aber *CaYFP* mit „Linker“ über homologe Rekombination mit *GAL1p* fusioniert
pOXY5	wie pCB3, aber Ca*YFP* mit „Linker“ *Nhe*I mit *TDH3p* fusioniert
pOXY7	wie pIE5, aber *CaYFP* mit „Linker“ *Bgl*II/*Bam*HI mit *TDH3p* fusioniert
pOXY8	wie pIE5-1, aber *CaYFP* mit „Linker“ *Bgl*II/*Bam*HI mit *TDH3p* fusioniert
pOXY9	wie pIE5-2, aber *CaYFP* mit „Linker“ *Bgl*II/*Bam*HI mit *TDH3p* fusioniert
pOXY10	wie pCB3, aber 2Ca*FbFP Nhe*I mit *TDH3p* fusioniert
pYD1-2µ	wie pYD1, aber Austausch *CEN6/ARSH4* gegen *2-micron ori* über homologe Rekombination

2.5.1 Plasmidkonstruktionen zur cytoplasmatischen Lokalisation von CaFbFP

pIE3-2:
Das Fragment 2xCa*FbFP* (*Bgl*II, *Xho*I) wurde aus dem Plasmid pIE1-2 herausgeschnitten und dieses sowie der Vektor p426GAL1 (*Bam*HI) wurden einer Klenow-Auffüllreaktion unterzogen. Anschließend wurde der Vektor dephosphoryliert und eine Ligation mit 2xCa*FbFP* durchgeführt.

pIE3-3:
Die Konstruktion erfolgte wie bei pIE3-2 mit 3xCa*FbFP* anstelle von 2xCa*FbFP*, wobei 3xCa*FbFP* (*Bgl*II, *Bam*HI) aus dem Vektor pGEM-T-3xCaFbFP herausgeschnitten wurde.

pIE5, pIE5-1, pIE5-2:
950 bp *TDH3*-Promotorregion wurden aus genomischer DNA von *C. albicans* CAI4 amplifiziert und durch die verwendeten Oligonukleotide (TDH3p-FW-BamHI/-RV-BglII) *Bam*HI- und *Bgl*II- Schnittstellen an den Enden generiert. Die Zielvektoren pDS1044-1 und pBI-1 (Konstruktion von pIE5) bzw. pIE1, pIE1-2, pIE2 und pIE2-2 wurden einer Restriktion mit *Bam*HI und *Bgl*II unterzogen, wodurch der *ACT1p* bzw. *PCK1p* herausgeschnitten wurde. Die Plasmide wurden anschließend jeweils mit dem geschnittenen PCR-Fragment ligiert. Als korrekt identifizierte Plasmide, mit denen in dieser Arbeit weiter gearbeitet wurde, basieren bei der Konstruktion von pIE5 (*TDH3p*) auf dem Plasmid pBI-1, bei pIE5-1 (*TDH3p*-Ca*FbFP*) auf pIE2 und pIE5-2 (*TDH3p*-2xCa*FbFP*) leitet sich von dem Plasmid pIE1-2 ab.

pIE5-3:
Zur Konstruktion von pIE5-3 wurde 3xCa*FbFP* (*Bgl*II- und *Bam*HI) aus dem Plasmid pGEM-T-3xCaFbFP geschnitten. Parallel wurde der Zielvektor pIE5 nach Restriktion mit *Bgl*II dephosphoryliert und eine Ligation durchgeführt.

pIE5-4:
Der Vektor pIE5-4 basiert auf dem Plasmid pIE5-2 und entstand durch Integration eines weiteren 2xCa*FbFP*-Gens ohne Stopp-Kodon stromabwärts von *TDH3p*.

2.5.2 Plasmidkonstruktionen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche

pIE9:
Ca*FbFP* wurde ohne Stoppkodon mit spezifischen Oligonukleotiden (FFP-EcoRI-FW-opti, FFP-noStop-XhoI-RV-opti) aus dem Plasmid pGA18-CaFbFP amplifiziert, wodurch *Eco*RI- bzw. *Xho*I-Schnittstellen an den Enden des Fragments generiert wurden. Anschließend wurden PCR-Fragment und Zielvektor pYD1 einer Restriktion mit den

Enzymen *Eco*RI und *Xho*I unterzogen und eine Ligation von Vektor und Fragment durchgeführt.

pIE9K18A:
pIE9K18A wurde durch gerichtete Mutagenese des Plasmids pIE9 mit spezifischen „Primern" (CaFbFP-Lys-mutaPCR-FW/RV), welche anstelle des Basentripletts AAA die Basen GCA enthalten, hergestellt.

pYD1-2µ, pIE9-2µ, pIE9K18A-2µ:
Die *2-micron ori*-Sequenz aus dem Plasmid YEp24 wurde mit „Primern" (2mikron-vs-CEN6-FW/RV) amplifiziert, welche je 80 bp lange Sequenzen mit Homologie zu den Zielvektoren an den Enden des PCR-Fragments einfügen. Die Bereiche, zu denen diese Anhänge homolog sind, liegen jeweils stromauf- und stromabwärts der *CEN6*/*ARS4*-Sequenz. Außerdem wurde die *CEN6*/*ARS4*-Kassette von pYD1, pIE9 bzw. pIE9K18A durch Restriktion mit den Enzymen *Ppu*MI und *Acc*I aus den Vektoren herausgeschnitten. Anschließend wurde der *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 mit dem jeweiligen geöffneten Vektor sowie dem aufgereinigten PCR-Fragment transformiert. Plasmid-tragende Transformanden wurden durch Kolonie-PCR (Primer: 2mikron-vs-CEN6-FW/RV) identifiziert und eine Plasmidisolation zur Verifizierung der Sequenz durchgeführt.

pOXY5:
Der Zielvektor pCB3 wurde durch Restriktion mit dem Enzym *Nhe*I geöffnet. Parallel wurde das Ca*YFP*-Gen aus dem Plasmid pOXY2 amplifiziert, wobei durch die verwendeten Oligonukleotide (YFP-FW-NheI/YFP+linker-RV-NheI) *Nhe*I-Schnittstellen an den Enden des Fragments einfügt wurden. Es folgte die Restriktion des PCR-Produkts mit dem Enzym *Nhe*I und eine anschließende Ligation von Vektor und Fragment.

pOXY10:
Die Konstruktion von pOXY10 erfolgte wie bei pOXY5, wohingegen anstelle von Ca*YFP* das 2xCa*FbFP*-Gen mit Oligonukleotiden (2xCaFbFP-FW-NheI/-RV-NheI) aus dem Plasmid pIE1-2 amplifiziert wurde.

2.5.3 Plasmidkonstruktionen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern

pIE3-HTB1, pIE3-2-HTB1:
Die Vektoren pIE3 und pIE3-2 wurden mit dem Enzym *Spe*I einige Basenpaare stromabwärts des *GAL1p* aufgeschnitten und das Sc*HTB1*-Gen ohne Stoppkodon aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* THY.AP4 mittels PCR amplifiziert. Die „Primer" (ScHTB1-FW/RV-neu) wurden dabei so gewählt, dass sie an den 5'-Enden jeweils eine 65 bp lange Sequenz beinhalteten, welche homolog zu den Enden des aufgeschnittenen Vektors (pIE3 bzw. pIE3-2) war. Durch Transformation von *S. cerevisiae* mit dem jeweiligen linearisierten Vektor und dem PCR-Fragment wurde das *HTB1*-Gen durch homologe Rekombination in der Hefe, stromaufwärts von Ca*FbFP* bzw. 2xCa*FbFP*, auf den Plasmiden integriert. Plasmid-tragende Transformanden wurden durch Isolation der Plasmide und Verifizierung der Sequenz identifiziert.

pIE1-2-HTB1, pIE5-2-HTB1:
Das Ca*HTB1*-Gen wurde ohne Stoppkodon aus dem Vektor pIE4 amplifiziert, wobei durch die verwendeten Oligonukleotide (CaHTB1-FW-BglII/-RV-BamHI) *Bgl*II- und *Bam*HI-Schnittstellen an den Enden des Fragments eingefügt wurden. Parallel zur Restriktion des Fragments mit den entsprechenden Enzymen, wurden die Plasmide pIE1-2 und pIE5-2 jeweils mit der Endonuklease *Bgl*II zwischen *ACT1*- bzw. *TDH3*-Promotor und

2xCa*FbFP*-Gen geöffnet und anschließend eine Ligation von Ca*HTB1* und dem jeweiligen linearisierten Plasmid durchgeführt.

pIE10:
723 bp von dem 3‘-Bereich des *EFG1-ORF*s mit 1 kb *EFG1*-3’ untranslatierter Region (UTR) wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *C. albicans* CAI4 amplifiziert. Dabei wurden durch die gewählten Oligonukleotide (Efg1-mitte-FW-XbaI/Efg1-3’UTR-RV-XbaI) Schnittstellen für das Enzym *Xba*I an den Enden des Fragments generiert. Das Fragment sowie der Zielvektor pER1367 wurden anschließend mit *Xba*I geschnitten und durch Ligation verbunden. Nach anschließender Transformation von *E. coli* mit dem Ansatz und Identifizierung korrekt konstruierter Plasmide mittels Testrestriktion und Sequenzierung, wurde der Vektor zur Integration der MS2-CP-Bindestelle in die *EFG1*-3‘UTR des Plasmids weiter verwendet (Abb. 2.1). Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide (INFU-CPbs-SalI-FW/-RV) eingesetzt, welche die DNA-Sequenz (je 22 bp) der Bindestelle zweimal aufeinanderfolgend aufwiesen, wobei die beiden Sequenzen durch eine *Sal*I-Schnittstelle verbunden waren. Zusätzlich besaßen die „Primer“ an den 3‘- und 5‘-Enden jeweils 16 bp lange Sequenzen mit Homologie zum modifizierten Zielvektor. Die Oligonukleotide wurden durch eine Hybridisierungsreaktion zu doppelsträngigen Fragmenten zusammengefügt und daraufhin in den *EFG1*-3’UTR-Bereich auf dem zuvor durch Restriktion (*Bsr*GI) geöffneten Vektor integriert. Die Integration erfolgte dabei über Rekombination der homologen Bereiche von Vektor und Fragment mit Hilfe des Rekombinase-basierten “In-Fusion PCR cloning Kits” (Clontech Laboratories, Inc.).

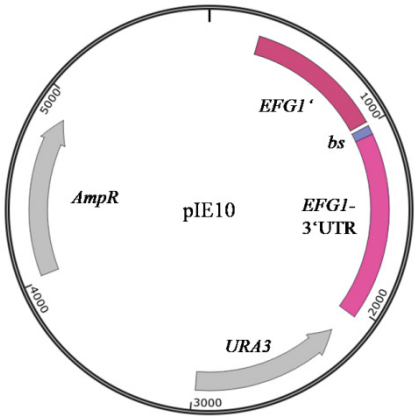


Abb. 2.1: Expressionsplasmid zur mRNA-Markierung in *C. albicans*. Expressionsplasmid pIE10 mit 723 bp des 3‘-Bereichs von *EFG1* (*EFG1*‘), MS2CP-Bindesequenz (*bs*), 1 kb *EFG1*-3’UTR sowie dem Ampicillin-Resistenzgen und *URA3*-Markergen.

2.5.4 Plasmidkonstruktionen zur Anwendung von CaFbFP als Biosensor im Cytoplasma

pOXY1
Der Zielvektor p426GAL1 wurde mit der Restriktionsendonuklease *Spe*I aufgeschnitten und Ca*YFP* von dem Plasmid pYFP-URA3 mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden durch die „Primer“ 75 (YFP-FW) bzw. 63 bp (YFP+linker-LP-RV) lange Sequenzen an den Enden des Fragments einfügt, welche Homologie zum Zielvektor aufwiesen. Zusätzlich wurde über das Rückwärtsoligonukleotid eine 42 bp lange Sequenz zwischen Fragment und dem Homologiebereich eingefügt. Zur weiteren Konstruktion wurde der *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP4 mit dem linearisierten Vektor und dem PCR-Produkt transformiert und die homologen Regionen durch Rekombination in der Hefe verbunden.

pOXY2
Die Konstruktion erfolgte analog zu der Klonierung von pOXY1, jedoch wurde als Zielvektor das Plasmid pIE3 und zur Amplifizierung von Ca*YFP* ein abweichender Rückwärtsprimer (YFP+linker-RV) verwendet.

pOXY7, pOXY8, pOXY9
Die Zielvektoren pIE5 (*TDH3p*), pIE5-1 (*TDH3p*-Ca*FbFP*) und pIE5-2 (*TDH3p*-2xCa*FbFP*) wurden durch Restriktion mit dem Enzym *Bgl*II geöffnet und das Ca*YFP*-Gen mit Verbindungssequenz mit spezifischen Oligonukleotiden (YFP+linker-FW-BglII/-RV-BamHI) aus dem Plasmid pOXY2 amplifiziert. Die Enden des Fragments enthielten durch die gewählten „Primer" Schnittstellen für die Enzyme *Bgl*II und *Bam*HI. Nach anschließender Restriktion mit diesen Enzymen erfolgte die Ligation des Fragments mit dem jeweiligen Vektor.
Bei dem Plasmid pOXY7 wurde zusätzlich durch Mutagenese-PCR (YFP+linker-Stopp-muta-FW/RV) ein Stopp-Kodon stromabwärts der Verbindungssequenz integriert.

2.5.5 Plasmidkonstruktionen zur Anwendung von CaFbFP als Biosensor auf der Zelloberfläche

pOXY3:
Das Ca*YFP*-Gen mit Verbindungssequenz wurde aus dem Plasmid pOXY2 amplifiziert, wobei die verwendeten Oligonukleotide 81 (YFP+linker-pYD-FW) bzw. 65 bp (YFP+linker-pYD-RV) lange Sequenzen mit Homologie zum Zielvektor aufwiesen. Zusätzlich wurde das Plasmid pYD1-2µ mit dem Restriktionsenzym *Not*I linearisiert und Vektor und Fragment durch Transformation von *S. cerevisiae* EBY100 über homologe Rekombination miteinander verbunden.

pOXY4:
Die Klonierung erfolgte wie bei pOXY3, wobei das Plasmid pIE9-2µ als Zielvektor verwendet und mit dem Enzym *Bam*HI geöffnet wurde. Außerdem wurde zur Amplifikation von Ca*YFP* ein abweichendes Rückwärtsoligonukleotid (YFP+linker-pIE9-RV) gewählt.

2.6 Oligonukleotide

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide
(Unterstrichene Basen kennzeichnen die entsprechenden Enzymschnittstellen.)

Name	Sequenz 5' → 3'
TDH3p-FW-BamHI	CGCGGATCCTTGCTCCTCGTCGAC
TDH3p-RV-BglII	GCGAGATCTTGTTAATTAATTTGATTG
FFP-EcoRI-FW-opti	GGAATTCATG GCT TCA TTT C
FFP-noStop-XhoI-RV-opti	CCGCTCGAGTTCCAACAATTTT
CaFbFP-Lys-mutaPCR-FW	CAATTGGAAGTTATTAAAGCAGCTTTGGATCATGTTAGAG
CaFbFP-Lys-mutaPCR-RV	CTCTAACATGATCCAAAGCTGCTTTAATAACTTCCAATTG
2mikron-vs-CEN6-FW	TTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAGAATT CTGAACCAGTCCTAA

2mikron-vs-CEN6-RV	CAAACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATA ACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAATCACAGAA TTCCACGGACTATAGA
YFP-FW-NheI	CTAGCTAGCATGTCTAAAGGTGAA
YFP+linker-RV-NheI	CTAGCTAGCGTCGACGGCG
2xCaFbFP-RV-NheI	ATCCCCCTATTAGCTAGCCCCGAGTTCCAA
2xCaFbFP-FW-NheI	TCATTCAGATCTGCTAGCATGGCTTCATTT
ScHTB1-FW-neu	GTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATA CTTTAACGTC AAGGAGAAAAAACATGTCTGCTAAAGCC
ScHTB1-RV-neu	TGATCCAAAGCTTTTTTAATAACTTCCAATTGACCTGGAATAC CAAATGA TTGAAATGAAGCCATTGCTTGAGTAGAGGA
CaHTB1-FW-BglII	GAAGATCTATGGCCCCAAAAGCAG
CaHTB1-RV-BamHI	CGGGATCCACTAGAAGCAGATGAG
Efg1-mitte-FW-XbaI	CGTCTAGAAACCGGAGTAACT
Efg1 3'-UTR-RV-XbaI	CGTCTAGAGAAATTGAAGGATG
INFU-CPbs-SalI-FW	ATATCATTTGTGTACAACATGGGTGATCCTCATGTTTTGTCGA CACATGGGTGATCCTCATGTTTTTGTACATCACCTTCTG
INFU-CPbs-SalI-RV	CAGAAGGTGATGTACAAAAACATGAGGATCACCCATGTGTCG ACAAAACATGAGGATCACCCATGTTGTACACAAATGATAT
YFP-FW	GTAATAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATA CTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGATTCTATGTCTAAA GGTGAA
YFP+linker-LP-RV	TAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATA TCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGTCGACGGCGCCGCTGCCGCG CGGCACCAAGCCCGCGAGCTCTTTGTACAATTCATC
YFP+linker-RV	ATCCAAAGCTTTTTTAATAACTTCCAATTGACCTGGAATACCA AATGATTGAAATGAAGCCATGTCGACGGCGCCGCTGCCGCGC GGCACCAAGCCCGCGAGCTCTTTGTACAATTCATC
YFP+linker-FW-BglII	GAAGATCTATGTCTAAAGGTGAA
YFP+linker-RV-BamHI	GGATCCGTCGACGGCG
YFP+linker-Stopp-muta-FW	CGCCGTCGACGGATAGCGAGGGGGAATTCAC
YFP+linker-Stopp-muta-RV	GTGAATTCCCCCTCGCTATCCGTCGACGGCG
YFP+linker-pYD-FW	AGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGAC GATGACGATAAGGTACCAGGATCCAGTGTGGTGGAATTCATG TCTAAAGGTGAA
YFP+linker-pYD-RV	GCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTA CCTTCGAAGGGCCCTCTAGACTCGGTCGACGGCGCCGCT
YFP+linker-pIE9-RV	TGATCCAAAGCTTTTTTAATAACTTCCAATTGACCTGGAATAC CAAATGATTGAAATGAAGCCATGTCGACGGCGCCGCT

2.7 Methoden zur Arbeit mit Nukleinsäuren

2.7.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3 ml ÜK wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 Upm, 1 min, RT) und das Zellpellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Dann wurden 300 µl Puffer P2 (1 % (w/v) SDS; 200 mM NaOH) zugegeben, invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Als Nächstes wurden 300 µl Puffer P3 (3 M Kaliumacetat) hinzugegeben, erneut gemischt und bei 4 °C für 20 min bei 10 000 Upm zentrifugiert. Es folgte die Abnahme des Überstandes sowie Fällung der DNA mit 700 µl Isopropanol, an die sich eine Sedimentierung der DNA durch Zentrifugation (13.000 Upm, 30 min, RT) anschloss. Der Überstand wurde verworfen und die DNA durch Zugabe von 1 ml 70 % (v/v) Ethanol und fünfminütiger Zentrifugation gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet für etwa 20 min durch Öffnen des Reaktionsgefäßes an der Luft getrocknet und in 30 µl ddH_2O aufgenommen.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde eine „Midi-Präp" durchgeführt. Dazu wurden 50 ml ÜK geerntet (6.000 x g, 15 min) und mit den Puffern 1-3, wie oben beschrieben, behandelt, wobei jeweils 4 ml Puffer verwendet wurden. Der nach folgender Zentrifugation abgenommene DNA-haltige Überstand wurde dann mit 0,7 Vol Isopropanol gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Die so gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 30 min sedimentiert, anschließend 2 ml 70 % Ethanol (v/v) zu dem Pellet gegeben und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 10 min). Auch hier wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl ddH_2O aufgenommen.
Abschließend wurde die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA mit Hilfe des NanoDrop2000c (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen.
Teilweise wurden anstelle der beschriebenen Methoden das „NucleoSpin® Plasmid Kit" (Macherey-Nagel, Düren) oder das "Plasmid Midi Kit" (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisungen verwendet.

2.7.2 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurde eine modifizierte Methode nach Robzyk *et al.* (1992) angewendet. Es wurden 3 ml einer ÜK des entsprechenden Stamms durch Zentrifugation pelletiert, die Zellen in 200 µl STET Puffer (8 % (w/v) Saccharose; 50 mM Tris-HCl (pH 8); 5 % (v/v) Triton X-100) aufgenommen und mit 1 Vol (w/v) sterilen Glasperlen versetzt. Dann wurden die Zellen durch Schütteln auf dem Vibrax für 30 min oder mit Hilfe des „FastPrepAutomatedHomogenizer" (MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Frankreich) 6 x 40 s bei 65 m/s und 4 °C aufgebrochen, der Suspension 100 µl STET Puffer hinzugegeben und anschließend für 3 min bei 95 °C aufgekocht. Zelltrümmer sowie Glasperlen wurden danach abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 13.000 Upm) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurden 50 µl Ammoniumacetat (7,5 M) hinzugefügt und die Proben für 1 h bei –20 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 4 °C, 13.000 Upm) wurden 100 µl des Überstands mit 200 µl Ethanol (absolut) versetzt, die DNA durch Zentrifugation (30 min, 13.000 Upm) sedimentiert und das Pellet für etwa 10 min an der Luft getrocknet, bevor es in 20 µl ddH_2O aufgenommen wurde. 10 µl (7 µl bei Aufschluss mit dem FastPrepAutomated Homogenizer) dieser DNA-haltigen Lösung wurden dann zur Transformation von *E. coli* DH5α oder Top10 verwendet. Nach erfolgreicher Transformation konnte das Plasmid aus 1-2 Transformanden, wie unter 2.7.1 beschrieben, isoliert werden.

2.7.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Sherman *et al*. (1986). Dafür wurden die Zellen einer 5 ml ÜK zunächst

geerntet und in 5 ml sterilem ddH_2O gewaschen. Das Zellpellet wurde daraufhin in 400 µl frisch angesetzter SCE/DTT/Zymolyase-Lösung (96 % SCE [1 M Sorbitol; 100 mM Na-Citrat (pH 5,8); 10 mM EDTA (pH 8)]; 5 mM DTT; 3,5 % (w/v) Zymolyase-100T) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden sedimentiert (5 min, 4.000 Upm) und in 500 µl 50 mM EDTA (pH 8) und 50 µl 10 % (w/v) SDS resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C zur Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine wurde die Suspension auf RT abgekühlt. Die Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 100 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 6) und Inkubation für 30-90 min auf Eis gefällt. Es folgte die Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C) der Proben für 15 min, woraufhin der DNA-haltige Überstand abgenommen und zum Fällen mit 900 µl eiskaltem Ethanol (absolut) versetzt wurde. Nun wurde die DNA durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min (13.000 Upm, 4 °C) sedimentiert, bevor sie in 400 µl RNase-Lösung (200 µg/ml RNase; 150 mM Na-Acetat (pH 5,9); 93 % (v/v) TE-Puffer [10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0]) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. RNase A (Boehringer Mannheim) wurde zuvor in einer Konzentration von 1 mg/ml in TE-Puffer gelöst und 30 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung bei -20 °C gelagert. Als nächstes wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, bei der als erstes 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und die obere, wässrige Phase nach 2-minütiger Zentrifugation (13.000 Upm) abgenommen wurde. Dann wurden 800 µl Ethanol (absolut) hinzugegeben, um die DNA über Nacht bei –20 °C zu fällen. Nach Zentrifugation (25 min, 13.000 Upm, 4 °C) wurde das DNA-Pellet abschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.7.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* wurde die Methode nach Hoffman & Winston (1987) angewendet. Dabei wurden die Zellen einer ÜK in YPD (5 ml) durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) sedimentiert und das Pellet durch Aufnahme in 0,5 ml ddH_2O und erneuter Zentrifugation gewaschen. Als Nächstes wurden die Zellen mit 200 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8); 100 mM NaCl; 2 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) SDS) sowie 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt und nach Zugabe von 0,3 g sterilen Glasperlen für 3 min auf dem Vibrax geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8)) zu der Suspension gegeben und die Proben für 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, woraufhin die Fällung der DNA durch Abnahme der wässrigen Phase und Zugabe von 1 ml 100 % (v/v) Ethanol folgte. Die Proben wurden als nächstes zentrifugiert (30 min, 13.000 Upm), das DNA-haltige Pellet für einige Minuten an der Luft getrocknet und abschließend in 400 µl TE-Puffer mit 30 µg RNase A resuspendiert. Zum Schluss wurden die Reaktionsgemische für 5 min bei 37 °C inkubiert und 10 µl 4 M Ammoniumacetat sowie 1 ml Ethanol (100 %) hinzugegeben, bevor die DNA erneut sedimentiert (30 min, 13.000 Upm) und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen wurde.

2.7.5 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt, bei der die Fragmente der Größe nach getrennt wurden. Die Proben wurden dazu in 1/6 Vol 6x Ladepuffer („6x Loading Dye Solution“, Fermentas) aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte i. d. R. in Ethidiumbromid-haltigen 1 % (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 8); 2 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA (pH8); pH 7,8), bei konstanter Spannung von 90 V, nach der Methode von Sambrook *et al*. (1989). Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde der Größenstandard „1 kb DNA ladder“ der Firma Fermentas aufgetragen. Um die Auftrennung kleinerer Fragmente (< 1 kb) zu ermöglichen, wurden 2 % (w/v) Agarosegele

verwendet. Die Gele wurden zur anschließenden Detektion der Banden unter UV-Licht fotografiert.

Zusätzlich wurde die Gelelektrophorese dazu verwendet, DNA-Fragmente aufzureinigen. Die zu isolierenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten, einzeln in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des „Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Abschließend wurde die Konzentration des Fragments mit Hilfe des NanoDrop2000c bestimmt.

2.7.6 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel

Nach elektrophoretischer Auftrennung von chromosomaler DNA in Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen wurde die Konzentration der DNA-Banden durch Vergleich mit Banden definierter Mengen ungeschnittener DNA des Bakteriophagen λ abgeschätzt.

2.7.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridiserung von Oligonukleotiden wurden je 500 pmol beider Oligonukleotide zusammen mit 1/10 10x Hybridisierungspuffer (100 nM Tris-HCl (pH 7,5); 1 M NaCl) in einem Endvolumen von 20 µl für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend durch Ausschalten des Heizblocks langsam auf RT abgekühlt.

2.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.7.8.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR (nach Sambrook, 1989)
Definierte Mengen an Matrizen-DNA (15-100 ng), dNTP-Gemisch (Fermentas, je 200 µM), high fidelity *Taq*-Polymerase (Roche, 2,6 U), 10 x Polymerase-Puffer (1/10 Vol) und dem entsprechenden Starteroligonukleotidpaar (Primer) (je 400 nmol) wurden in ein PCR-Gefäß gegeben und zur Amplifikation eine PCR durchgeführt. Das Programm der PCR erfolgte wie in Tab. 2.8 dargestellt, wobei die Schritte der Denaturierung, Anlagerung der „Primer" und Elongation 25-30-mal aufeinander folgten. Nach Beendigung wurde der Erfolg der PCR mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Proben mit Hilfe des „PCR Purification Kit" der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt und die Konzentration mittels NanoDrop2000c bestimmt.

Tab. 2.8: Programm der PCR

Phase	**Temperatur [°C]**	**Zeit [s]**
Initiale Denaturierung	95	120
Denaturierung	95	30
Anlagerung der „Primer"	abhängig von den „Primern"	30
Elongation	68 oder 72*	etwa 60 s/kb
Terminale Elongation	68 oder 72*	420

*(je nach Fragmentgröße)

2.7.8.2 Gerichtete Mutagenese plasmidkodierter DNA durch PCR
Um gerichtete Mutationen von DNA zu erzielen, wurde das „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit" (Agilent Technologies, Inc., Kanada) verwendet. Es wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren, so dass im Gegensatz zu der konventionellen PCR-Methode die zum Kit gehörige *PfuUltra* HF DNA-Polymerase und ein abweichendes PCR-Programm (s. Herstellerangaben) verwendet wurden. Nach Restriktion des PCR-Ansatzes für 10 min bei 37 °C mit dem Enzym *Dpn*I des Kits erfolgte die Transformation des *E. coli*-Stamms DH5α bzw. Top10 mit 5 µl des PCR-Ansatzes.

2.7.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen klonierter DNA-Fragmente wurden durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

2.7.10 Restriktion von DNA

Vektor bzw. Fragment wurden zusammen mit einem oder zwei Enzymen und dem entsprechenden Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und nach Anweisung des Herstellers (NEB bzw. Roche) eine Restriktion durchgeführt. Diese erfolgte ÜN oder für 2-3 h bei 37 °C. Testrestriktionen wurden dagegen nur 1/2-1 h bei 37 °C verdaut.

2.7.11 Auffüllen von 5‘-überstehenden Enden nach Restriktion

Um die Ligation von Vektor und Fragment zu ermöglichen, deren Enden nach Restriktion inkompatibel sind, wurden die 5‘-Enden vor der Ligation aufgefüllt. Dazu wurden 1 µg Fragment, 10 mM dNTP-Mix, 1/10 Vol 10x Auffüllpuffer (500 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM DTT; 50 µg/ml BSA) und 1 U Klenow-Enzym in einem Reaktionsgefäß gemischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch zehnminütige Inkubation bei 65 °C deaktiviert. Vor der Ligation wurde der Vektor zusätzlich dephosphoryliert (s. 2.7.12.1), um eine Religation der glatten Enden zu vermeiden.

2.7.12 Ligation

Ligationen von ein oder zwei Fragmenten mit einem Vektor wurden mit dem „Quick Ligation Kit“ (NEB) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 50 ng Plasmid-DNA und die dreifache molare Menge des zu klonierenden Fragments eingesetzt.

2.7.12.1 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Vor der Ligation von Plasmiden, die mit einem oder zwei Enzymen, die kompatible Überhänge generieren, aufgeschnitten wurden, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt, um die Religation des Vektors zu verhindern. Dazu wurden 1/10 Volumen 10x „Antarctic Phosphatase Reaction Buffer“ und 5 U des Enzyms „Antartic Phosphatase“ (NEB) mit 1 µg DNA gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65 °C.

2.7.12.2 Ligation mit dem pGEM-T Vektor System

In einigen Fällen ging der direkten Klonierung eine Subklonierung des Fragments in den Hilfsvektor pGEM-T (Promega GmbH) voraus. Diese wurde nach Hersteller-Anweisung durchgeführt. Um eine „Blau-Weiß Selektion“ zur Auswahl von Transformanden mit erhaltenem Plasmid zu erreichen, enthielten die Selektionsplatten zusätzlich 100 µl IPTG (24 mg/ml) und 50 µl X-Gal (50 mg/ml).

2.7.12.3 Ligation mit „In-Fusion PCR cloning Kit”

Ligationen mit Hilfe des “In-Fusion PCR cloning Kits” (Clontech Laboratories, Inc., Kalifornien) wurden nach Herstelleranweisung durchgeführt. Bei der Amplifizierung des zu klonierenden DNA-Fragments wurden Oligonukleotide verwendet, welche jeweils eine 16 bp-lange Sequenz mit Homologie zum Zielvektor an den Enden des Fragments generieren.

2.8 Transformation von *E. coli*

2.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli*

50 ml LB-Medium wurden mit einer 5 ml ÜK von *E. coli* DH5α- bzw. Top10-Zellen auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer OD_{595} von 0,4-0,6 kultiviert. Nach 15-120 min Inkubation auf Eis erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 13.000 Upm). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 20 ml RF1-Puffer (30 mM KCH_3CO_2; 50 mM $MnCl_2$; 100 mM $RbCl_2$; 10 mM $CaCl_2$; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und erneut für 1-2 h auf Eis inkubiert. Als nächstes wurde die Zellsuspension bei 13.000 Upm für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 4 ml RF2 **(**10 mM MOPS; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM $RbCl_2$; 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,8) aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen nach 15 minütiger Inkubation auf Eis in 300 µl Aliquots aufgeteilt und bei –70 °C gelagert.

2.8.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen von *E. coli*

150 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 (pGEM-T Ligationen) bzw. 5 µl (alle anderen Ligationen) Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA versetzt und für 20 min auf Eis gestellt. Nach 90 s Hitzeschock im Heizblock bei 42 °C wurden 700 µl LB-Medium hinzugegeben und die Zellen für 30-90 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Anzucht der Transformanden erfolgte unter Selektionsdruck durch Ampicillin auf LB-Agar.

2.8.3 Test auf Klonierungserfolg in *E. coli*

2.8.3.1 Test durch PCR der Kolonie

In einigen Fällen wurde der Erfolg der Klonierung in *E. coli* mittels PCR überprüft. Dazu wurden einige Transformanden jeweils von der Agarplatte auf neuen LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und etwas Zellmaterial zu einem PCR-Ansatz mit geeigneten „Primern“ hinzugefügt. Nach Beendigung des PCR-Programms (s. Tab. 2.8) konnte das Ergebnis anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung des Amplikons ausgewertet werden. Dabei wurde die initiale Denaturierung abweichend für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde das Ergebnis der Kolonie-PCR in den meisten Fällen mit einer Plasmidpräparation und anschließender Restriktion der DNA verifiziert.

2.8.3.2 Test durch Plasmidpräparation und Restriktion

Nach Wachstum der Transformanden wurde der Erfolg der Ligation getestet, indem einige Kolonien auf eine weitere Platte überführt wurden. Zusätzlich wurde LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, angeimpft. Nach Wachstum ÜN wurden eine Plasmid-Präparation der Flüssigkulturen und danach eine Testrestriktion der Plasmide durchgeführt. Eine anschließende Gelelektrophorese der Proben zeigte, welche Kolonie das Plasmid mit dem eingebrachten Fragment trug.

2.9 Transformation von Hefezellen

2.9.1 Transformation von *C. albicans* (nach Mitchell (Wilson *et al*., 2000))

Eine Kultur des entsprechenden *C.* albicans-Stamms wurde bei 30 °C ÜN in YPD-Medium angezogen und anschließend in 50 ml YPD-Medium auf eine Anfangs-OD_{600} von 0,2 überimpft. Nach Wachstum der Zellen bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,7 wurden diese durch 5-minütige Zentrifugation bei 3.500 Upm sedimentiert, in 5 ml LATE Puffer (0,1 M LiAc; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA; pH 5) resuspendiert und nach

erneuter Zentrifugation in 0,5 ml LATE Puffer aufgenommen. Als Nächstes wurden 100 µl der Zellsuspension mit 4-6 µg zu transformierender DNA sowie 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG 3.350 in LATE-Puffer) wurden die Proben über Nacht bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 1 h bei 42 °C, woraufhin die Zellen für 5 min bei 3.500 Upm zentrifugiert wurden. Danach wurden die Zellen in 1 ml YPD aufgenommen und 2-4 h bei 30 °C inkubiert. Nach erneuter Sedimentation der Zellen wurden diese in 1 ml TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen, in 200 µl desselben Puffers aufgenommen und auf entsprechendem Agar ausplattiert. Die Anzucht der Transformanden erfolgte für 2-3 Tage bei 30 °C unter Selektionsdruck durch Minimal-medien (SD bzw. SD Ade^--Medium) bzw. YPD-Agar mit 200 µg/ml Nourseothricin.
Alternativ wurde eine zeitsparende Methode zur Transformation von Plasmiden in *C. albicans* durchgeführt. Dazu wurden 200 µl einer 5 ml ÜK von *C.* albicans-Zellen durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) geerntet und das Pellet in frisch angesetztem OSB-Puffer (200 µl 1 M LiAc; 800 µl 50 % PEG 8.000; 15 mg DTT) resuspendiert. Danach wurden 4-6 µg Plasmid-DNA und 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zu den Zellen gegeben und der Ansatz 30-60 min bei 43,5 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und das Zellpellet in TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Wie bei der oben beschriebenen Methode wurden die Zellen unter Selektionsdruck angezogen.

2.9.2 Sphäroplastentransformation von *C. albicans*

In einigen Fällen wurde anstelle der Transformation nach Mitchell (2000) eine Transformation von *C. albicans*-Sphäroplasten durchgeführt. Dabei wurde eine leicht abgewandelte Version der Methode nach Srikantha *et al*. (1995) angewendet, welche wiederum eine Modifikation der Methode von Sherman *et al*. (1986) darstellt. Zur Herstellung der Sphäroplasten wurden 50 ml YPD Medium mit einer 5 ml ÜK (YPD) des entsprechenden *C. albicans*-Stamms auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und die Zellen bis zum exponentiellen Wachstum bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) sedimentiert und das Pellet in 5 ml ddH_2O gewaschen. Danach wurden die Zellen in 20 ml frisch angesetztem SED (1 M Sorbitol; 25 mM EDTA (pH 8); 50 mM DTT) aufgenommen, für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 3.500 Upm). Zum Abdau der Zellwand wurden die Zellen in 20 ml 1 M Sorbitol gewaschen und für 20 min bei 30 °C in 20 ml SCE (1 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA (pH 8)) mit 40 µl Zymolyase-100T (2,5 mg/ml) inkubiert, wobei der Vorgang der Sphäroplastierung zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft wurde. Dazu wurden jeweils 5 µl Zellen und 5 µl 10 % (w/v) SDS auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet. Die Sphäroplasten wurden anschließend abzentrifugiert (3 min 2.500 Upm), zweimal mit 20 ml Sorbitol (1 M) und einmal mit STC (1 M Sorbitol; 10 mM $CaCl_2$; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)) gewaschen und dann in 1 ml STC resuspendiert. Die Transformation der Zellen schloss sich entweder direkt an die Sphäroplastierung an oder erfolgte nach Lagerung ÜN bei 4 °C. Dazu wurden je 100 µl der Zellen mit 4-6 µg Plasmid-DNA und 5 µl aufgekochter (5 min, 95 °C) Heringssperma-DNA (10 mg/ml) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG (20 % PEG 4.000; 10 mM $CaCl_2$; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)) hinzugegeben und eine weitere zehnminütige Inkubation bei RT durchgeführt. Es folgte die Sedimentierung der Zellen (3 min, 2.500 Upm), woraufhin das Pellet in frisch angesetzter SOS-Lösung (1 M Sorbitol; 33,5 % YPD-Medium; 6,5 mM $CaCl_2$) aufgenommen und für 1 h bei 30 °C belassen wurde. Der Ansatz wurde abschließend zu 6 ml flüssigem Top-Agar (1 M Sorbitol; 0,67 % Hefe-Stickstoff-Basis;

2 % Glucose; 1 % Agar) gegeben, auf Sorbitol-Platten (wie Top-Agar, aber 2 % Agar) ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C bebrütet.

2.9.3 Transformation von *S. cerevisiae* (nach Giertz & Woods, 2002)

Die Transformation von *S. cerevisiae* THY.AP4 oder EBY100 mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Giertz & Woods (2002) durchgeführt. Es wurden 49 ml YPD-Medium mit 1 ml einer 5 ml ÜK angeimpft und für 4–5 h bei 30 °C auf dem Schüttler wachsen gelassen. Durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) wurden die Zellen sedimentiert und das Pellet in 0,5 Vol sterilem ddH_2O gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 1 ml LiAc (100 mM) aufgenommen, kurz abzentrifugiert und das Sediment mit 500 µl LiAc (100 mM) resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden anschließend 50 µl der Zellsuspension abzentrifugiert und das Zellpellet in 240 µl PEG 3.350 (50 %), 36 µl LiAc (1 M), 5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und 50 µl (4-6 µg) zu transformierender Plasmid-DNA resuspendiert. Nach Inkubation für mindestens 30 min bei 30 °C wurde ein fünfzehnminütiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Zuletzt wurden die Zellen erneut sedimentiert, in 1 ml sterilem ddH_2O gewaschen und in 1 ml desselben Puffers aufgenommen, bevor 25-200 µl der Zellsuspension auf Selektivmedium (SD+Leu oder SD Ura$^-$) ausplattiert wurden. Das Wachstum der Transformanden erfolgte für 2-4 Tage bei 30 °C.

2.9.4 Transformation gefrorener Zellen von *S. cerevisiae*

Alternativ wurde zur Transformation von *S. cerevisiae* eine Methode angewendet, die es ermöglicht, kompetente Zellen bei -70 °C zu lagern (Dohmen *et al*., 1991). Dazu wurden die Zellen ebenfalls in 50 ml YPD Medium angezogen, sedimentiert und anschließend in 25 ml Lösung 1 (10 mM Bicin-NaOH (pH 8,35); 3 % (w/v) Ethylenglykol) gewaschen. Als Nächstes wurde das Pellet in 1 ml derselben Lösung aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -70 °C gelagert. Zur Transformation der Zellen mit Plasmid-DNA wurden je 2-5 µg DNA und 50 µg zuvor aufgekochter Heringssperma-DNA in einem Maximalvolumen von 20 µl zu den gefrorenen Zellen gegeben und für 5 min bei 30 °C auf dem Vibrax geschüttelt. Danach wurden 1,4 ml Lösung 2 (40 % (w/v) PEG 1.000; 0,2 M Bicin-NaOH (pH 8,35)) hinzugegeben und die Proben für 1 min auf dem Vortex gemischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 30 °C, woraufhin die Zellen zentrifugiert (5 min 3.500 Upm) und das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Ansätze jeweils auf Selektivmedium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C wachsen gelassen.

2.9.5 Klonierung von Vektor und Fragment durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Um eine *in vivo* Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor in *S. cerevisiae* zu ermöglichen, wurde zunächst das Fragment mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden die „Primer“ so gewählt, dass sie an den Enden des Amplifikats homologe Bereiche (65-80 bp) zum Zielvektor generieren. Anschließend wurde der *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP4 mit 4 µg linearisiertem Vektor sowie der dreifachen molaren Menge des aufgereinigten PCR-Fragments nach der Methode von Giertz und Woods (s. 2.9.3) transformiert. Zur Verifizierung des konstruierten Plasmids erfolgte eine Isolation des Vektors aus *S. cerevisiae* (s. 2.7.2) und dessen Transformation in *E. coli*. Daraufhin konnte der Klonierungserfolg durch Sequenzierung der DNA sichergestellt werden.

2.9.6 Test auf Klonierungserfolg in Hefezellen

Um Hefe-Transformanden auf die erfolgreiche Aufnahme von Plasmid-DNA zu untersuchen, wurde ein wenig Zellmaterial in 50 µl NaOH (0,02 M) aufgenommen und 10 min bei 95 °C aufgekocht. Mit 4-6 µl dieser Suspension wurde eine PCR mit

entsprechenden „Primern“ durchgeführt, wobei die initiale Denaturierung abweichend für 10 min erfolgte.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Gewinnung von Rohextrakten aus Hefezellen

Mit den Zellen von 5 (10) ml einer ÜK wurden 10-100 ml des entsprechenden Mediums auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden nach dem Wachstum durch Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) sedimentiert und für mindestens 1 h bei -20 °C gelagert. Je nach Kulturvolumen wurde das aufgetaute Zellpellet anschließend in 200-1.000 µl Puffer E (25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 10 % (v/v) Glycerin; pro 10 ml 1 Proteinaseinhibitortablette („cOmplete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets“, Roche)) resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurde 1 Vol Glasperlen zu der Zellsuspension gegeben und für etwa 30 (*S. cerevisiae*) bis 50 (*C. albicans*) min bei 4 °C auf dem Vibrax geschüttelt, wobei der Aufschluss der Zellen zwischenzeitlich unter dem Mikroskop überprüft wurde. Alternativ erfolgte dieser Schritt 6 x für 40 s bei 6,5 m/s und 4 °C mit Hilfe des „FastPrepAutomatedHomogenizer“ (MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Frankreich). Dabei wurden die Reaktionsgefäße nach jedem Schritt für 3 min auf Eis abgekühlt.
Abschließend wurden Zelltrümmer sowie Glasperlen durch zehnminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4 °C sedimentiert und der Überstand zur weiteren Untersuchung verwendet.

2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Die Konzentration von Proteinen wurde durch einen Bradford-Test bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:10 in ddH_2O verdünnt und je 5 µl der Verdünnung bzw. 5 µl ddH_2O (Leerwert) in eine 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl zuvor verdünntem (1:5 in ddH_2O) Bradfordreagenz (Protein Assay Reagent, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gestartet. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe des ELx800 Absorptions-Readers (BioTek, Bad Friedrichshall) gemessen und die Proteinkonzentration anschließend anhand einer zeitgleich mit Rinderserum-Albumin (BSA) aufgenommenen Eichgeraden bestimmt.

2.10.3 Methoden zur Western-Blot-Analyse

2.10.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wurden, wenn nicht anders vermerkt, 100 µg Proteinrohextrakt in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) BPB; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen und bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Bei Probenvolumen über 10 µl wurden vor dem Zusatz von Probenpuffer definierte Mengen Protein im Rohextrakt gefällt und anschließend in 20 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine aus Proteingemischen wurden dann unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-PAGE nach Sambrook (1989) in Systemen der Firma Bio-Rad aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgte in 8 bzw. 10 % Gelen oder 4-20 % Gradienten-gelen („Precise Tris-HEPES Gels“, Thermo Scientific) in Laufpuffer (100 mM Tris; 100 mM HEPES; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8) bei konstanter Spannung von 120 V für etwa 60 min. Zur Abschätzung der molekularen Masse der Proteine wurde der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth) aufgetragen.

2.10.3.2 Western-Blot (Elektro-Blot)

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine zunächst durch Elektrotransfer auf eine Polyvinyldenfluorid (PVDF)-Membran (Imobilon-P, Milipore) immobilisiert. Dazu wurde die Membran durch 30 s Inkubation in Methanol aktiviert, für einige Sekunden in ddH_2O gelegt und anschließend mit Transferpuffer (3 g Tris; 4,08 g Bicin; 200 ml Methanol; ad 1.000 ml ddH_2O) benetzt. In der Blot-Kammer wurden einige Schichten Whatman-Papier auf mehrere Schwämme gelegt, wobei alle Komponenten zuvor mit Transferpuffer getränkt wurden. Auf das Whatman-Papier wurden das Gel und darüber die Membran gelegt, worauf erneut mehrere Schichten Whatman-Papier und einige Schwämme folgten. Die Blot-Kammer wurde in die Blotting Apparatur eingesetzt, mit Transferpuffer gefüllt und anschließend der äußere Teil der Apparatur mit Wasser befüllt, um die Kammer zu kühlen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4 °C ÜN bei 10 V oder alternativ bei 40 V für 90 min. Nach Übertragung der Proteine wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und einer reversiblen Ponceau-Färbung (0,1 % (w/v) Ponceau S; 5 % (v/v) Essigsäure) unterzogen, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Die Membran wurde anschließend mit Wasser entfärbt und für 1 h bei RT (alternativ: ÜN bei 4 °C) zur Blockierung mit 10 % Magermilchpulver in 20 ml TBST-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20; pH 7,5) auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten zwei fünfminütige Waschschritte in TBST, bevor die Membran für 1 h bei RT (ÜN, 4 °C) mit dem primären Antikörper (Verdünnung s. Tab. 2.9) behandelt wurde. Nicht gebundener Antikörper wurde danach durch drei Waschschritte in TBST für je 5 min entfernt, der sekundäre Meerettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Verdünnung s. Tab 2.10) auf die Membran gegeben und ebenfalls für 1 h bei RT (ÜN 4 °C) inkubiert. Durch vier fünfminütige Waschschritte in TBST wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Abschließend wurde das Chemilumineszenzsubstrat „SuperSignal® West Dura“ (Pierce) auf der Membran verteilt und die entstehenden Lichtsignale mit Hilfe des „Image Quant LAS 400 mini“ (GE Healthcare, Solingen) detektiert und fotografiert.

Tab. 2.9: In dieser Arbeit für Western Blots verwendete primäre Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Anti-EcFbFP	Kaninchen	1:20.000	T. Drepper, FZ Jülich
Anti-GFP	Kaninchen	1:1.000	Invitrogen
Anti-V5	Maus	1:5.000	Invitrogen
Anti-Xpress™	Maus	1:5.000	Invitrogen

Tab. 2.10: In dieser Arbeit für Western Blots verwendete sekundäre Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Anti-Kaninchen, MP konjugiert	Ziege	1:10.000	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.
Anti-Maus, MP konjugiert	Ziege	1:25.000	Thermo Scientific

2.10.3 Spaltung von Disulfidbrücken mit Dithithreitol (DTT)

Zur Spaltung von Disulfidbrücken zwischen zwei Proteinen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*-Zellen wurden Zellpellets in 300 µl DTT-haltigem Puffer (25 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 100 µM DTT; pro 10 ml 1 Proteinaseinhibitortablette („cOmplete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets“, Roche)) aufgenommen und für 2 h bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch

Zentrifugation (5 min, 3.500 Upm) sedimentiert und die Proteine im Überstand durch Fällung aufkonzentriert. Zur weiteren Analyse der Proteine mittels Western Blot wurden diese in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl (pH 6,8); 4 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) BPB; 20 % (v/v) Glycerin) aufgenommen, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und wie unter 2.10.3.2 beschrieben verfahren.

2.10.4 Fällung von Proteinen aus Lösungen

Zur Fällung von Proteinen aus Lösungen wurden diesen 1/10 Vol Trichloressigsäure (TCA) zugegeben und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 300 µl Aceton versetzt, durch Invertieren gemischt und die Proteine durch Zentrifugation (5 min, 13.000 Upm) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet für einige Minuten an der Luft getrocknet und in entsprechendem Puffer aufgenommen.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Immunfluoreszenzmarkierung von Sphäroplasten

2.11.1.1 Fixieren von Zellen

Zur Fixierung von Zellen wurden diese in entsprechendem Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und mit 4 % Formaldehyd für 30-90 min bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden 5 ml der Kultur durch Zentrifugation geerntet und einmal in S-Puffer (50 mM HEPES; 1,2 M Sorbitol; pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml S-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.11.1.2 Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten

Zur Herstellung der Präparate wurde zunächst die Zellwand der fixierten Hefezellen durch Behandlung mit Zymolyase-100T (100 µg/ml), 30 µl β-Glucoronidase und 10 mM DTT abgedaut. Dieser Schritt erfolgte für 45 min bei 30 °C, woraufhin die entstandenen Sphäroplasten durch Zentrifugation sedimentiert (1 min, 5 000 Upm) und das Pellet vorsichtig in 1 ml S-Puffer mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 aufgenommen wurden. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT auf dem Kippschüttler wurden die Zellen erneut zentrifugiert (2 min, 5.000 Upm) und in 200 µl S-Puffer aufgenommen.
Zur Mikroskopie der Präparate wurden 10-Loch-Objektträger benutzt, die vor der Verwendung mit Poly-Lysin-Lösung (0,1 % (w/v)) behandelt wurden. Dazu wurden je 15 µl der Lösung in jede Vertiefung des Objektträgers gegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen, die Oberflächen trocknen gelassen und durch Auftropfen von ddH_2O gewaschen. Es wurden drei Waschschritte durchgeführt, bevor 20 µl Zellsuspension aufgetragen und für 5 min in den Vertiefungen belassen wurden. Als nächstes folgten vier Waschschritte mit PBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4 (pH 7,4)) und eine fünfzehnminütige Blockierung unspezifischer Bindestellen durch Auftropfen von 2 % (w/v) Milchpulver in PBS. Zur Fluoreszenz-basierten Markierung FbFP-assoziierter Proteine wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Anti-EcFbFP (1:2.000) behandelt, indem Antikörper und Blockierungslösung in einem Endvolumen von 40 µl auf die Zellen gegeben und für 90 min bei RT bzw. 4 °C ÜN in feuchter Umgebung inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend erneut mit PBS gewaschen (4x) und mit dem sekundären FITC-markierten Antikörper (Anti-Kaninchen (1:160), Sigma-Aldrich) in 0,2 % (w/v) Milchpulver in PBS (Endvolumen 40 µl) für 90 min bei RT in dunkler, feuchter Umgebung inkubiert. Nach erneutem

mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Sphäroplasten einer Zellkernfärbung durch zehnminütige Inkubation mit 20 µl DAPI (1 µg/ml in PBS) bei RT unterzogen.
Zur Mikroskopie der Präparate wurde ein Tropfen „ProLong® Gold antifade reagent“ (Invitrogen) in jede Vertiefung gegeben, die Objektträger mit einem Deckglas verschlossen und im Dunkeln gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Präparate 24 h im Dunkeln trocknen gelassen und die Deckgläser anschließend mit Nagellack abgedichtet.

2.11.2 Immunfluoreszenzmarkierung von Hefezellen

Zur Markierung spezifischer Proteine auf der Zelloberfläche wurden FITC-Markierungen ganzer Hefezellen durchgeführt. Dazu wurden Zellen der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (3.500 Upm, 5 min) sedimentiert, mit 1 ml PBS gewaschen und für 15-30 min in 1 ml 2 % (w/v) Magermilchpulver in PBS auf dem Kippschüttler inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschritt mit PBS, woraufhin die Zellen in 500 µl PBS mit 1 mg/ml BSA sowie dem Erstantikörper Anti-EcFbFP (1:2.000) aufgenommen und für 1 h (Kippschüttler, RT) inkubiert wurden. Als Nächstes wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit dem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-Kaninchen (1:160); 500 µl PBS mit 1 mg/ml BSA) im Dunkeln (Kippschüttler, RT) inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen, in 40 µl PBS aufgenommen und je 5 µl zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

2.11.3 Färbung von Hefezellkernen mit 4‘-6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Die Anfärbung von Zellkernen in Hefe erfolgte durch Zugabe von 1 µl DAPI (1 µg/ml) zu 5 µl zu untersuchender Zell- bzw. Sphäroplastensuspension und zehnminütiger Inkubation im Dunkeln. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie.

2.12 Detektion von Fluoreszenz

2.12.1 Detektion von Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop

Bei der Detektion von Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden entweder Kolonien auf Agar-Platten oder einzelne Zellen auf einem Objektträger mit Hilfe des Axioskops 40 FL der Firma Zeiss (Oberkochen) beobachtet und fotografiert. Bei der Untersuchung von Einzelzellen wurde das Ausbleichen der Präparate durch Zugabe von etwa 3 µl „Anti-Fade“ Reagenz (ProLong® Gold antifade reagent, Invitrogen) auf den Objektträger vermindert. Die Anregung der Zellen erfolgte durch eine HBO100 Quecksilberdampflampe in Kombination mit den Filtersätzen FS38HE (GFP, FbFP), FS02 (DAPI), FS09 (FITC) bzw. FS46 (YFP) (Zeiss).
In einigen Fällen wurde auch das Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager.M1“ (Zeiss) verwendet (HBO103 Quecksilberdampflampe, Filtersätze: GFP: FS38HE; DAPI: FS49 (Zeiss)).

2.12.2 Detektion von Fluoreszenz mit dem Spinning-Disc-Konfokalmikroskop

Bei schnell ausbleichenden Präparaten wurde die Fluoreszenzanalyse mit einem Spinning-Disc-Konfokalmikroskop (Cell Observer SD, Zeiss) durchgeführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde bei Anregung mit einem Argon Laser bei 488 nm (CaFbFP) bzw. 353 nm (DAPI) analysiert, wobei die Emission bei 509 nm bzw. 465 nm registriert wurde.

2.12.3 Vergleichende Fluoreszenzanalyse von Zellausstrichen einer Agarplatte

Um die Fluoreszenz verschiedener Stämme auf einer Agarplatte zu vergleichen, wurde das ImageQuant LAS4000 der Firma GE Healthcare Life Sciences (Solingen) verwendet. Dabei wurden die Zellen mit blauem Licht (460 nm) per Leuchtdioden angeregt und die Fluoreszenz der Zellen fotografisch dokumentiert (Filter Y515Di).

2.12.4 Quantitative Analyse der Fluoreszenz von Rohextrakten und lebenden Hefezellen mittels Fluorometer

Zur Untersuchung der Fluoreszenz in Proteinrohextrakten von *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurden die Zellen unter entsprechenden Bedingungen angezogen, aufgeschlossen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test (s. 2.10.2) bestimmt. Die Rohextrakte wurden dann jeweils durch Verdünnung mit dem Aufschlusspuffer (Puffer E) auf eine Konzentration von 400 µg eingestellt, wobei das Endvolumen bei 200 µl lag.

Alternativ zur Untersuchung von Proteinrohextrakten wurden quantitative Fluoreszenz-analysen lebender Hefezellen durchgeführt. Dazu wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und vor der Messung mit dem entsprechenden Medium auf eine optische Dichte von 0,2 verdünnt.

In beiden Fällen erfolgte die Detektion der Fluoreszenz in schwarzen 96-Loch-Platten mit Hilfe des Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) Fluorometers, unter Verwendung von Filtern mit einer Anregung von 450 nm und einer Emission von 495 nm. In einigen Fällen, insbesondere der Aufnahme von Emissionsspektren, wurde das Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Schweiz) verwendet, bei dem die Wellenlängen durch jeweils zwei Anregungs- und Emissions-Monochromatoren erzeugt wurden.

Um bei der Aufnahme von Emissionsspektren ganzer Zellen einen Einfluss von Riboflavin im Medium zu vermeiden, wurden vor der Messung etwa 1 ml Kultur mit PBS (140 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4 (pH 7,4)) gewaschen (15 s, Tischzentrifuge) und das Zellpellet anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Auch zur Verdünnung der Proben wurde in diesem Fall PBS anstelle des Mediums verwendet.

Bei der Messung ganzer Zellen mit vorherigem Wachstum unter hypoxischen Bedingungen wurden alle Schritte im Hypoxie-Inkubator durchgeführt und die Mikrotiterplatte für den kurzen Transport zum Messgerät in eine luftdicht abgeschlossene Kiste gelegt, bevor die Messung unverzüglich gestartet wurde.

3 Ergebnisse

Die Flavinmononukleotid-abhängigen Fluoreszenzproteine (FbFP) sind im Gegensatz zu GFP und dessen Varianten sauerstoffunabhängig und in der Lage, sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen und anoxischen Bedingungen zu fluoreszieren (Drepper *et al.*, 2007; Tielker *et al*., 2009). In vorangegangenen Studien wurde mit der Etablierung des prokaryotischen EcFbFP für den Gebrauch in Hefe begonnen (Eichhof, 2008, Tielker *et al*., 2009). Die Sequenz von *EcFbFP* wurde dazu für die Expression in Hefe optimiert und an den Kodongebrauch der fakultativ humanpathogenen Hefe *C. albicans* angepasst. Die Synthese und Fluoreszenz von CaFbFP konnten bereits in dem Hefe-Modellorganismus *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, und auch in *C. albicans* konnte eine schwache Fluoreszenz in Zellen mit Ca*FbFP*-Gen unter der Kontrolle des *ACT1*-Promotors durch Fluorometer-Analysen gezeigt werden. Die Fluoreszenzintensität konnte hier außerdem durch die Konstruktion einer Tandem-Fusion von zwei Ca*FbFP*-Leserastern erhöht werden, so dass auch ein Nachweis von Fluoreszenz in Kolonien mittels Fluoreszenzmikroskopie erbracht werden konnte. Aufgrund der relativ schwachen Fluoreszenz des Proteins in *C. albicans* war bisher noch kein Nachweis in Einzelzellen möglich.

In dieser Arbeit sollte die Etablierung von CaFbFP als Reporterprotein für Hefe durch Untersuchung und Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften weitergeführt werden. Außerdem sollte die Anwendbarkeit des Reporters in verschiedenen Zellkompartimenten von *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Zellen überprüft werden. Dabei wurden Analysen der Lokalisation von CaFbFP im Cytoplasma, der Zelloberfläche sowie dem Zellkern von *S. cerevisiae* bzw. *C. albicans* durchgeführt. Auf diese grundsätzlichen Untersuchungen sollte die Anwendung von CaFbFP als Biosensor in den beiden Hefeorganismen etabliert werden.

3.1 Lokalisation von CaFbFP im Cytoplasma von *S. cerevisiae*

In *C. albicans* konnte die Fluoreszenzintensität durch Fusion mehrerer Ca*FbFP*-Leseraster erhöht werden, so dass die Möglichkeit, die Fluoreszenz auf diese Weise zu optimieren, auch für *S. cerevisiae* überprüft werden sollte. Tielker *et al*. (2009) zeigten, dass Rohextrakte des *S. cerevisiae*-Stamms THY.AP4 mit 2xCa*FbFP*-Gen unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors aus *C. albicans* (THY.AP4[pIE1-2]) vergleichbare Fluoreszenzintensitäten wie solche mit einzelnem Ca*FbFP*-Gen aufwiesen. In dieser Arbeit sollte die Expression eines einzelnen und doppelten Ca*FbFP*-Gens sowie einer Fusion aus drei Ca*FbFP*-Leserastern unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors aus *S. cerevisiae* getestet werden.

3.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation verschiedener CaFbFP-Varianten im Cytoplasma

Zur Analyse der Synthese und Fluoreszenz verschiedener CaFbFP-Varianten wurden Expressionsvektoren mit doppeltem und dreifachem Ca*FbFP*-Gen unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors konstruiert (s. 2.5.1). Das *GAL1*-Gen kodiert für das Enzym

Galaktokinase, welches bei der Umwandlung von Galaktose in Glukose während des Galaktosemetabolismus D-Galaktose durch Phosphorylierung in Galaktose-1-Phosphat umwandelt. Daher wird der *GAL1*-Promotor durch Anwesenheit von Galaktose induziert und durch Glukose reprimiert (Giniger *et al*., 1985; West *et al*., 1984).
Die entwickelten Plasmide trugen neben *GAL1p*-2xCa*FbFP* bzw. *GAL1p*-3xCa*FbFP* den Replikationsursprung (ori=„origin of replication“) des 2-micron-Plasmids aus *S. cerevisiae* zur autonomen Replikation, die Terminatorsequenz von *CYC1* sowie ein Ampicillin-Resistenzgen und das *URA3*-Markergen zur Selektion in *E. coli* bzw. Hefe (Abb. 3.1).

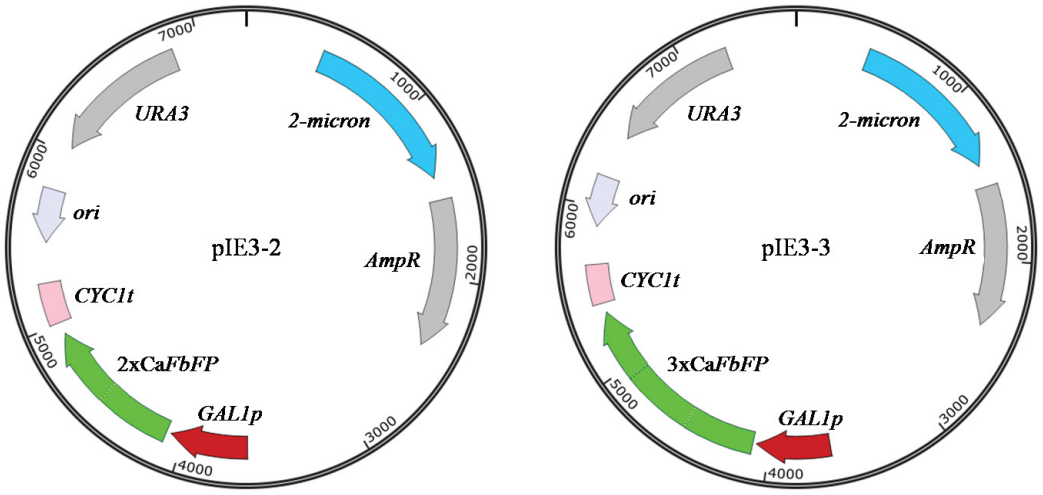


Abb. 3.1: Expressionsplasmide zur cytoplasmatischen Lokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Die Plasmide pIE3-2 und pIE3-3 enthalten eine Fusion aus dem induzierbaren *GAL1*-Promotor und 2xCa*FbFP* bzw. 3xCa*FbFP* sowie den Replikationsursprung des 2-micron-Plasmids (*ori*) zur autonomen Replikation in Hefe, das Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* sowie das *URA3*-Markergen zur Selektion in Hefe. Die Plasmide wurden wie unter 2.5.1 beschrieben konstruiert.

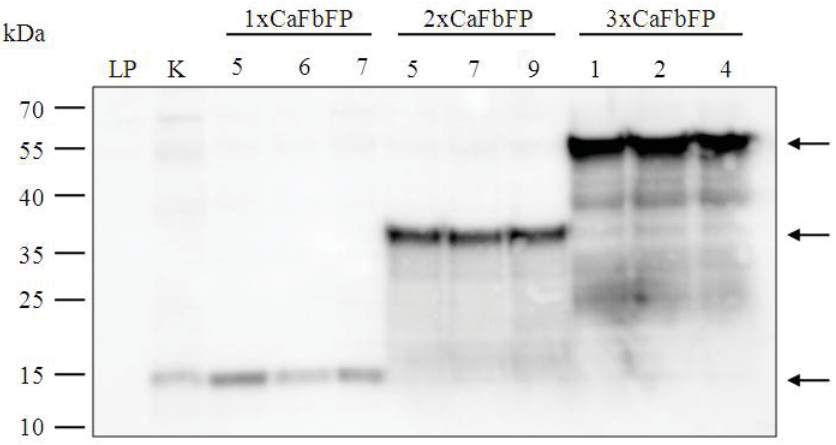
Zur Herstellung von *S. cerevisiae*-Zellen mit cytoplasmatisch lokalisiertem CaFbFP, wurde der Uracil-auxotrophe *S. cerevisiae* Stamm THY.AP4 jeweils mit den Plasmiden pIE3-2 und pIE3-3 transformiert und Transformanden mit erhaltenem Plasmid durch Wachstum auf Selektionsmedium (SD-Ura$^-$) und Test auf Fluoreszenz der Kolonien identifiziert. Auf gleiche Weise wurden Kontrollstämme durch Transformation von CAI4 mit den Plasmiden p426GAL1 (*GAL1p*) bzw. pIE3 (*GAL1p*-Ca*FbFP*) hergestellt.

3.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaFbFP-Varianten in *S. cerevisiae*

Um Synthese und Proteinmengen der verschiedenen CaFbFP-Varianten zu untersuchen, wurde FbFP in Rohextrakten mittels Immunoblot nachgewiesen. Dazu wurden je 20 ml Glukose-freies Medium mit Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquellen (SGR Ura$^-$) mit Übernachtkulturen (SD Ura$^-$-Medium) der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Leerplasmid), pIE3 (CaFbFP), pIE3-2 (2xCaFbFP) und pIE3-3 (3xCaFbFP) inokuliert und die Zellen bis zum exponentiellen Wachstum bei 30 °C

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und je 100 µg der Rohextrakte in einer SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Immunoblot (1. AK: Anti-EcFbFP, 2. AK: Anti-Kaninchen) zum Nachweis CaFbFP-assoziierter Proteine durchgeführt (Abb. 3.2 A). Als Positivkontrolle diente dabei Rohextrakt mit einzelnem

A



B

	1xCaFbFP	2xCaFbFP	3xCaFbFP
Mittelwert	2,02 ± 0,70	5,77 ± 0,13	11,01 ± 0,47
Verhältnis	1,00 ± 0,35	2,86 ± 0,06	5,46 ± 0,23

Abb. 3.2: Immunoblot zum Vergleich der Proteinmenge verschiedener CaFbFP-Varianten in *S. cerevisiae*. A: Rohextrakte (100 µg) von *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämmen mit Leerplasmid (LP; p426GAL1), ein- (pIE3), zwei- (pIE3-2) oder dreifachen (pIE3-3) CaFbFP-Fusionen wurden mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Immunoblot durchgeführt (1. AK: Anti-EcFbFP; 2. AK: Anti-Kaninchen). K: Positivkontrolle (getesteter Rohextrakt mit 1xCaFbFP). Pfeile kennzeichnen die Banden der CaFbFP-Varianten, Zahlen bezeichnen die Replikatnummer (Vgl. Abb. 3.3). B: relative Intensitäten der Chemilumineszenzsignale im Immunoblot.

CaFbFP (THY.AP4[pIE3]), welcher bereits in vorherigen Blots verwendet wurde.
Wie erwartet, war in der Spur der Leerplasmidkontrolle (LP) keine Bande zu verzeichnen, in der Spur der Positivkontrolle (K) konnte hingegen die Bande des einzelnen CaFbFP-Proteins (15,7 kDa) auf einer Höhe von etwa 16 kDa verzeichnet werden. Auf gleicher Höhe war ebenfalls in den Spuren der drei Proben mit 1xCaFbFP eine Bande zu erkennen. Die theoretischen molekularen Massen von 2xCaFbFP und 3xCaFbFP liegen bei 31,4 bzw. 47,1 kDa. Die Banden in den Spuren der entsprechenden Proben liefen jeweils etwas höher als erwartet (etwa 36 bzw. 55 kDa), repräsentieren jedoch die beiden Varianten des Fluoreszenzproteins. Vergleicht man die Intensitäten der Banden im Western Blot, so nahmen diese mit der Anzahl der CaFbFP-Proteine in der Fusion zu. Da es bei den Fusionsproteinen entsprechend der Anzahl an CaFbFP-Proteinen auch zu einer

Mehrfachbindung des Erstantikörpers kommen kann, wurden die Bandenintensitäten durch Quantifizierung mit dem Programm MultiGauge 3.0 (FUJIFILM) genauer untersucht. Bei dem Vergleich der Mittelwerte der Bandenintensitäten aus jeweils drei Klonen zeigte sich ein Verhältnis der Bandenintensitäten von 1x zu 2x zu 3xCaFbFP von etwa 1: 2,86: 5,46. Daher ist anzunehmen, dass die Proteinmengen der unterschiedlichen Varianten in etwa gleich hoch waren und die erhöhten Signalstärken der Banden von doppeltem und dreifachem CaFbFP durch die Anzahl der Antikörper-Bindestellen bedingt wurden.

3.1.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse von CaFbFP-Varianten in *S. cerevisiae*

Um die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen CaFbFP-Fusionen in *S. cerevisiae* vergleichen zu können, wurden quantitative Fluoreszenzanalysen der Rohextrakte von Stämmen mit einzelnem, doppeltem und dreifachem Ca*FbFP*-Gen durchgeführt.

In *S. cerevisiae* ist die Variabilität der Kopienzahl bei Multikopie-Plasmiden hoch (Schneider & Guarente, 1991), so dass zur vergleichenden Untersuchung der Fluoreszenz in *S. cerevisiae* je neun bzw. zwei (Kontrollstamm) Transformanden pro Konstrukt analysiert wurden. Dazu wurden die Zellen entsprechender Stämme wie unter 3.1.2 beschrieben angezogen und Rohextrakte der Zellen hergestellt. Je 400 µg der Extrakte wurden in Dreifachbestimmung mit Hilfe des Fluorometers (Fluoroskan Ascent FL) auf ihre Fluoreszenz untersucht, wobei die Anregungs- bzw Emisionsmaxima von CaFbFP (450 nm bzw. 495 nm, Tielker *et al*., 2009) verwendet wurden (Abb. 3.3).

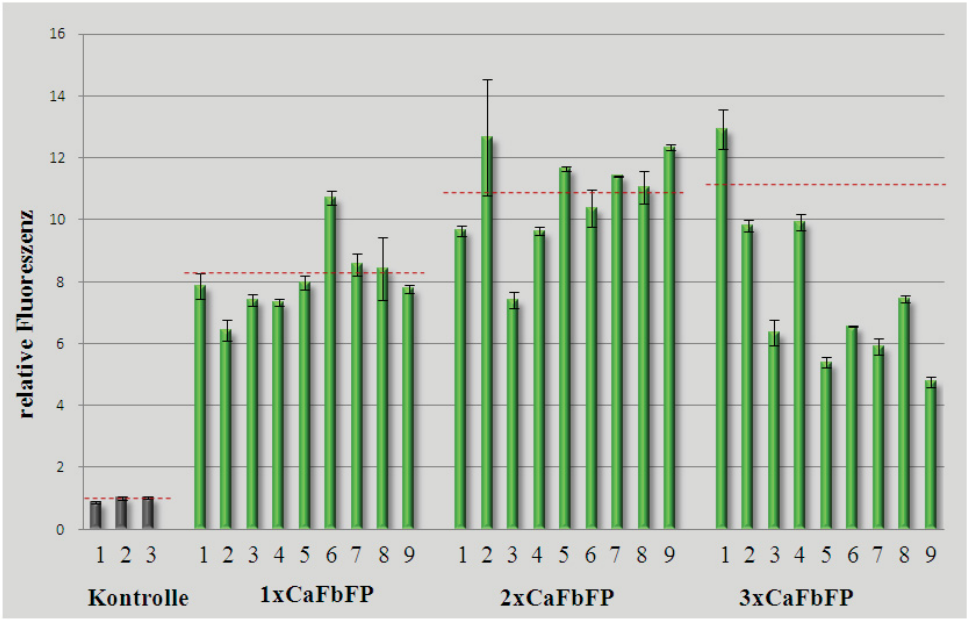


Abb. 3.3: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten verschiedener CaFbFP-Fusionen in *S. cerevisiae*. Relative Fluoreszenz von Rohextrakten (400 µg) von je 3 Transformanden des Stamms THY.AP4 [p426GAL1] (Kontrolle) sowie von je 9 Transformanden von THY.AP4[pIE3] (1xCaFbFP), THY.AP4[pIE3-2] (2xCaFbFP) bzw. THY.AP4[pIE3-3] (3xCaFbFP). Die Proben wurden mittels Fluorometer (Fluoroskan Ascent FL) in Dreifachbestimmung (technische Replikate mit Standardabweichung) gemessen. Zahlen der X-Achse entsprechen unterschiedlichen biologischen Replikaten. Rot gestrichelte Linien kennzeichnen Durchschnittswerte.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Fluoreszenz der Rohextrakte von Transformanden mit einzelnem Ca*FbFP* im Vergleich mit den Rohextrakten von Leerplasmid-tragenden Klonen. Die Proben der Stämme mit doppeltem Ca*FbFP* hatten im Durchschnitt mit 10,68 Fluoreszenzeinheiten (FE) eine etwas höhere Intensität als die der Transformanden mit einzelnem Ca*FbFP* (8,04 FE). Außerdem war zu erkennen, dass einzelne Transformanden mit 1xCa*FbFP* (Proben 6 und 7) ein stärkeres Signal aufweisen als solche mit 2xCa*FbFP* (Proben 3, 4 und 6). Die durchschnittliche relative Fluoreszenz der Rohextrakte von Transformanden mit 3xCa*FbFP* (10,88 FE) lag etwa auf derselben Höhe wie die der Klone mit 2xCa*FbFP*, wobei die Werte der Proben mit Dreifachfusion sehr heterogen waren. So wies die Mehrzahl der getesteten Rohextrakte mit 3xCaFbFP eine deutlich schwächere Fluoreszenz als Stämme mit doppeltem oder einzelnem CaFbFP auf. Somit scheint keine weitere Steigerung der Fluoreszenz durch Anhängen eines dritten Fluoreszenzproteins möglich zu sein.
Die gleichen Verhältnisse zwischen den Fluoreszenzintensitäten von *S. cerevisiae*-Stämmen mit ein-, zwei- und dreifachem CaFbFP konnten auch in ganzen Zellen vor dem Zellaufschluss beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Effekt der Kofaktor-Zugabe auf die CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz

Für die Fluoreszenz von FbFPs ist die Bindung des Kofaktors Flavinmononukleotid (FMN) essentiell. Dabei kann nicht nur FMN, sondern auch die Synthesevorstufe Riboflavin sowie Flavinadenindinukleotid (FAD) gebunden werden und die Fluoreszenz des Proteins bewirken (Dorn *et al*., 2013). Gängige Minimalmedien zur Anzucht von Hefezellen enthalten bereits Riboflavin, wobei die Zellen auch in der Lage sind, das Vitamin selbst herzustellen.
Um zu überprüfen, ob die Fluoreszenz Ca*FbFP*-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen durch zusätzliche Zugabe von Riboflavin in das Wachstumsmedium gesteigert werden kann, wurde Riboflavin-freies Medium verwendet und diesem definierte Mengen des Vitamins zugesetzt. Es wurden Übernachtkulturen (SD Ura$^-$-Medium) von *S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3] (CaFbFP) sowie THY.AP4[p426GAL1] (Leervektor) in SGR Ura$^-$-Medium ohne Riboflavin gewaschen und die Zellen nach Fraktionierung in SGR Ura$^-$-Medium mit unterschiedlichen Riboflavinkonzentrationen (0, 200, 400 und 1.000 µg Riboflavin/l) aufgenommen. Diese wurden anschließend zum Beimpfen von je 5 ml SGR Ura$^-$-Medium mit entsprechender Riboflavinkonzentration verwendet und bei 30 °C im Dunkeln bis zur exponentiellen Phase wachsen gelassen. Um einen Einfluss von Riboflavin auf die Fluoreszenzmessung zu vermeiden, wurden die Zellen anschließend in PBS gewaschen. Die Fluoreszenz der Zellen wurde mit Hilfe des Fluorometers bei einer Anregungswellenlänge (λ_{Anr}) von 450 nm und einer Emission (λ_{Em}) von 495 nm detektiert. In Abbildung 3.4 sind relative Fluoreszenzeinheiten dargestellt, wobei die Werte der Leerplasmidkontrolle von denen der Transformanden von THY.AP4[pIE3] (Ca*FbFP*) subtrahiert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Zellen beider Transformanden auch in Abwesenheit von Riboflavin im Wachstumsmedium CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz aufweisen. Im Vergleich dazu kann bei Anwesenheit von 200 µg/l Riboflavin eine leichte Steigerung der Fluoreszenzintensität um etwa ein 1,4-faches, von 4,1 (Replikat 5) bzw. 3,3 (Replikat 7) auf 5,9 bzw. 4,8 FE, verzeichnet werden. Nach Anzucht der Zellen in Medium

mit 400 µg Riboflavin ist keine weitere Steigerung zu erkennen und bei einer Riboflavinkonzentration von 1.000 µg/l zeigt sich für beide Transformanden eine leicht erhöhte Fluoreszenz im Vergleich mit den Zellen nach Wachstum in Medium mit 200 µg/l Riboflavin.
Somit zeigte sich, dass die Anwesenheit von Riboflavin im Wachstumsmedium nicht essentiell für die Fluoreszenz von Zellen mit cytoplasmatisch lokalisiertem CaFbFP ist und eine Steigerung der Riboflavinkonzentration nur einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität bewirkt.

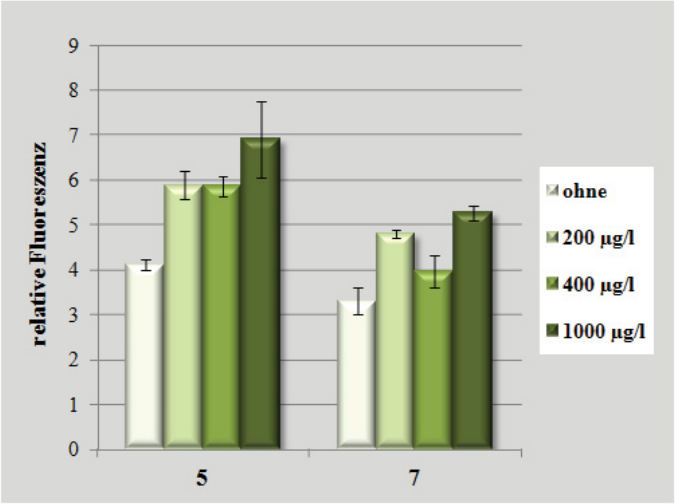


Abb. 3.4: Relative Fluoreszenz Ca*FbFP*-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen nach Wachstum bei verschiedenen Riboflavinkonzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate) der relativen Fluoreszenz von *S. cerevisiae* THY.AP4-Zellen nach Wachstum in SGR Ura$^-$-Medium ohne bzw. mit 200, 400 oder 1.000 µg/l Riboflavin. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mittels Fluorometer (λ_{Anr} = 450 nm, λ_{Em} = 495 nm). Von den Werten wurden die jeweiligen Emissionen des Kontrollstamms subtrahiert. Nummerierung der biologischen Replikate wie Abb. 3.3.

3.1.5 pH-Stabilität von CaFbFP

Der pH-Wert variiert in Hefezellen je nach Umgebungsbedingungen und Wachstumsphase und kann im Cytoplasma der Zellen im sauren bis leicht basischen Bereich liegen (Kotyk, 1963; Orij *et al*., 2012). Dies hat einen Einfluss auf zahlreiche Prozesse innerhalb der Zelle wie den Stoffwechsel, Proteininteraktionen, die Signalweiterleitung sowie Veränderungen von Redoxzuständen (Vojinovic & Stockar, 2009; Whitten *et al*., 2005; Kooijman *et al*., 2007; Dechant *et al*., 2010; Veine *et al*., 1998). So ist auch die Nachweisbarkeit von Fluoreszenzreportern wie GFP und einigen Farbvarianten pH-abhängig (Wachter *et al*., 1998; Awaji *et al*., 2001). Die Fluoreszenzeigenschaften von CaFbFP bei unterschiedlichen pH-Werten sind dagegen bisher noch nicht untersucht worden und wurden im Rahmen dieser Arbeit überprüft. Zum Vergleich wurden eine YFP-Variante (CaYFP) sowie das FRET-Fusionsprotein CaYFP-CaFbFP (YFOS= „Yeast Fluorescent Oxygen Sensor“) (s. 3.4.1.1) analysiert.

Es wurden zunächst Citronensäure-Phosphatpuffer nach McIlvaine (1921) mit pH-Werten von 3,5, 4,5, 5,5, 6,0, 7,0 7,5 und 8,8 durch definierte Mischungsverhältnisse von 0,1 M Citronensäure- und 0,2 M Phosphatlösung hergestellt. Anschließend wurden je 400 µg Rohextrakt der *S. cerevisiae* Stämme THY.AP4[p426GAL1] (Leerplasmid), THY.AP4 [pIE3] (Ca*FbFP*), THY.AP4[pOXY1] (Ca*YFP*) und THY.AP4[pOXY2] (Ca*YFP*-Ca*FbFP*) in Dreifachbestimmung mit entsprechendem Puffer auf 200 µl aufgefüllt, für etwa 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenz der Proben bei spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen (CaFbFP: λ_{Anr}= 450 nm, λ_{Em}= 495 nm; CaYFP: λ_{Anr}= 500 nm, λ_{Em}= 530 nm; CaYFP-CaFbFP: λ_{Anr}= 380 nm, λ_{Em}= 530 nm) im Fluorometer (Tecan infinite M200) gemessen. In Abbildung 3.5 sind die Fluoreszenzraten der Rohextrakte in Abhängigkeit des pH-Werts graphisch dargestellt, wobei die Werte jeweiliger Anregungs- und Emissionswellenlängen der Leervektor-Proben (CaFbFP, CaYFP) bzw. von CaFbFP (CaYFP-CaFbFP) subtrahiert wurden.

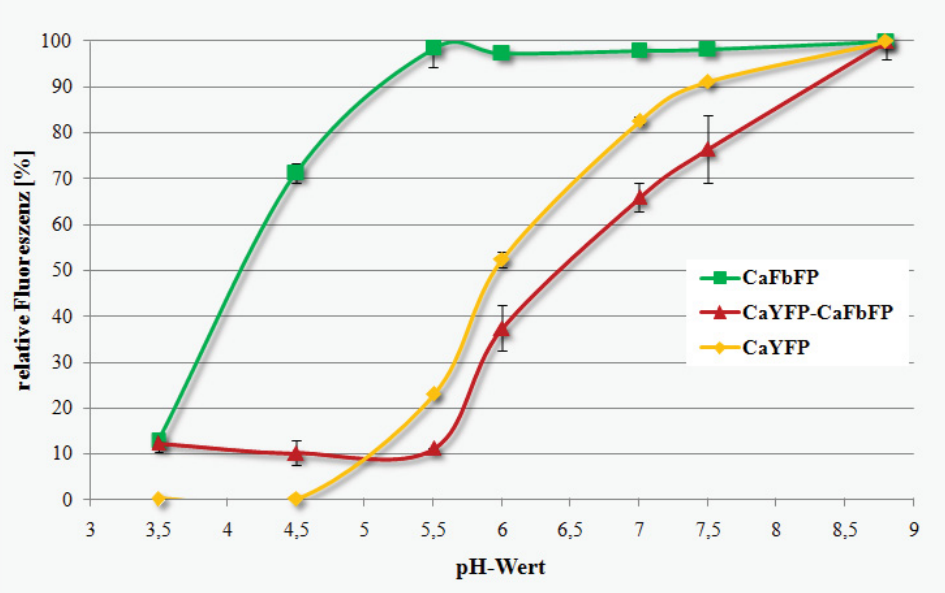


Abb. 3.5: pH-Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz von Rohextrakten CaFbFP-, CaYFP- bzw. CaYFP-CaFbFP-bildender *S. cerevisiae*-Stämme. Rate der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit des pH-Wertes. Rohextrakte (400 µg) der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Leerplasmid), pIE3 (CaFbFP), pOXY1 (CaYFP) und pOXY2 (CaYFP-CaFbFP (YFOS)) wurden in Puffern mit pH-Werten von 3,5-8,8 inkubiert (15 min) und die Fluoreszenz mittels Fluorometer in Dreifachbestimmung (technische Replikate mit Standardabweichung) gemessen (Kontrolle und CaFbFP: λ_{Anr}= 450 nm, λ_{Em}= 495 nm bzw. Kontrolle und CaYFP: λ_{Anr}= 500 nm, λ_{Em}= 530 nm bzw. Kontrolle und CaYFP-CaFbFP: λ_{Anr}= 380 nm, λ_{Em}= 530 nm). Werte abzüglich Negativkontrolle (CaFbFP, CaYFP) bzw. CaFbFP (CaYFP-CaFbFP).

Die Kurve von CaYFP zeigt sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten bei den gemessenen pH-Werten. So konnte im Bereich zwischen pH 3,5 bis 5 keine Emission nachgewiesen werden. Mit zunehmendem pH-Wert steigt die Kurve der relativen Fluoreszenz jedoch steil an. Bei einem pH von 5,5 lag die Fluoreszenzrate lediglich bei

23 %, wohingegen bei pH 7,5 91 % der maximalen Fluoreszenzintensität in dieser Messung erreicht wurden. Im Gegensatz dazu war die Fluoreszenz CaFbFP-haltiger Rohextrakte in einem pH-Bereich von 5,5 bis 8,8 konstant und lag kontinuierlich zwischen 97 und 100 %. Bei pH 3,5 konnte auch für CaFbFP nur noch ein schwaches Signal (13 %) detektiert werden. Bei Betrachtung der Analysen des Rohextrakts mit CaYFP-CaFbFP (YFOS) zeigt die Kurve im Bereich zwischen pH 5,5 und 8,8 einen ähnlichen Verlauf wie bei Rohextrakt mit CaYFP. So steigt diese von 11 % Fluoreszenz bei pH 5,5, über 66 % bei pH 7, bis zu der maximalen gemessenen Intensität bei pH 8,8 an. Im Gegensatz zu ungebundenem CaYFP konnte auch im sauren pH-Bereich (pH 3,5) noch ein schwaches Fluoreszenzsignal (12 %) detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass CaFbFP im Gegensatz zu CaYFP bereits in saurem Milieu nachweisbar ist und die Fluoreszenz des Proteins im pH-Bereich von 5,5 bis 8,8 konstant ist.

3.2 Lokalisation von CaFbFP im Cytoplasma von *C. albicans*

Um die CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz auch für einzelne Zellen von *C. albicans* nachzuweisen, sollten in dieser Arbeit die Expressionsraten von Ca*FbFP* und 2xCa*FbFP* durch Verwendung des unter den gewählten Bedingungen stark exprimierten Promotors des *TDH3*-Gens aus *C. albicans* erhöht werden. *TDH3* kodiert für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gil-Navarro *et al*., 1997), welches die Umwandlung von Glycerin-aldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat bei der Glykolyse katalysiert, bei der es außerdem zur Reduktion von NAD^+ zu NADH kommt. Der *TDH3*-Promoter wird durch Anwesenheit von Glucose induziert (Kuroda *et al*., 1994).

3.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation verschiedener CaFbFP-Varianten im Cytoplasma

Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften verschiedener CaFbFP-Varianten im Cytoplasma von *C. albicans*-Zellen wurden Vektoren zur Expression von CaFbFP (pIE5-1) sowie einer Tandem- (pIE5-2) und einer Dreifach-Fusion (pIE5-3) unter Kontrolle des *TDH3*-Promotors wie unter 2.5.1 beschrieben hergestellt. Außerdem wurde ein Leervektor mit *TDH3p* (pIE5) konstruiert. Alle Plasmide enthalten zusätzlich eine *C. albicans*-spezifische Sequenz zur autonomen Replikation (Ca*ARS*) in Hefe sowie das Ampicillin-Resistenzgen und die Markergene *URA3* und *LEU2*. Der Vektor pIE5-2 trägt zudem die *ACT1*-Terminatorsequenz stromabwärts des 2xCa*FbFP*-Gens. In Abbildung 3.6 sind die Vektoren pIE5, pIE5-1 und pIE5-2 schematisch dargestellt. Der Vektor pIE5-3 weist dieselben Eigenschaften wie pIE5-1 auf, wobei pIE5-3 das dreifache Ca*FbFP*-Gen anstelle der einzelnen Variante trägt.

Für die Herstellung der Stämme zur cytoplasmatischen Lokalisation von CaFbFP wurde der Uridin-auxotrophe *C. albicans*-Stamm CAI4 jeweils mit den Plasmiden transformiert und Transformanden mit Plasmid-kodiertem *URA3*-Gen durch Wachstum auf Aminosäure-freiem SD-Agar selektioniert.

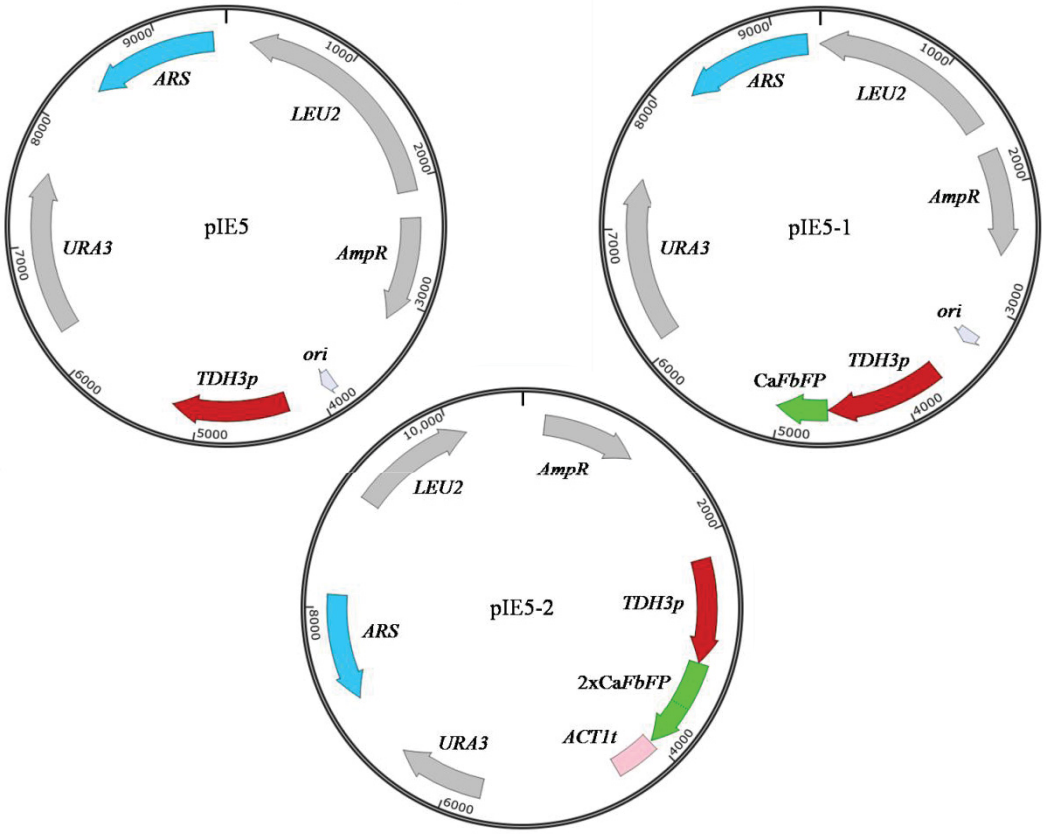


Abb. 3.6: Expressionsplasmide zur cytoplasmatischen Lokalisation von CaFbFP in *C. albicans*. pIE5: Leerplasmid mit *TDH3p*, pIE5-1: zur Expression von *TDH3p*-Ca*FbFP*, pIE5-2: zur Expression von *TDH3p*-2xCa*FbFP*. Der Vektor pIE5-3 entspricht pIE5 mit 3xCa*FbFP* stromabwärts von *TDH3p*. Die Plasmide wurden wie unter 2.5.1 beschrieben konstruiert.

3.2.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaFbFP-Varianten in *C. albicans*

Im Folgenden wurde die Proteinsynthese von einzelnem, doppeltem und dreifachem CaFbFP untersucht. Dazu wurden Transformanden von *C. albicans* CAI4 mit den Plasmiden pIE5, pIE5-1, pIE5-2 und pIE5-3 zur Induktion des *TDH3*-Promotors in Glukose-haltigem SD-Medium bei 30 °C bis zum exponentiellen Wachstum angezogen und Rohextrakte der Zellen hergestellt. Anschließend wurden die Proteine entsprechend den Analysen in *S. cerevisiae* (s. 3.1.2) durch SDS-PAGE aufgetrennt und CaFbFP-assoziierte Proteine durch immunologischen Nachweis (Anti-EcFbFP) untersucht (Abb. 3.7).

Die Membran zeigte wie erwartet kein Signal in der Spur der Negativkontrolle (CAI4[pIE5]), wohingegen ein deutliches Signal in den Spuren mit doppeltem CaFbFP (CAI4[pIE5-2]) auf einer Höhe von etwa 36 kDa detektiert wurde. Die theoretische molekulare Masse der CaFbFP-Tandemfusion beträgt 31,4 kDa, so dass die Banden dieser Fusion zuzuordnen sind. Bei den Proben des Stamms mit dreifachem CaFbFP wurden Banden auf einer Höhe von 47,1 kDa erwartet. Hier waren Signale bei einer molekularen

Masse von etwa 53 kDa zu verzeichnen, so dass auch hier die Synthese der Fusion gezeigt werden konnte. Die Signalstärken waren dabei etwas geringer als die bei Rohextrakten mit doppeltem CaFbFP (Abb. 3.7 A). In den Spuren der Rohextrakte des Stamms CAI4[pIE5-1] (1xCaFbFP) konnten erst bei Steigerung der Belichtungszeit Banden auf einer Höhe von etwa 16 kDa verzeichnet werden (Abb. 3.7 B), welche das einzelne CaFbFP (15,7 kDa) repräsentieren. Bei dem Vergleich der Proteinmengen verschiedener CaFbFP-Varianten zeigte sich unter Berücksichtigung möglicher Mehrfachbindung des Anti-EcFbFP-Antikörpers an die Tandem- und Dreifachfusion die höchste Syntheserate bei der Fusion aus zwei CaFbFP-Proteinen.

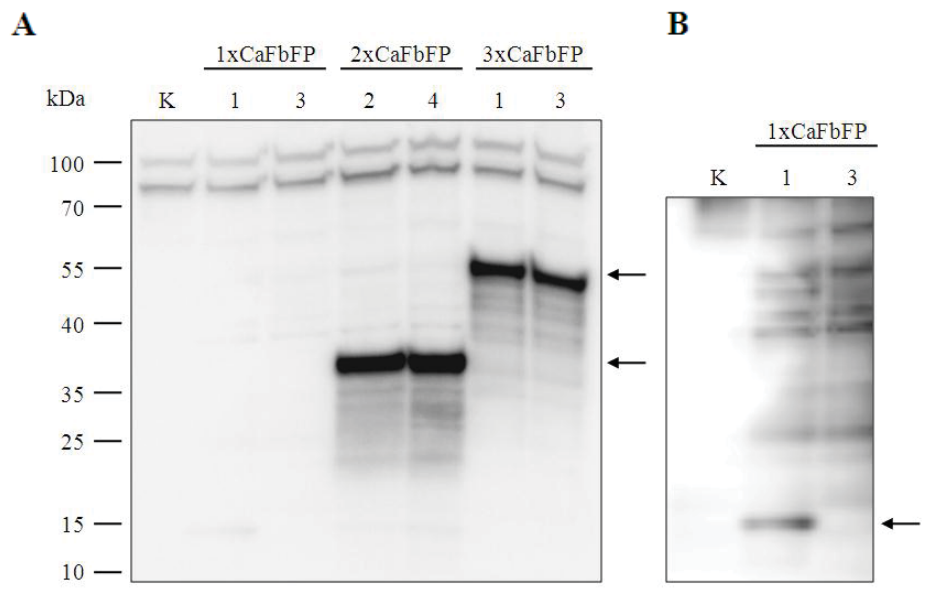


Abb. 3.7: Immunoblot zum Vergleich der Proteinmenge verschiedener CaFbFP-Varianten in *C. albicans*. A: Rohextrakte (100 µg) von *C. albicans* CAI4-Transformanden mit Leerplasmid (pIE5, K), ein- (pIE5-1), zwei- (pIE5-2) und dreifachen (pIE5-3) CaFbFP-Fusionen wurden mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Immunoblot (Anti-EcFbFP) durchgeführt. B: Ausschnitt der Membran nach verlängerter Belichtungszeit. Pfeile kennzeichnen die Banden der CaFbFP-Varianten, Zahlen kennzeichnen die unterschiedlichen Transformanden (Vgl. Abb. 3.8).

3.2.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse verschiedener CaFbFP-Varianten in *C. albicans*

Um die Fluoreszenzintensität von einzelnem, doppeltem und dreifachem CaFbFP-Protein in *C. albicans* zu vergleichen, wurde zunächst ein quantitativer Fluoreszenzvergleich durchgeführt. Aufgrund der Ca*ARS*-Sequenz der verwendeten Plasmide kann es, je nach Anzahl erhaltener Plasmide, zu Unterschieden in den Fluoreszenzintensitäten verschiedener Transformanden desselben Stamms kommen (Kurtz *et al.*, 1987). Daher wurden in diesem Versuch je fünf Transformanden der jeweiligen Stämme untersucht. Je 400 µg der zuvor hergestellten Rohextrakte (s. 3.2.2) wurden in Dreifachbestimmung mit Hilfe des Fluorometers auf ihre Fluoreszenz untersucht. Die Proben wurden bei einer

Wellenlänge von 450 nm angeregt und das emittierte Licht bei 495 nm detektiert (Abb. 3.8). Die Ergebnisse der Messung zeigten für die Transformanden des Stamms CAI4[pIE5-2] (2xCaFbFP) die höchste durchschnittliche Fluoreszenzintensität (3,12 FE), welche mehr als dreimal so hoch war wie die der anderen Varianten. Die Rohextrakte des Stamms mit einzelnem CaFbFP wiesen ein sehr geringes Fluoreszenzsignal auf, welches vergleichbar mit dem der Negativkontrolle (CAI4[pIE5]) war. Die durchschnittliche Fluoreszenz-intensität der Rohextrakte des Stamms mit dreifachem CaFbFP (1,07 FE) lag etwas über der der Proben mit einzelnem Fluoreszenzprotein (0,88 FE), war jedoch weniger als halb so hoch wie die der Rohextrakte des Stamms mit doppeltem CaFbFP. Dieselben Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten konnte durch Messung ganzer Zellen vor dem Zellaufschluss (Verdünnung auf eine optische Dichte von 0,2) mit dem Fluorometer beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

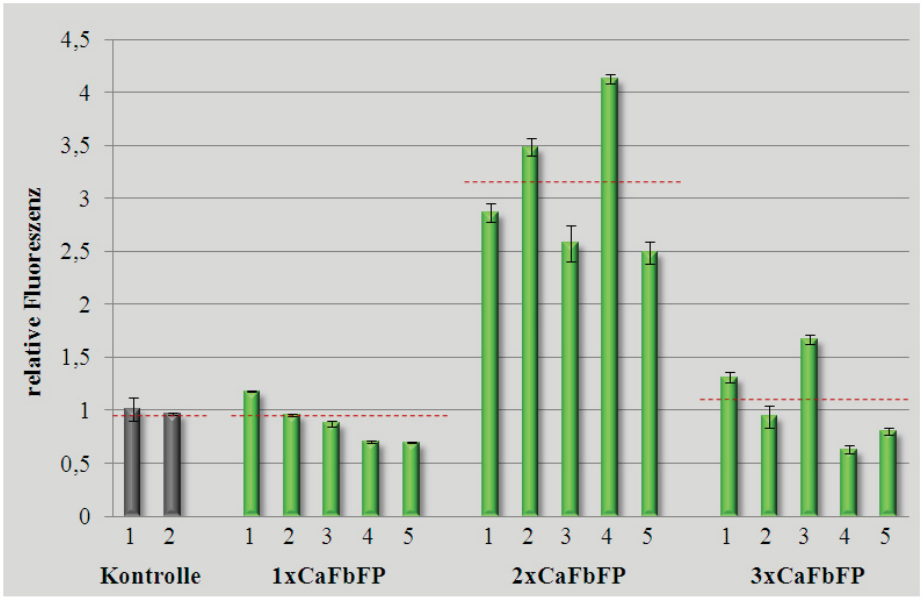


Abb. 3.8: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten verschiedener CaFbFP-Fusionen in *C. albicans*. Relative Fluoreszenz von Rohextrakten (400 µg) der Stämme CAI4[pIE5] (Kontrolle), CAI4[pIE5-1] (1xCaFbFP), CAI4[pIE5-2] (2xCaFbFP) und CAI4[pIE5-3] (3xCaFbFP). Die Proben wurden jeweils mittels Fluorometer in Dreifachbestimmung (technische Replikate) gemessen. Zahlen der X-Achse entsprechen unterschiedlichen biologischen Replikaten. Rot gestrichelte Linien kennzeichnen Durchschnittswerte.

Somit zeigte sich eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität der CaFbFP-Tandemfusion im Vergleich zu dem einzelnen Protein. Im Gegensatz dazu erbrachte die Fusion aus drei Fluoreszenzproteinen keine weitere Steigerung der Fluoreszenz, sondern wies sogar ein deutlich schwächeres Signal als 2xCaFbFP auf.
Zur weiteren Untersuchung der unter-schiedlichen Fluoreszenzintensitäten verschiedener Transformanden desselben Stamms wurden Immunoblot-Analysen (Anti-EcFbFP) aller

verwendeter Rohextrakte durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensitäten mit der Proteinmenge korrelierten (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Fluoreszenzanalysen von *C. albicans*-Zellen mit Ca*FbFP*-Tandemfusion unter Kontrolle verschiedener Promotoren

Um den Effekt des Promotoraustauschs auf die Fluoreszenz lebender Zellen mit CaFbFP zu analysieren, wurden *C. albicans*-Zellen mit Ca*FbFP*-Tamdemfusion unter Kontrolle des *ACT1*- bzw. *TDH3*-Promotors untersucht. Dazu wurden Transformanden von *C. albicans* CAI4 mit den Plasmiden pIE5 bzw. pIE5-2 unter normoxischen und anoxischen Bedingungen bei 30 °C für ein (normoxisch) bis drei (anoxisch) Tage wachsen gelassen. Parallel wurden die Stämme CAI4[pDS1044-1] (*ACT1p*) und CAI4[pIE1-2] (*ACT1p*-2xCa*FbFP*) unter denselben Bedingungen angezogen. Nach erfolgtem Wachstum wurden die Kolonien mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 40 FL, Zeiss) detektiert, wobei die Belichtungszeit so gewählt wurde, dass bei den jeweiligen Leerplasmid-tragenden Kontrollstämmen (CAI4[pDS1044-1] bzw. CAI4[pIE5]) keine Hintergrund-fluoreszenz mehr verzeichnet werden konnte.

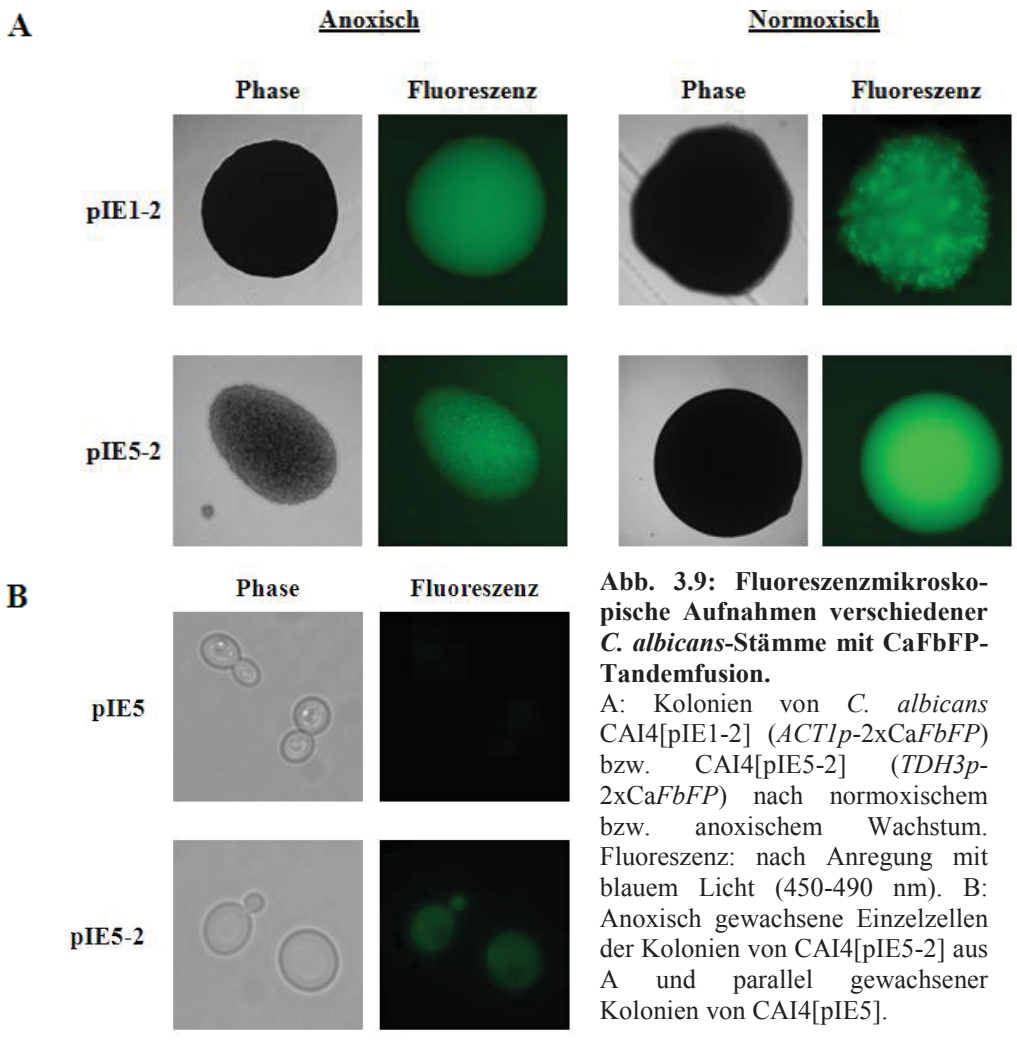


Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener *C. albicans*-Stämme mit CaFbFP-Tandemfusion.
A: Kolonien von *C. albicans* CAI4[pIE1-2] (*ACT1p*-2xCa*FbFP*) bzw. CAI4[pIE5-2] (*TDH3p*-2xCa*FbFP*) nach normoxischem bzw. anoxischem Wachstum. Fluoreszenz: nach Anregung mit blauem Licht (450-490 nm). B: Anoxisch gewachsene Einzelzellen der Kolonien von CAI4[pIE5-2] aus A und parallel gewachsener Kolonien von CAI4[pIE5].

Die Aufnahmen in Abbildung 3.9 zeigen nach Anregung der Kolonien von CAI4[pIE1-2] (*ACT1p*-2xCa*FbFP*) und CAI4[pIE5-2] (*TDH3p*-2xCa*FbFP*) mit Licht im spektralen Bereich von 450-490 nm (blaues Licht) deutliche Fluoreszenz, sowohl nach Wachstum unter normoxischen als auch unter anoxischen Bedingungen.
Zusätzlich wurden Einzelzellen mit verdoppeltem Ca*FbFP*-Gen unter der Kontrolle des *TDH3*-Promotors auf fluoreszenzmikroskopische Detektierbarkeit untersucht. Dazu wurde Zellmaterial entsprechender Kolonien von der Agarplatte entnommen, in etwas ddH_2O gelöst und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Im Gegensatz zur Negativkontrolle (CAI4[pIE5]) war bei dem Stamm mit der Ca*FbFP*-Tandemfusion (CAI4[pIE5-2]) ein Fluoreszenzsignal im Cytoplasma der Zellen sichtbar, wobei dieses unter normoxischen Bedingungen sehr schwach war und bereits nach wenigen Millisekunden verblich (Daten nicht gezeigt). Unter anaeroben Bedingungen war die Fluoreszenz etwas stärker und somit besser detektierbar (Abb. 3.9 B).
Es zeigte sich, dass der *TDH3*-Promotor für die Untersuchungen der CaFbFP-vermittelten Fluoreszenz besser geeignet war als der *ACT1*-Promotor, so dass im Folgenden nur noch *TDH3p* verwendet wurde.

3.2.5 Fluoreszenzanalysen von *C. albicans*-Zellen mit verschiedenen CaFbFP-Varianten

In einer weiteren Untersuchung wurde die Fluoreszenz von *C. albicans*-Zellen mit einzelnem, doppeltem und dreifachem Ca*FbFP*-Gen unter Kontrolle des *TDH3*-Promotors verglichen. Dazu wurden die entsprechenden Stämme unter normoxischen Bedingungen für einen Tag (30 °C) auf SD-Agar wachsen gelassen und die Fluoreszenz des gesamten Zellausstrichs sowie von Einzelzellen untersucht.
Abbildung 3.10 zeigt eine Aufnahme der Zellausstriche verschiedener CaFbFP-Varianten mit Hilfe des ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences) nach Anregung mit

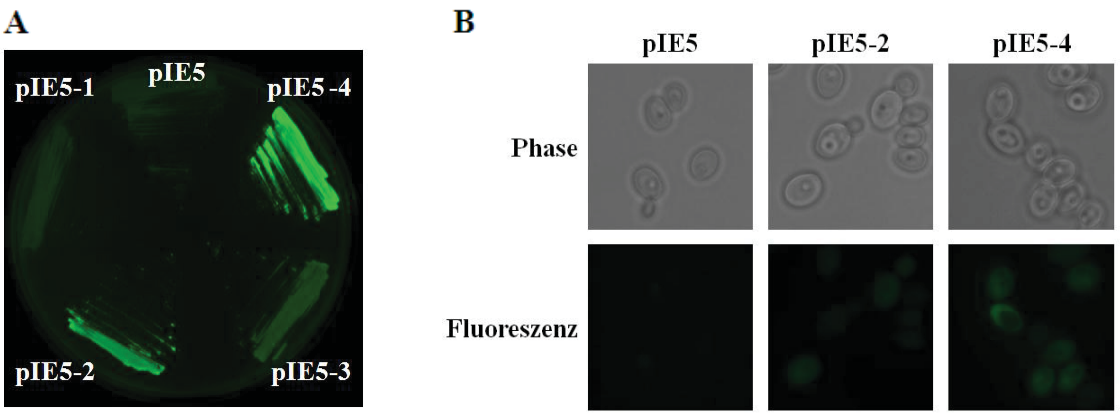


Abb. 3.10: Fluoreszenz verschiedener CaFbFP-Fusionen in *C. albicans*-Zellen. *C. albicans*-Zellen mit Leerplasmid (CAI4[pIE5]), ein- ([CAI4[pIE5-1]), zwei- (CAI4[pIE5-2]), drei- (CAI4[pIE5-3]) und vierfachem Ca*FbFP*-Gen (CAI4[pIE5-4]). Wachstum für einen Tag bei 30 °C auf SD-Agar. A: Zellausstriche auf der Agarplatte nach Anregung bei 460 nm (ImageQuant LAS4000). B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Einzelzellen mit Leerplasmid, zwei- oder vierfachem Ca*FbFP*-Gen aus A nach Bestrahlung mit Weißlicht (Phase) bzw. blauem Licht (Fluoreszenz).

Licht einer Wellenlänge von 460 nm (Blaulicht). Hier wurden zusätzlich Transformanden eines Stamms untersucht, welche eine Fusion von vier Ca*FbFP*-Genen tragen (CAI4[pIE5-4], Konstruktion s. 2.5.1). Das Foto der Agarplatte nach Blaulichtbestrahlung zeigt keine Fluoreszenz für die Stämme mit Leerplasmid und einzelnem CaFbFP und nur ein sehr schwaches Signal bei Zellen mit der dreifach-Fusion (pIE5-3). Der Stamm mit doppeltem CaFbFP wies dagegen ein deutliches Signal auf, und bei Zellen, welche die Fusion aus vier Ca*FbFP*-Genen tragen, konnte die höchste Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 3.10 A). Auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Einzelzellen der Ausstriche von *C. albicans* mit 4xCaFbFP zeigten ein starkes Fluoreszenzsignal, welches etwa doppelt so stark wie das der Zellen mit zweifachem CaFbFP war (Abb. 3.10 B).

3.3 Lokalisation von Fluoreszenz in weiteren Zellkompartimenten von *S. cerevisiae* und *C. albicans*

Das Fluoreszenzprotein CaFbFP sollte als Reporter von Genexpression und Proteinlokalisation in Hefezellen etabliert werden. Die Voraussetzungen für Lokalisationsstudien sind die erfolgreiche Expression und Biosynthese sowie der Transport des Proteins in die verschiedenen Zellkompartimente. In den bisher in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine Fluoreszenzmarkierung des Cytoplasmas CaFbFP-tragender *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Stämme möglich ist. Ergänzend sollte die Fluoreszenz von CaFbFP in weiteren Kompartimenten von *S. cerevisiae* und *C. albicans* untersucht werden.

3.3.1 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae*

Zur Markierung der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* wurden das Expressionsplasmid pYD1 des „pYD1 Yeast Display Vector Kit“ sowie der *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 der Firma Invitrogen verwendet. Das Plasmid pYD1 (Anhang Abb. 9.1) ist so gestaltet, dass nach Integration des gewünschten Gens in die multiple Klonierungsstelle eine Fusion mit dem Gen des Zellwand-assoziierten Proteins Aga2 erreicht wird, welche unter transkriptioneller Kontrolle von *GAL1p* steht. Die entstehende Proteinfusion beinhaltet außerdem ein sogenanntes „Xpress-Epitop“ zwischen Aga2 und dem zu untersuchenden Protein sowie ein C-terminales V5- und 6x-Histidin Epitop zum Nachweis und der Aufreinigung der Proteinfusion (Abb. 3.11).

Das Protein Aga2 bildet zusammen mit Aga1 den Agglutinin-Rezeptor in *S. cerevisiae*-Zellen des *MAT*a Paarungstyps, welcher zur Paarung mit haploiden *MAT*α-Zellen benötigt wird. Aga2 ist durch zwei Disulfidbrücken N-terminal an das Zellwandprotein Aga1 gebunden und verbleibt nach der Sekretion ebenfalls auf der Zelloberfläche (Cappellaro *et al.*, 1991; 1994; Roy *et al.*, 1991). Die Verankerung von Aga1 wird dabei über kovalente Bindung des GPI- (Glycosylphosphatidylinositol) Ankers an das β1,6-Glukan der Zellwand vermittelt (Lu *et al*., 1995).

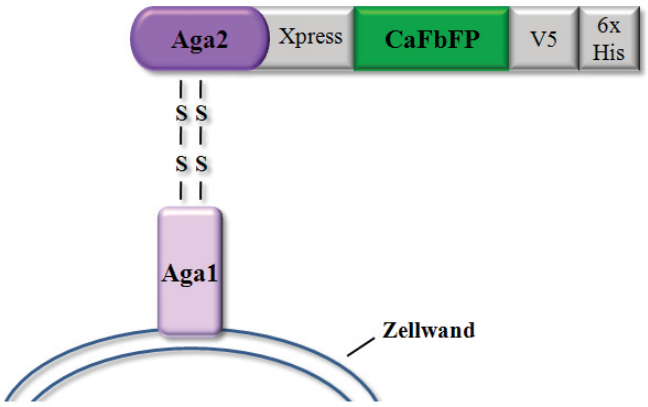


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des verwendeten Systems zur Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Schema des Systems zur Lokalisation von Proteinen auf der Oberfläche von *S. cerevisiae*-Zellen, hier bereits an die Oberflächenpräsentation von CaFbFP angepasst (modifiziert aus: Anleitung des „pYD1 Yeast Display Vector Kit“, Invitrogen).

3.3.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche

Für die Herstellung eines *S. cerevisiae*-Stamms zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP wurde das Plasmid pIE9 durch homologe Rekombination in dem Leucin- und Tryptophan-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 konstruiert (s. 2.5.2). pIE9 leitet sich von dem Plasmid pYD1 ab und trägt durch Integration von Ca*FbFP* eine Fusion aus *GAL1p*, *AGA2*, Ca*FbFP* und den Genen der verschiedenen Epitopmarkierungen. Da die Tandemfusion von Ca*FbFP* in *S. cerevisiae* nur eine leichte Steigerung der Fluoreszenzintensität erzielte und das einzelne Protein durch seine geringe Größe möglicherweise Vorteile bei der Sekretion bietet, wurde ein einzelnes Ca*FbFP*-Gen verwendet. Der Vektor trägt außerdem das Ampicillin-Resistenzgen und den pUC Replikationsursprung (*ori*) zur Selektion bzw. Replikation in *E. coli* sowie das Tryptophan-Markergen (*TRP1*) und eine *CEN6*/*ARS4*-

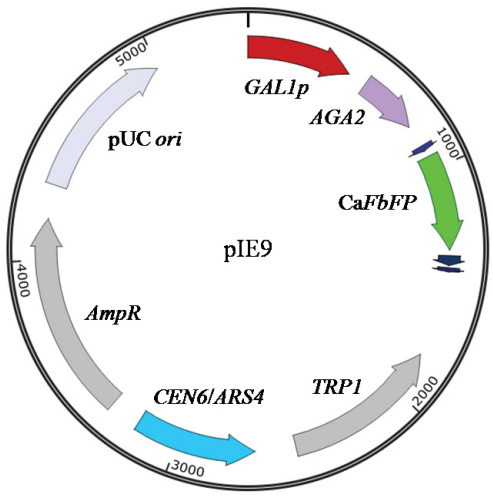


Abb. 3.12: Expressionsplasmid zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Expressionsplasmid pIE9 mit *GAL1p-AGA2*-Ca*FbFP*-Fusion zur Oberflächen-lokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Dunkelblaue Pfeile kennzeichnen die Sequenzen der Epitopmarkierungen (Xpress, V5, 6xHis)

Sequenz zur Selektion bzw. autonomen Replikation in Hefe (Abb. 3.12). Der verwendete Wirtsstamm weist den Paarungstyp *MAT*a auf und exprimiert das genomisch integrierte *AGA1*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors.

3.3.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von Aga2-CaFbFP in *S. cerevisiae*

Um die Proteinsynthese der Aga2-CaFbFP-Fusion zu überprüfen, wurde ein immunologischer Nachweis CaFbFP-assoziierter Proteine im Gesamtrohextrakt durchgeführt. Das 18 Aminosäuren-lange Signalpeptid (2,0 kDa) von Aga2 wird während der Sekretion der Fusion abgespalten, so dass das reife Fusionsprotein eine theoretische molekulare Masse von 31,2 kDa besitzt. Allerdings ist zu beachten, dass Mannosylierungen an 10 Serin- bzw. Threonin-Resten von Aga2 identifiziert werden konnten (Cappellaro *et al.*, 1991) und die Sequenz 11 weitere potentielle *O*-Glykosylierungsstellen aufweist, so dass die tatsächliche Größe des Proteins im Immunoblot erwartungsgemäß über 31 kDa liegt. Durch Fusion von Aga2 mit CaFbFP sowie den verschiedenen Epitopen und Verbindungssequenzen entstehen außerdem weitere potentielle *O*-Glykosylierungsstellen außerhalb von Aga2. Die Sequenz des Fusionsproteins ist in Abbildung 3.13 dargestellt, wobei potentiell *O*-glykosylierte Serin- oder Threonin-Reste hervorgehoben wurden.

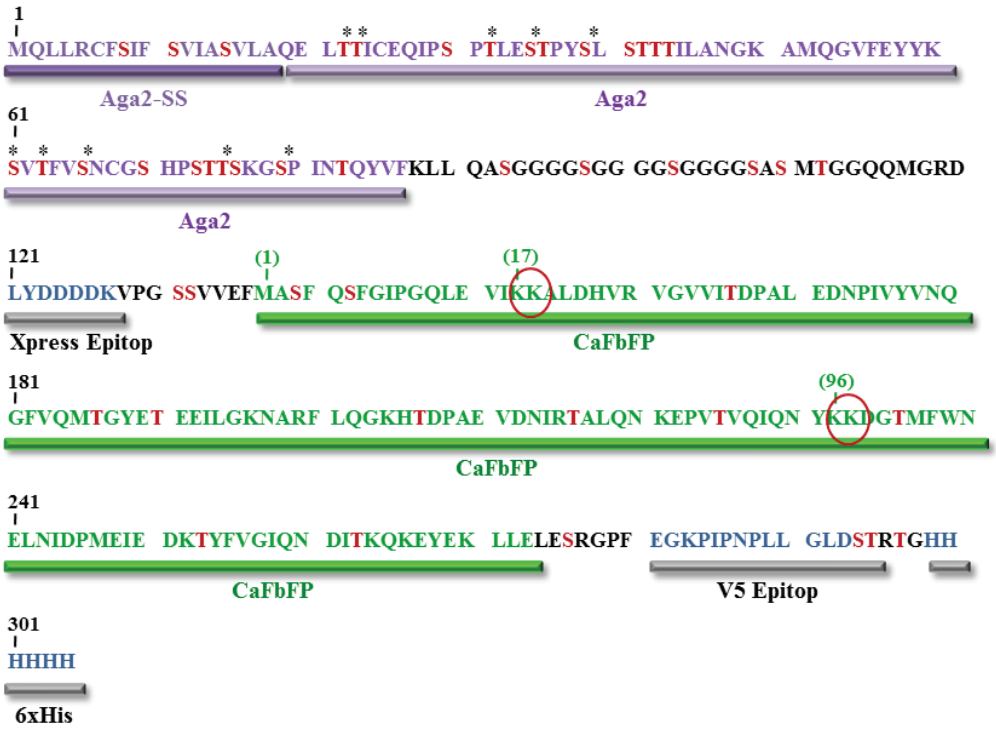


Abb. 3.13: Proteinsequenz der Fusion zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP. Aminosäuresequenz von Aga2-CaFbFP mit Aga2 Signalsequenz (Aga2-SS) und Epitopmarkierungen. Violett: Aga2-SS bzw. reifes Aga2-Peptid (Aga2), Grün: CaFbFP, Grau und Blau: Xpress-Epitop, V5-Epitop, 6xHis-Anhang. Rot markierte Aminosäuren kennzeichnen potentielle *O*-Glykosylierungsstellen, wobei Sterne Ser-/Thr-Mannosylierungen von Aga2 nach Cappellaro *et al.* (1991) kennzeichnen. Rote Kreise markieren die potentiellen Kex2-Schnittstellen K17K18 und K96K97 (s. 3.3.1.7) in der CaFbFP-Sequenz.

Zum immunologischen Nachweis von CaFbFP wurden die Stämme *S. cerevisiae* EBY100[pYD1] (*AGA2*) und EBY100[pIE9] (*AGA2*-Ca*FbFP*) in Glukose-haltigem Medium (SD+Leu) inokuliert und ÜN bei 30 °C angezogen. Mit den Übernachtkulturen wurde dann, zur Induktion des *GAL1*-Promotors, Galaktose-haltiges SGR+Leu-Medium auf eine optische Dichte von 0,2 angeimpft. Die Zellen wurden anschließend zur optimalen Expression des Fusionsproteins etwa 24 h bei 21 °C (Herstelleranweisungen) wachsen gelassen und zur Herstellung von Rohextrakten aufgeschlossen. Dann wurde wie bisher ein Immunoblot (Anti-EcFbFP) der Rohextrakte durchgeführt (Abb. 3.14 links), wobei Rohextrakt des Stamms *S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3] als Positivkontrolle diente.

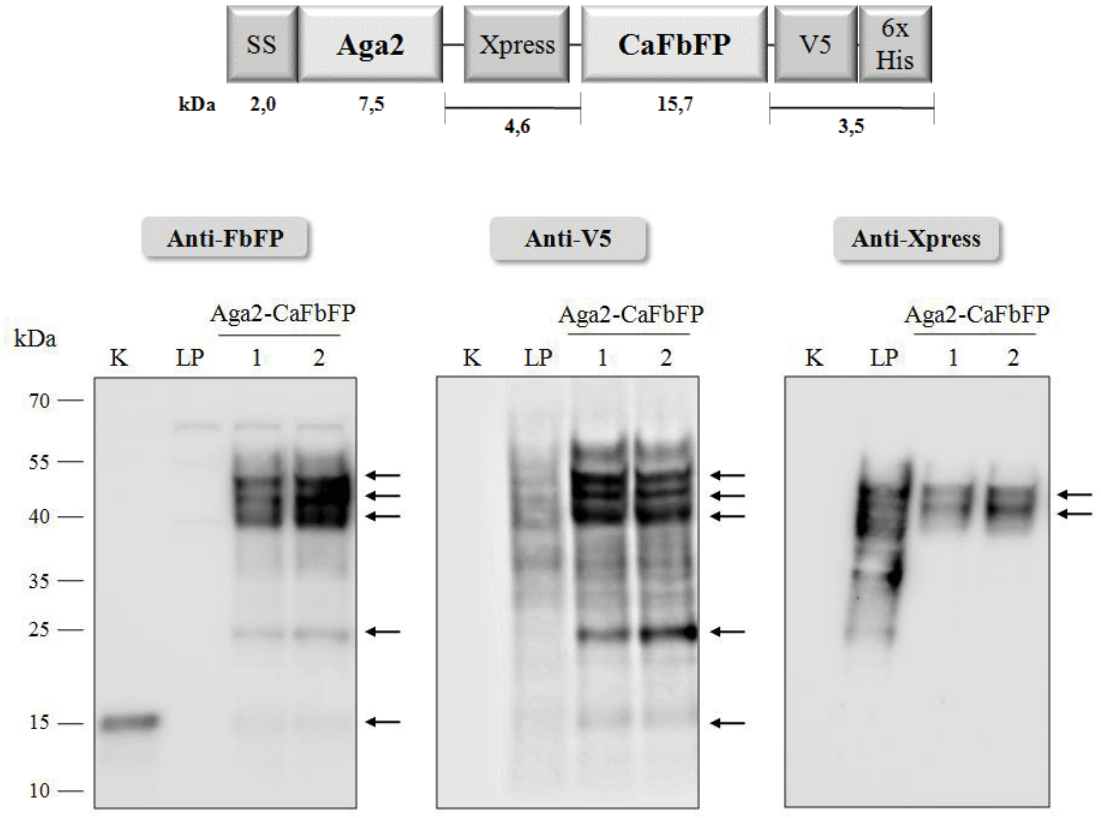


Abb. 3.14: Immunoblot-Analysen der Aga2-CaFbFP-Fusion in Rohextrakten von *S. cerevisiae*. Immunoblot nach Auftrennung der Proteine aus Rohextrakten (100 µg) der Stämme *S. cerevisiae* EBY100[pYD1] (Aga2, LP) und EBY100[pIE9] (Aga2-CaFbFP) sowie Rohextrakt eines Kontrollstamms mit cytoplasmatischem CaFbFP (*S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3], K) mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid). Links: Anti-EcFbFP, Mitte: Anti-V5, Rechts: Anti-Xpress. Pfeile kennzeichnen die Banden. Zahlen bezeichnen die Nummer des biologischen Replikats. Darüber: Schema der Aga2-CaFbFP-Fusion mit theoretischen molekularen Massen der Komponenten in kDa.

Die Aufnahme der Membran nach Antikörperbehandlung (Anti-EcFbP) zeigte, wie erwartet, keine Bande in den Spuren der Rohextrakte des Kontrollstamms EBY100[pYD1] (LP), hingegen aber die Bande des einzelnen CaFbFP-Proteins in der Spur der Positivkontrolle (K) (THY.AP4[pIE3]). Bei den Rohextrakten mit Aga2-CaFbFP konnte

eine deutliche Bande verzeichnet werden, welche sich bei genauerer Betrachtung in drei einzelne Banden auf einer Höhe von etwa 40, 46 bzw. 53 kDa aufteilte. Aufgrund der verschiedenen Glykosylierungsstufen von Aga2 und möglicher weiterer *O*-Glykosylierungen der Proteinfusion sind diese Banden Aga2-CaFbFP zuzuordnen. In den Spuren waren außerdem weniger intensive Banden bei etwa 25 und 16 kDa zu sehen, welche auf eine Prozessierung der Fusion hindeuten.
Dies wurde im Folgenden durch ergänzende Immunoblot-Analysen mit Antikörpern, welche gegen das V5- (Anti-V5) bzw. das Xpress-Epitop (Anti-Xpress) gerichtet sind, genauer untersucht (Abb. 3.14 Mitte und Rechts).
Der Nachweis nach Behandlung mit dem Anti-V5-Antikörper zeigte erwartungsgemäß keine Bande in der Spur mit Rohextrakt des cytoplasmatischen CaFbFP (THY.AP4[pIE3]). In der Spur des Kontrollstamms mit Aga2 (LP) war im Bereich von etwa 35-55 kDa ein „Schmier“ detektierbar, welcher das Aga2-Protein unterschiedlicher Glykosylierungszustände inklusive der Epitopmarkierungen repräsentiert. Diese diffusen Banden waren auch in den beiden Spuren der Rohextrakte des Stamms EBY100[pIE9] (*AGA2*-Ca*FbFP*) sichtbar. Hier war zusätzlich ein Bandenmuster wie bei dem Anti-EcFbFP-Nachweis zu sehen (40-53 kDa, 25 kDa, 16 kDa). Somit scheinen die beiden verkürzten Proteinvarianten bei 16 bzw. 25 kDa sowohl CaFbFP (15,7 kDa) als auch das V5-Epitop (1,4 kDa) aufzuweisen.
Der immunologische Nachweis von Proteinen nach Behandlung mit dem Anti-Xpress-Antikörper zeigte wie bei dem Anti-V5-Blot keine Bande in der Spur von CaFbFP-haltigen Rohextrakten, da das Protein keine Epitopmarkierungen aufweist. Das glykosylierte Aga2-Protein konnte jedoch in der Spur des Rohextrakts von EBY100[pYD1] nachgewiesen werden. In den Bahnen der Rohextrakte der Transformanden mit Aga2-CaFbFP-Fusion (EBY100[pIE9]) waren lediglich zwei Banden bei etwa 43 und 48 kDa detektierbar. So fehlten die Banden bei 25 und 16 kDa, die sowohl auf dem Anti-EcFbFP-Blot als auch auf dem Anti-V5-Blot verzeichnet wurden.
Die Synthese von Aga2-CaFbFP konnte somit durch verschiedene Immunoblots gezeigt werden, wobei deutlich wurde, dass die Fusion in verschiedenen Glykosylierungsstufen vorliegt und Aga2-CaFbFP teilweise prozessiert wird. Eine der Prozessierungen schien dabei die Abspaltung des Xpress-Epitops zu bewirken.

3.3.1.3 Fluoreszenzanalysen zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP in *S. cerevisiae*

Zur Analyse der Oberflächenpräsentation wurden einige Transformanden der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Vektoren pIE9 (*AGA2*-Ca*FbFP*) sowie pYD1 (*AGA2*) wie zur Herstellung von Rohextrakten (s. 3.3.1.2) kultiviert und die Fluoreszenz der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei konnte zwar eine erhöhte intrazelluläre Fluoreszenz der Zellen mit Aga2-CaFbFP im Vergleich zur Autofluoreszenz der Leerplasmid-tragenden Zellen (Aga2) beobachtet werden, jedoch war kein Fluoreszenzsignal auf der Zelloberfläche zu sehen (Daten nicht gezeigt).
Da es bisher noch keine Analysen zur Fluoreszenz von FbFP im extrazellulären Bereich gibt, ist unklar, ob das Protein in der Lage ist, auf der Zelloberfläche zu fluoreszieren. Es ist beispielsweise ungeklärt, ob der Kofaktor nach Sekretion von CaFbFP binden kann bzw. ob dieser mit dem Protein auf die Oberfläche transportiert wird. Um zu untersuchen,

ob CaFbFP trotz fehlender Fluoreszenz auf der Oberfläche lokalisiert ist, wurde im Folgenden eine Fluoreszenzmarkierung zur Lokalisationsanalyse von CaFbFP durchgeführt. So wurden Zellen der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Plasmiden pYD1 (*AGA2*) und pIE9 (*AGA2*-Ca*FbFP*) (Anzucht s.o.) mit spezifischen Antikörpern (1. AK: Anti-EcFbFP, 2. AK: Anti-Kaninchen) behandelt, wobei der Sekundärantikörper an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) gekoppelt war. Um auch die intrazelluläre CaFbFP-Verteilung untersuchen zu können, wurden zusätzlich Sphäroplasten der Stämme einer FITC-Markierung unterzogen, so dass ein Eindringen der Antikörper in die Zellen ermöglicht wurde. In Abbildung 3.15 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FITC-Markierung dargestellt, wobei die Belichtungszeit so gewählt wurde, dass bei dem Kontrollstamm ohne CaFbFP (EBY100[pYD1]) keine Autofluoreszenz mehr detektierbar war (Daten nicht gezeigt).

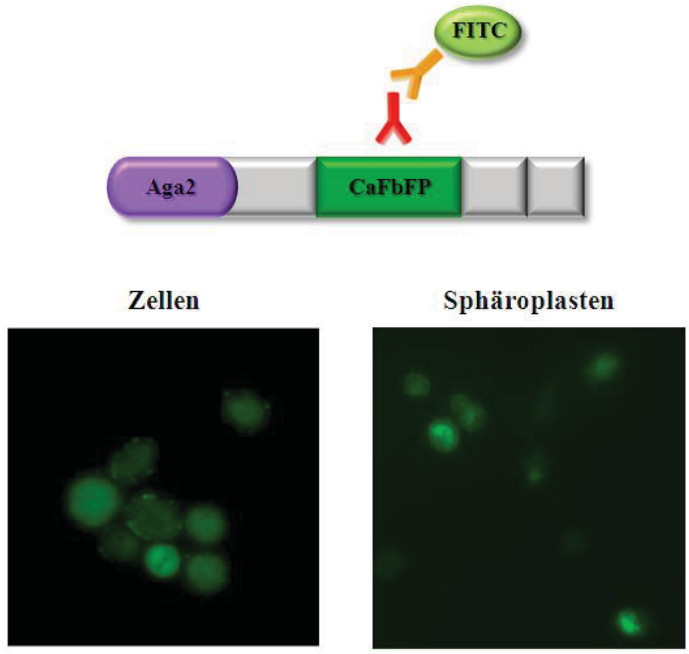


Abb. 3.15: FITC-Markierung zum Nachweis von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen FITC-markierter Zellen (links) bzw. Sphäroplasten (rechts) des Stamms *S. cerevisiae* EBY100[pIE9] (*AGA2*-Ca*FbFP*) nach Bestrahlung mit blauem Licht. Die Zellen wurden zuvor in SGR+LEU-Medium für etwa 24 h bei 21 °C angezogen.

Bei der FITC-Markierung ganzer Zellen war deutlich Fluoreszenz auf der Zelloberfläche zu erkennen, welche an bestimmten Stellen auf der Oberfläche besonders stark war und sich somit in Form von hellen Punkten darstellte. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass CaFbFP-Proteine auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Die Markierung sphäroplastierter Hefezellen ohne Zellwand zeigte, dass sich CaFbFP auch innerhalb der Zelle befindet.

3.3.1.4 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen mit Multikopie-Plasmid-basierter Expression von *AGA2*-Ca*FbFP*

Mögliche Gründe dafür, dass bisher keine CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz auf der Oberfläche der Hefezellen detektiert werden konnte, können die schwache Fluoreszenz von CaFbFP und die geringe Menge des Proteins auf der Oberfläche sein. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Syntheserate der Fusion durch Steigerung der Anzahl der Plasmide pro Zelle erhöht. Das verwendete Basisplasmid pYD1 weist eine autonom replizierende (*ARS4*) sowie eine Centromer-Sequenz (*CEN6*) auf, wodurch sich das Plasmid bei der Mitose wie ein Chromosom verhält und somit in der Regel 1-2 Plasmide pro Zelle vorliegen (Clarke & Carbon, 1980). In dieser Arbeit sollte die *CEN6*/*ARS4*-Kassette gegen den Replikator des 2-micron-Plasmids ausgetauscht werden, da durch diese Sequenz Kopienzahlen von 50-100 Plasmiden pro Zelle entstehen (Clark-Walker & Miklos, 1974).

Zur Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen mit Multikopie-Plasmiden zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP, wurde das Plasmid pIE9-2µ konstruiert, indem die *CEN6/ARS4*-Sequenz gegen das *2-micron ori* ausgetauscht wurde (s. 2.5.2). Anschließend wurde der *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 mit dem Plasmid transformiert und wie zuvor über das *TRP1*-Markergen auf Transformanden mit Plasmid selektioniert. Zur Herstellung eines Kontrollstamms wurde analog zu der Konstruktion von pIE9-2µ das Plasmid pYD1-2µ hergestellt (s. 2.5.2) und *S. cerevisiae* EBY100 mit diesem transformiert.

3.3.1.5 Nachweis der Proteinsynthese von Aga2-CaFbFP nach Multikopie-Plasmid-basierter Expression

Im Folgenden sollte ein Nachweis der Synthese des Fusionsproteins nach Multikopie-Plasmid-basierter Expression der Genfusion durch Immunoblot-Analyse erbracht werden. Hierzu wurden die *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den *2-micron ori*-Plasmiden pYD1-2µ und pIE9-2µ wie unter 3.3.1.2 beschrieben angezogen, Rohextrakte hergestellt und ein Immunoblot mit Antikörpern gegen FbFP (Anti-EcFbFP) durchgeführt (Abb. 3.16). Als Kontrolle diente wie zuvor Rohextrakt des *S. cerevisiae*-Stamms THY.AP4[pIE3]. Zusätzlich wurden in den letzten vier Spuren Proben eines *S. cerevisiae*-Stamms aufgetragen, welcher einen Aminosäureaustausch (K18A) in der CaFbFP-Sequenz der Aga2-CaFbFP-Fusion trägt. Dieser wird unter 3.3.1.7 näher erläutert.

Die Membran zeigte in den Spuren der Rohextrakte von Stämmen mit Leerplasmid erwartungsgemäß kein Signal. In der Bahn des Rohextrakts mit einzelnem CaFbFP (K) war dagegen die Bande des einzelnen CaFbFP-Proteins auf einer Höhe von etwa 16 kDa zu verzeichnen. Die Banden in den Spuren der unterschiedlichen Transformanden mit Aga2-CaFbFP wiesen alle das gleiche Muster auf. So ließen sich Banden auf einer Höhe von etwa 100 und 58 kDa sowie eine starke Bande im Bereich von 40-55 kDa verzeichnen, welche das glykosylierte Fusionsprotein repräsentieren. Weitere Banden bei 25 und 16 kDa wiesen auch hier auf einen Abbau von CaFbFP-assoziiertem Protein hin.

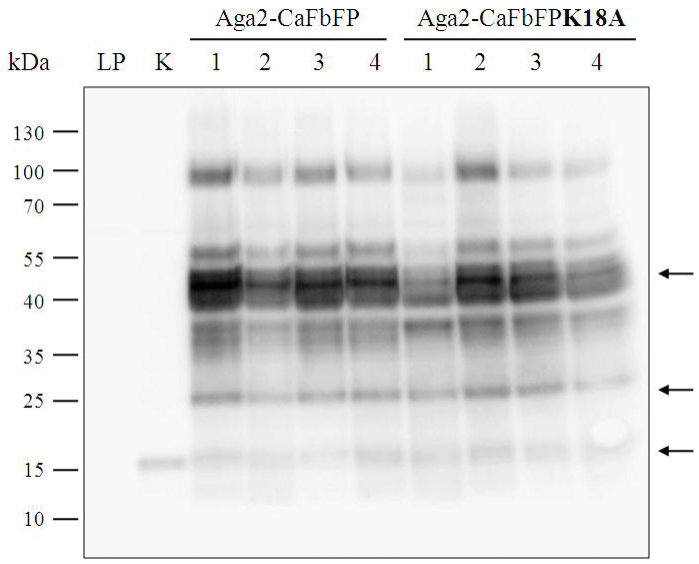


Abb. 3.16: Synthesenachweis von Aga2-CaFbFP nach Multikopie-Plasmid-basierter Expression der Genfusion. Immunoblot (Anti-EcFbFP) von Rohextrakten (100 µg) der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Multikopie-Plasmiden pYD1-2µ (LP), pIE9-2µ (Aga2-CaFbFP), pIE9K18A-2µ (Aga2-CaFbFPK18A) sowie Rohextrakt eines Kontrollstamms mit cytoplasmatischem CaFbFP (*S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3] (K)). Pfeile kennzeichnen die Banden. Zahlen stehen für die Nummer der biologischen Replikate.

3.3.1.6 Fluoreszenz von Aga2-CaFbFP bei Multikopie-Plasmid-basierter Expression

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Expressionsrate von *AGA2*-Ca*FbFP* einen Effekt auf die Fluoreszenz auf der Zelloberfläche hat, wurden die *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den 2-micron-Plasmiden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auch hier wurde zusätzlich der unter 3.3.1.7 beschriebene Stamm mit Aminosäureaustausch K18A in CaFbFP untersucht.

Die Stämme wurden zur Fluoreszenzanalyse auf Galaktose-haltigem Agar (SGR+Leu) ausgestrichen und für einen Tag bei 30 °C wachsen gelassen. Danach wurden einige Zellen von der Platte entnommen und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.M1, Zeiss) betrachtet (Abb. 3.17). Nach Anregung mit blauem Licht (450-490 nm) wies der Kontrollstamm mit dem Leerplasmid ohne Fluoreszenzprotein nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz auf. Bei den Stämmen mit Aga2-CaFbFP-Fusion mit und ohne Aminosäureaustausch K18A konnten hingegen deutliche Fluoreszenzsignale auf der Oberfläche der *S. cerevisiae*-Zellen detektiert werden, welche sich, wie bei der FITC-Markierung, an bestimmten Punkten der Zelloberfläche verstärkt darstellten. Je nach Zelle und fokussierter Ebene unterschieden sich diese Punkte in Größe und Anzahl.

Somit konnte nach Steigerung der Proteinmenge die Fluoreszenz von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* gezeigt werden.

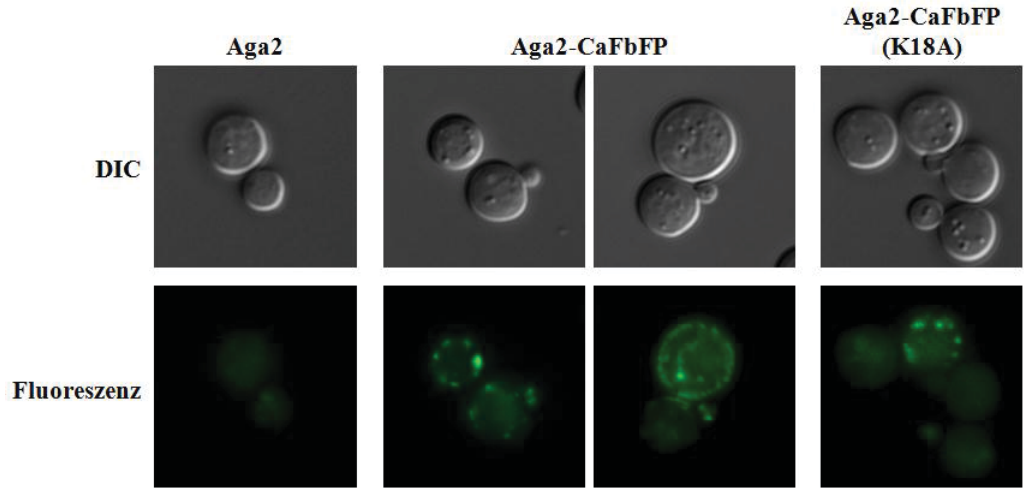


Abb. 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Oberflächenpräsentation von CaFbFP in *S. cerevisiae*-Zellen mit Multikopie-Expressionsplasmiden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen von *S. cerevisiae* EBY100-Stämmen mit den Plasmiden pYD1-2µ (Aga2), pIE9-2µ (Aga2-CaFbFP) und pIE9K18A-2µ (Aga2-CaFbFPK18A) nach Bestrahlung mit weißem (DIC) bzw. blauem Licht (Fluoreszenz). Die Zellen wurden zuvor für einen Tag bei 30 °C auf SGR+Leu-Agar angezogen.

3.3.1.7 Untersuchungen zur Prozessierung von Aga2-CaFbFP

Die Ergebnisse der immunologischen Analysen weisen darauf hin, dass die Fusion von CaFbFP mit Aga2 und den drei Epitopen während der Sekretion proteolytisch geschnitten wird. Da CaFbFP als Reporter in Hefe und zur dortigen Fusion mit anderen Proteinen verwendet werden soll, sollte es nach Möglichkeit keine Proteaseschnittstellen geben, die zur Trennung sowie einem putativen Abbau solcher Fusionen führen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Identifizierung potentieller Schnittstellen von Proteasen des sekretorischen Wegs begonnen, indem die Proteinsequenz der Aga2-CaFbFP-Fusion auf Motive der Protease Kex2 überprüft wurde.

Das Protein Kex2 aus *S. cerevisiae* ist eine Calcium-abhängige Serinprotease, welche spezifisch C-terminal von dibasischen Sequenzen schneidet (Julius *et al*., 1984; Fuller *et al*., 1989) und aufgrund der Lokalisation in der Membran des späten Golgi (Redding *et al*., 1991) Proteine, die den sekretorischen Weg durchlaufen prozessiert.

Bei der Untersuchung der Proteinsequenz von CaFbFP zeigten sich die zwei basischen Aminosäurepaare Lys-Lys an den Positionen 17 und 18 sowie 96 und 97 als potentielle Kex2-Schnittstellen (Abb. 3.13). Zunächst wurde die putative Kex2-Schnittstelle K17K18 des Proteins durch Austausch des zweiten Lysins gegen ein Alanin entfernt (K18A). Dieser Aminosäureaustausch wurde bei dem *CEN6*-basierten Expressionsplasmid pIE9 mittels gerichteter Mutagenese durchgeführt (pIE9K18A) und zusätzlich durch Austausch von *CEN6* gegen den *2-micron ori* ein Multikopie-Plasmid (pIE9K18A-2µ) hergestellt (s. 2.5.2).

Um einen möglichen Effekt des Basenaustauschs auf die Prozessierung der Aga2-CaFbFP-Fusion auf der Zelloberfläche zu überprüfen, wurden der Stamm *S. cerevisiae* EBY100 mit

dem jeweiligen mutagenisierten Plasmid transformiert und die Proteinsynthese sowie die Fluoreszenz einiger Plasmid-tragender Transformanden im Vergleich zu den Stämmen EBY100[pYD1] und EBY100[pIE9] untersucht. Dabei wies das Bandenmuster der Rohextrakte von Stämmen mit Aga2-CaFbFPK18A im Immunoblot gegen FbFP dieselben Merkmale auf wie bei Rohextrakten von Transformanden mit der nicht modifizierten Fusion (Abb. 3.16). Auch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Zellen zeigten keinen Unterschied zu Zellen mit der Fusion ohne K18A Mutation in CaFbFP (Abb. 3.17). Somit scheint die Protease Kex2 nicht an der Prozessierung von Aga2-CaFbFP beteiligt zu sein.

3.3.2 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *C. albicans*

Für die Hefe *S. cerevisiae* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CaFbFP sekretiert und auf der Zelloberfläche lokalisiert werden kann und das Protein dort im extrazellulären Bereich in der Lage ist, zu fluoreszieren. Daher sollte die Sekretion und Oberflächenpräsentation von CaFbFP auch in *C. albicans* untersucht werden. Da für diesen Organismus im Gegensatz zu *S. cerevisiae* keine etablierte Methode zur Exposition von Proteinen auf der Zelloberfläche existiert, wurde ein System verwendet, welches bereits erfolgreich zur Sekretion und Oberflächenlokalisation der *C. antarctica*-Lipase CalB in *C. utilis* eingesetzt wurde (Kunigo *et al*., 2013). Dabei wurde das zu untersuchende Protein N-terminal mit der Signalsequenz (SS) und C-terminal mit dem GPI-Anker des Zellwand-assoziierten Proteins Gas1 aus *C. utilis* fusioniert. Das Protein Gas1 wurde in *C. utilis* aufgrund seiner Homologie zu Gas1 aus *S. cerevisiae* identifiziert (Kunigo *et al.,* 2013). Bei *S. cerevisiae* weist das Protein β1,3-Glukanosyltransferase-Aktivität auf und wird über einen GPI-Anker in der Zellwand verankert, wo es eine wichtige Rolle bei dem Aufbau der Zellwand übernimmt (Conzelmann *et al*., 1988; Mouyna *et al*., 2000). Als Homologe des Gas1-Proteins aus *S. cerevisiae* wurden bei *C. albicans* die Proteine Phr1 und Phr2 identifiziert, welche ebenfalls β-1,3-Glukanosyltransferase-Aktivität aufweisen (Mühlschlegel & Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al*., 1995; Mouyna *et al*., 2000). Zusätzlich scheinen diese Proteine auch an der Virulenz von *C. albicans* beteiligt zu sein (Ghannoum *et al*., 1995).
Da das Plasmid pCB3 in dieser Arbeit erstmals als Grundlage einer Oberflächenpräsentation von Proteinen in *C. albicans* verwendet wird, war die Überprüfung der generellen Funktionalität des Systems in diesem Organismus Bestandteil der Untersuchungen.

3.3.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche

Zur Fusion von CaFbFP mit der Signalsequenz sowie dem GPI-Anker des Proteins CuGas1 wurde das verdoppelte CaFbFP-Protein verwendet, da diese Variante eine stärkere Fluoreszenz als das einzelne Protein aufweist. Zur Genexpression dieser Fusion wurde auf Basis des Plasmids pCB3 der Vektor pOXY10 durch Integration von 2xCa*FbFP* zwischen die Sequenzen des Gas1-Signalpeptids und des GPI-Ankers konstruiert (s. 2.5.2). Diese Fusion steht dabei unter transkriptioneller Kontrolle des *TDH3*-Promotors aus *C. utilis*, dessen Aktivität auch in *C. albicans* gezeigt wurde (Kunigo *et al*., 2013). pOXY10 enthält

außerdem das Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* sowie eine *ARS2*-Sequenz aus *C. albicans* zur autonomen Replikation in Hefe (Abb. 3.18).
Um Expression und Funktionalität der Fusion in *C. albicans* zu untersuchen, wurde der Stamm CAF2-1 mit dem Plasmid pOXY10 sowie zur Herstellung eines Kontrollstamms mit pCB3 transformiert. Die Selektion von Transformanden erfolgte dabei über das bakterielle *sat1*-Markergen, welches auf pCB3 und pOXY10 unter Kontrolle des *C. albicans ACT1p* kodiert ist und den Nuorseothricin-sensitiven Stamm CAF2-1 zu Wachstum auf Medium mit Nuorseothricin befähigt.

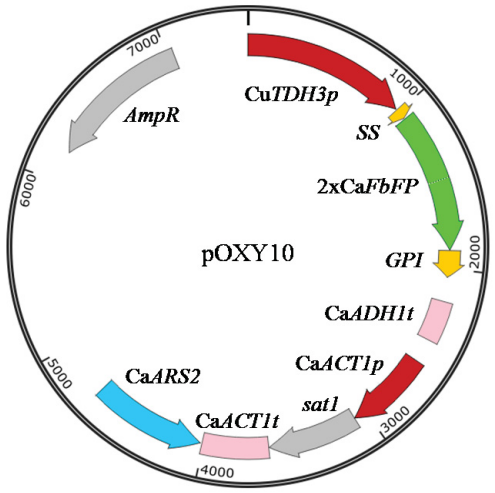


Abb. 3.18: Expressionsplasmid zur Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *C. albicans*. Konstruktion der Fusion aus CuGas1 Signalsequenz (SS) mit 2xCaFbFP und CuGas1-GPI-Anker (GPI) durch Integration von 2xCa*FbFP* in pCB3. Weitere Bestandteile von pOXY10: Ca*ADH1*-Terminator Sequenz, bakterielles *sat1*-Markergen unter Kontrolle des Ca*ACT1*-Promotors zur Selektion in Hefe, Ca*ACT1*-Terminator, Ca*ARS2* zur autonomen Replikation in Hefe, Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

3.3.2.2 Untersuchung der Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *C. albicans*

Um die Lokalisation von CaFbFP auf der Oberfläche von *C. albicans*-Zellen zu überprüfen, wurde die Fluoreszenz der Transformanden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen Zellen mit 2xCa*FbFP*-tragendem Plasmid im Vergleich zu Zellen mit Leerplasmid verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde im Folgenden die generelle Expression des fusionierten 2xCa*FbFP*-Gens durch immunologischen Nachweis von CaFbFP in Rohextrakten überprüft. So wurden die *C. albicans* Stämme CAF2-1[pCB3] und CAF2-1[pOXY10] in einem Volumen von 10 ml unter Selektionsdruck (YPD+Nuorseothricin (200 µg/ml)) bis zum exponentiellen Wachstum angezogen (30 °C) und Rohextrakte der Zellen hergestellt. Anschließend wurde wie zuvor eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) der Extrakte (200 µg) mit anschließendem Immunoblot (Anti-EcFbFP) durchgeführt (Abb. 3.19). Dabei diente Rohextrakt (100 µg) des Stamms mit 2xCaFbFP (CAI4[pIE5-2]) als Positivkontrolle. Das Fusionsprotein wurde in Abbildung 3.19 als „(SS-)2xCaFbFP-GPI“ bezeichnet, da die Signalsequenz, je nach Lokalisation des Proteins, möglicherweise noch nicht abgespalten wurde. In Rohextrakten wurde vorwiegend das Vorläuferprotein (39 kDa) erwartet, da das reife Peptid in der Zellwand verankert ist und diese in der Regel kein Bestandteil von Rohextrakten ist.

In der Spur des Rohextraktes von Klon 2 mit (SS)-2xCaFbFP-GPI konnte eine deutliche Bande bei etwa 42-48 kDa detektiert werden, welche in den Spuren der Rohextrakte der Kontrollstämme (CAF2-1[pCB3]) nicht zu sehen war. In den Bahnen von Klon 1 und 7 (SS-CaFbFP-GPI) wurde auf derselben Höhe ebenfalls jeweils ein sehr schwaches Signal verzeichnet, welches in der Kontrolle fehlte. Die Expression der Fusion in *C. albicans* konnte somit bestätigt werden.

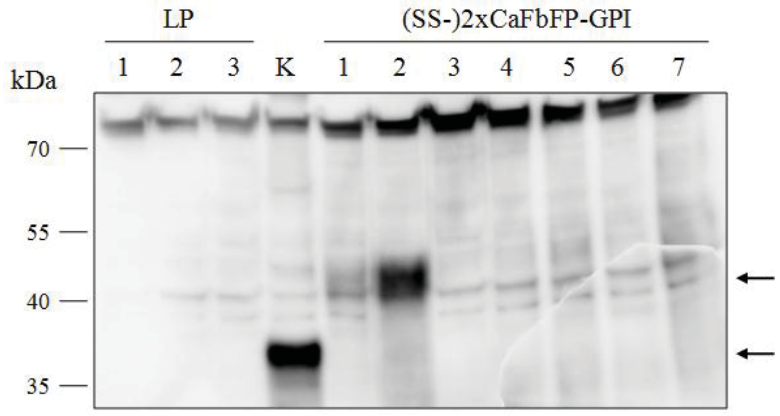


Abb. 3.19: Immunologischer Nachweis von CaFbFP in *C. albicans*-Rohextrakten. Immunoblot (Anti-EcFbFP) nach Auftrennung der Proteine aus Rohextrakten der *C. albicans* CAF2-1-Stämme mit den Plasmiden pCB3 (LP), pIE5-2 (2xCaFbFP, K) und pOXY10 ((SS-)2xCaFbFP-GPI) mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid). Anzucht der Zellen in YPD-Medium mit Nuorseothricin (200 µg/ml) bei 30 °C. Pfeile kennzeichnen die Banden. Zahlen geben die Nummer der biologischen Replikate an.

3.3.2.3 Untersuchungen zur Oberflächenlokalisation von CaYFP

Da in *C. albicans*-Zellen mit (SS)-CaFbFP-GPI-Fusion keine CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz zu beobachten war, wurde das System zur Oberflächenpräsentation weiter auf generelle Funktion in *C. albicans* untersucht, indem der gut etablierte Fluoreszenzreporter YFP anstelle von 2xCaFbFP eingesetzt wurde. Die hier verwendete Variante (vgl. 3.4) wurde für die Expression in Hefe optimiert und an den Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst (Gerami-Nejad *et al*., 2001).

Zur Konstruktion eines Expressionsstamms wurde das Plasmid pOXY5 analog zu pOXY10 hergestellt (s. 2.5.2), welches somit Ca*YFP* anstelle von 2xCa*FbFP* trägt. Wie zuvor wurden Zellen von *C. albicans* CAF2-1 mit dem Vektor transformiert und anschließend die Fluoreszenz der Transformanden mit Hilfe des Mikroskops analysiert.

Auch diese Zellen wiesen weder auf der Zelloberfläche noch intrazellulär Fluoreszenz nach Anregung im spektralen Bereich von 490-510 nm (grünes Licht) auf (Daten nicht gezeigt). Somit scheint das System zur Oberflächenpräsentation von Proteinen in *C. utilis* ohne weitere Modifikationen in *C. albicans* nicht funktionell zu sein.

3.3.3 Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *S. cerevisiae*

Zur Überprüfung der Fluoreszenz von CaFbFP in Zellkernen von *S. cerevisiae* sollte die Lokalisation in diesem Organell durch Fusion des Proteins an das DNA-bindende Histon H2B aus *S. cerevisiae* erreicht werden. Histon H2B bildet zusammen mit den Histonen H2A, H3 und H4 die Nukleosomen im Zellkern von Hefen, welche der Verpackung der DNA dienen. Ein Nukleosom wird aus zwei Heterotetrameren aufgebaut, welche sich aus H2A-H2B- bzw. H3-H4-Dimeren zusammensetzen und sich dann zu einem Oktamer verbinden (Luger & Richmond, 1998). Um jedes dieser Oktamere wickeln sich 147 bp DNA mit 1,65 Windungen (Luger *et al*., 1997). Der Transport der Histone in den Zellkern wird dabei über Importine vermittelt, welche die Kernlokalisierungssequenzen (NLS) der Histone erkennen und daraufhin den Transport in den Zellkern initiieren (Greiner *et al*., 2004).

In dieser Arbeit sollten Fusionen aus Ca*FbFP* bzw. 2xCa*FbFP* und dem für H2B-kodierenden Gen Sc*HTB1* Plasmid-kodiert exprimiert werden. Hierfür wurde sowohl das einzelne, als auch das verdoppelte CaFbFP-Protein zur Fusion mit dem Histon verwendet.

3.3.3.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern

Zur Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *S. cerevisiae* wurden Fusionen von *HTB1* mit dem einzelnen Ca*FbFP*-Gen sowie der verdoppelten Variante hergestellt. Dazu wurden die Plasmide pIE3-HTB1 und pIE3-2-HTB1 durch homologe Rekombination in dem Uracil-auxotrophen Stamm *S. cerevisiae* THY.AP4 konstruiert (s. 2.5.3). Die konstruierten Plasmide leiten sich von den Vektoren pIE3 (*GAL1p*-Ca*FbFP*) bzw. pIE3-2 (*GAL1p*-2xCa*FbFP*, s. 3.1.1) ab und tragen zusätzlich *HTB1* zwischen *GAL1p* und Ca*FbFP* bzw. 2xCa*FbFP* (Abb. 3.20).

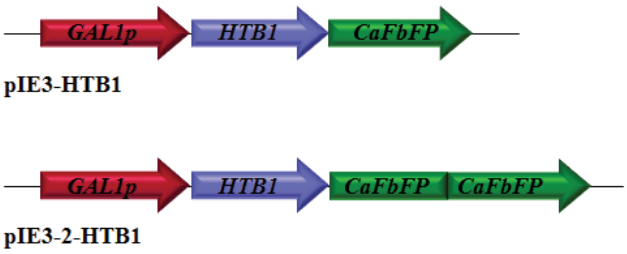


Abb. 3.20: Ausschnitte der Expressionsplasmide pIE3-HTB1 und pIE3-2-HTB1 zur Zellkern-Lokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. Dargestellt ist die Fusion von Ca*FbFP* bzw. 2xCa*FbFP* (Grün) mit dem Gen *HTB1* des Histons H2B (Blau) unter transkriptioneller Kontrolle von *GAL1p* (Rot). Die Plasmide pIE3-HTB1 und pIE3-2-HTB1 basieren auf pIE3 (*GAL1p*-Ca*FbFP*) bzw. pIE3-2 (*GAL1p*-2xCa*FbFP*) (s. 3.1.1).

3.3.3.2 Nachweis der Synthese von H2B-CaFbFP in *S. cerevisiae*

Um eine Aussage über die Synthese und Stabilität der Fusionsproteine H2B-CaFbFP bzw. H2B-2xCaFbFP machen zu können, wurden Transformanden der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1, pIE3-HTB1 bzw. pIE3-2-HTB1 zur Induktion des *GAL1*-Promotors in Galaktose-haltigem Medium ohne Uracil (SGR Ura^-) angezogen und Rohextrakte der exponentiell gewachsenen (30 °C) Zellen hergestellt. Die Proteine in den Extrakten (100 µg) wurden anschließend durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und ein Immunoblot (Anti-EcFbFP) durchgeführt (Abb. 3.21). Die theoretischen

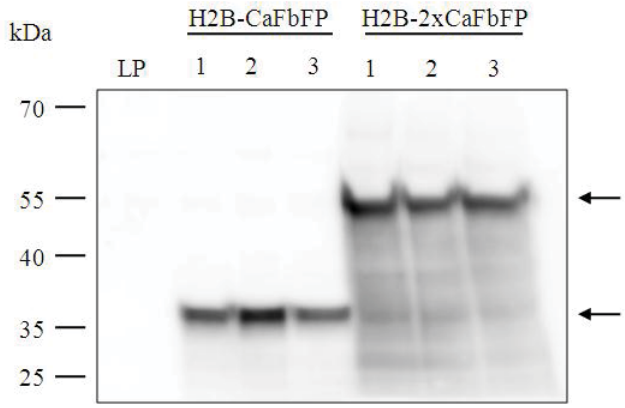


Abb. 3.21: Synthese von CaFbFP-Histonfusionen in *S. cerevisiae*. Immunoblot (Anti-EcFbFP) von Rohextrakten (100 µg) der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Leerplasmid (LP)), pIE3-HTB1 (H2B-CaFbFP) bzw. pIE3-2-HTB1 (H2B-2xCaFbFP) nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid). Pfeile kennzeichnen die CaFbFP-assoziierten Banden. Zahlen bezeichnen die biologischen Replikate.

molekularen Massen von H2B-CaFbFP und H2B-2xCaFbFP liegen bei 29,9 bzw. 45,6 kDa. In den Spuren der Rohextrakte der Stämme mit H2B-CaFbFP-Fusion war ein deutliches Signal auf einer Höhe von etwa 36 kDa zu sehen, und auch in den Spuren der Proben mit H2B-2xCaFbFP konnte eine deutliche Bande verzeichnet werden, welche auf einer Höhe von etwa 54 kDa lief. Somit konnte die Synthese beider Histonfusionen gezeigt werden. In den Spuren von H2B-2xCaFbFP waren außerdem Abbauprodukte der Fusion in Form von diffusen Banden im Bereich unterhalb der Bande bei 54 kDa zu sehen, wobei sich hier ein schwaches Signal auf der Höhe von H2B-CaFbFP abzeichnete. Wie zu erwarten, war keine Bande in der Spur des Kontrollstamms (THY.AP4[p426GAL1]) detektierbar.

3.3.3.3 Fluoreszenzanalysen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*

Die Fusion von CaFbFP bzw. 2xCaFbFP an das Histon H2B sollte eine Lokalisation des Proteins im Zellkern bewirken. Nachdem die Synthese der Fusionsproteine bestätigt wurde, wurden die *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1, pIE3-HTB, pIE3-2-HTB1 sowie ein Stamm mit cytoplasmatisch lokalisiertem CaFbFP (THY.AP4[pIE3]) auf Galaktose-haltigem Agar ohne Uracil (SGR Ura-) ausgestrichen und

für einen Tag bei 30 °C wachsen gelassen. Anschließend wurden Einzelzellen mit etwas ddH_2O auf Objektträger gegeben und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.M1) nach Anregung mit blauem Licht untersucht (Abb. 3.22 A).

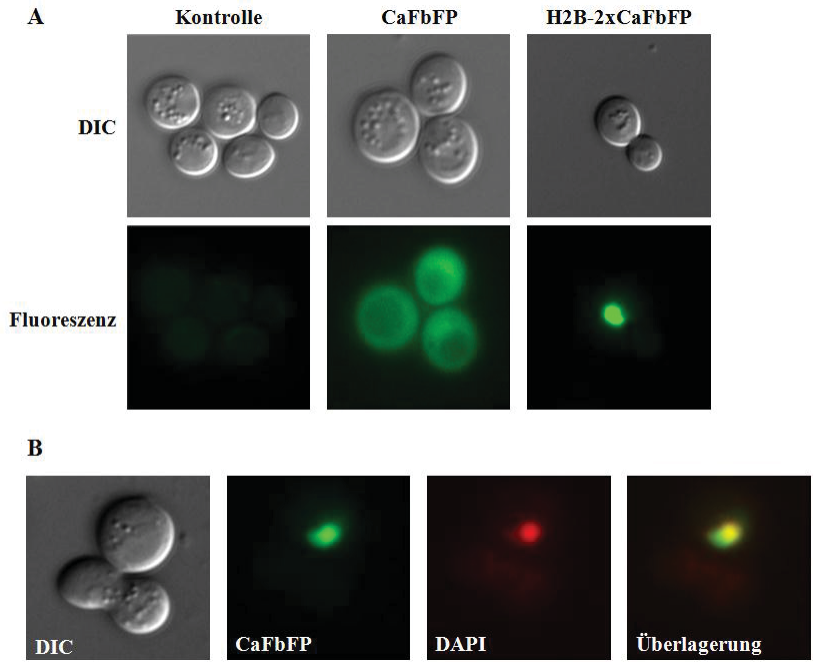


Abb. 3.22 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkernlokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae*. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämmen mit den Plasmiden p426GAL1 (Kontrolle), pIE3 (CaFbFP) und pIE3-2-HTB1 (H2B-2xCaFbFP) nach Bestrahlung mit Weiß- (DIC) bzw. Blaulicht (Fluoreszenz). B: Mikroskopische Aufnahmen DAPI-gefärbter *S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3-2-HTB1] Zellen nach Bestrahlung mit weißem (DIC), blauem (CaFbFP) und UV-Licht (DAPI) sowie eine Überlagerung der Weiß- und Blaulicht-Aufnahmen.

Die Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops zeigten für Zellen des Stamms THY.AP4[pIE3] (CaFbFP) ein deutliches Fluoreszenzsignal, welches sich auf das gesamte Cytoplasma verteilte. Der Stamm THY.AP4[pIE3-2-HTB1] (H2B-2xCaFbFP) wies ebenfalls Fluoreszenz auf, wohingegen sich diese auf den Zellkern beschränkte. Auch bei dem Stamm mit der Fusion aus Histon und dem einzelnen CaFbFP (THY.AP4[pIE3-HTB1]) konnte dies beobachtet werden, wobei das Fluoreszenzsignal etwas schwächer war (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wies der Leerplasmid-tragende Stamm (p426GAL1) wie erwartet keine Fluoreszenz nach Anregung mit Blaulicht auf.
Um zu bestätigen, dass die Fluoreszenz tatsächlich den Kern markiert, wurde eine Färbung der Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI durchgeführt. Bei Überlagerung der Aufnahmen der DAPI- (Anregung mit UV-Licht) und CaFbFP-Fluoreszenz zeigte sich, dass die beiden Signale kolokalisierten (Abb. 3.22 B).

3.3.4 Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *C. albicans*

In Vorarbeiten konnte durch Fusion des *C. albicans*-spezifischen Histons H2B bereits eine Markierung von Zellkernen mit dem Reporterprotein GFP in *C. albicans* erreicht werden (Eichhof, 2008). In dieser Arbeit sollte das Reportersystem mit dem Fluoreszenzprotein CaFbFP anstelle von GFP genutzt werden. So sollte überprüft werden, ob CaFbFP zur Zellkernmarkierung in *C. albicans* verwendet werden kann.

3.3.4.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern

Da die einzelne CaFbFP-Variante in *C. albicans* kaum Fluoreszenz aufwies, wurde die Tandemfusion aus zwei Ca*FbFP*-Genen für die Analysen verwendet. Außerdem sollte die Fusion aus dem Gen für Histon H2B (*HTB1*) und 2xCa*FbFP* unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten *ACT1*- bzw. induzierbaren *TDH3*-Promotors untersucht werden. Dazu wurden die Plasmide pIE1-2-HTB1 (*ACT1p*-Ca*HTB1*-2xCa*FbFP*) und pIE5-2-HTB1 (*TDH3p*-Ca*HTB1*-2xCa*FbFP*) (Abb. 3.23) konstruiert (s. 2.5.3) und der *C. albicans*-Stamm CAI4 wie zuvor mit den Plasmiden transformiert. Die Selektion erfolgte dabei über das Plasmid-kodierte *URA3*-Markergen.

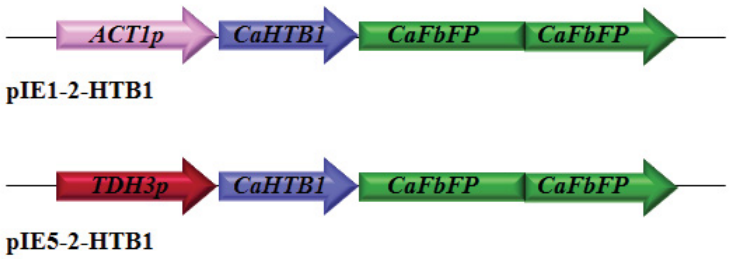


Abb. 3.23: Ausschnitte der Expressionsplasmide zur Lokalisation von CaFbFP im Zellkern von *C. albicans*. pIE1-2-HTB1 und pIE5-2-HTB1 zur Expression von Ca*HTB1*-2xCa*FbFP* unter Kontrolle von *ACT1p* bzw. *TDH3p* in *C. albicans* CAI4. Außerdem auf den Plasmiden enthalten: Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*, *URA3*- und *LEU2*-Marker zur Selektion in Hefe. Ca*ARS* zur autonomen Replikation in Hefe.

3.3.4.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaH2B-2xCaFbFP in *C. albicans*

Zum Nachweis der Synthese und möglichen Modifikationen der H2B-2xCaFbFP-Fusion wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Da bei ersten Fluoreszenzanalysen keine Fluoreszenz für den *C. albicans*-Stamm mit der Fusion unter Kontrolle von *ACT1p* zu sehen war (Daten nicht gezeigt), wurden die folgenden Analysen mit dem *TDH3p*-basierten Konstrukt fortgeführt. Dazu wurden die Stämme *C. albicans* CAI4[pIE5-2] (2xCa*FbFP*), CAI4[pIE5-2-HTB1] (Ca*HTB1*-2xCa*FbFP*) und CAI4[pIE5] (Leerplasmid) unter induzierenden Bedingungen (SD-Medium) angezogen und die Zellen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase aufgeschlossen. Die so hergestellten Rohextrakte

(100 µg) wurden für eine SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und anschließenden Immunoblot (Anti-EcFbFP) verwendet (Abb. 3.24).

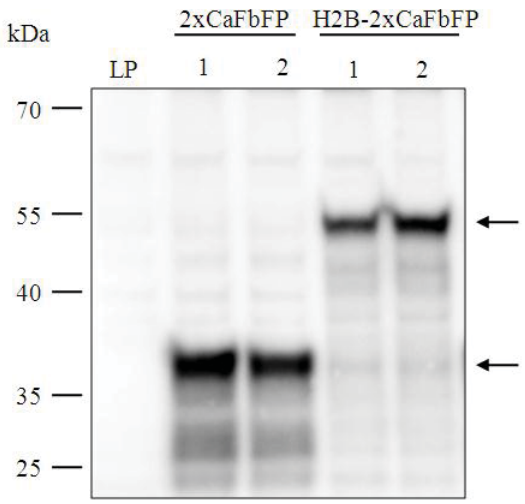


Abb. 3.24: Synthese von H2B-2xCaFbFP in *C. albicans*. Immunoblot (Anti-EcFbFP) von Rohextrakten (100 µg) der *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pIE5 (Leerplasmid, LP), pIE5-2 (2xCaFbFP) und pIE5-2-HTB1 (H2B-2xCaFbFP) nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid). Pfeile kennzeichnen die CaFbFP-repräsentierenden Banden. Zahlen bezeichnen die biologischen Replikate.

Die Ergebnisse des Proteinnachweises zeigten wie erwartet keine Bande in der Spur der Negativ-Kontrolle (LP), wohingegen in den Bahnen der Rohextrakte mit 2xCaFbFP das verdoppelte Fluoreszenzprotein (31,4 kDa) bei etwa 36 kDa nachgewiesen werden konnte. Das Fusionsprotein H2B-2xCaFbFP hat eine theoretische molekulare Masse von 45,9 kDa und war in den Spuren der Stämme als scharfe Bande bei etwa 54 kDa sichtbar, was die Synthese der Fusion bestätigte.

3.3.4.3 Fluoreszenzanalysen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP in *C. albicans*

Um die Funktionalität und Lokalisation der Reporterfusion zu testen, wurden die *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pIE5 (LP) und pIE5-2-HTB1 (*HTB1*-2xCa*FbFP*) auf Glukose-freiem Agar (SGR) ausgestrichen. Nach einem Tag Wachstum bei 30 °C wurde die Fluoreszenz von Einzelzellen mit Hilfe des Mikroskops untersucht, wobei jeweils etwa 10 Transformanden der *HTB1*-2xCa*FbFP*-tragenden Stämme betrachtet wurden. Nach Anregung der Zellen mit blauem Licht konnte kein Unterschied zwischen den Fluoreszenzeigenschaften der Zellen von *C. albicans* CAI4[pIE1-2-HTB1] (*ACT1p-HTB1*-2xCa*FbF*P) und den Zellen des Leerplasmid-tragenden Stamms (CAI4[pDS1044-1]) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließ sich bei Zellen von CAI4[pIE5-2-HTB1] (*TDH3p-HTB1*-2xCa*FbFP*) ein schwaches Fluoreszenzsignal in den Zellkernen erkennen (Daten nicht gezeigt). Um die schnell verbleichende Fluoreszenz fotografisch detektieren zu können, wurde daher ein Spinning-Disc-Konfokalmikroskop

(Cell Observer SD, Zeiss) verwendet. Dabei wurden die Zellen mit einem Argonlaser (λ_{Anr}= 488 nm) angeregt und die Fluoreszenz bei 509 nm mit Hilfe einer sensitiven Kamera detektiert (Abb. 3.25 A). Die mikroskopischen Aufnahmen von Zellen des Leerplasmid-tragenden Stamms *C. albicans* CAI4[pIE5] zeigten, wie erwartet, lediglich eine leichte Hintergrundfluoreszenz. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen mit H2B-2xCaFbFP ein deutliches Fluoreszenzsignal beobachtet werden, welches auf den Zellkern beschränkt zu sein schien. Ergänzend wurde eine DAPI-Färbung der Zellen durchgeführt, welche die Zellkernlokalisation von CaFbFP durch Überlagerung der Aufnahmen nach CaFbFP- bzw. DAPI-Anregung bestätigen konnte (Abb. 3.25 B).

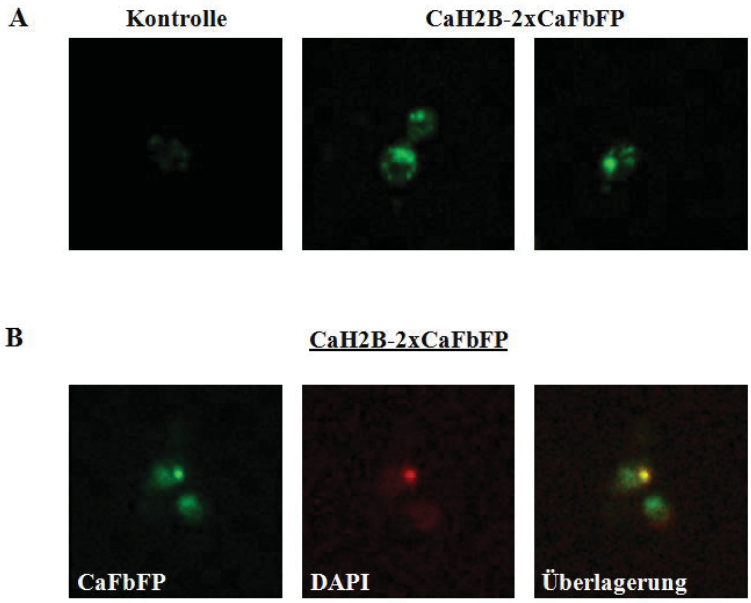


Abb. 3.25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Zellkernlokalisation von CaFbFP in *C. albicans*. Aufnahmen des Spinning-Disc-Konfokalmikroskops (Cell Observer SD) von A: Zellen der *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pIE5 (LP) und pIE5-2-HTB1 (CaH2B-2xCaFbFP) nach Anregung bei 488 nm. B: DAPI-gefärbten Zellen des Stamms *C. albicans* CAI4[pIE5-2-HTB1]. CaFbFP: λ_{Anr}= 488 nm, λ_{Em}= 509 nm; DAPI: λ_{Anr}= 353 nm, λ_{Em}= 465 nm

3.3.5 Markierung von *C. albicans* Zellkernen mittels „green-RNA"-Technologie

Bei einer weiteren Methode zur Markierung von Zellkernen, die auch als „green-RNA"-Technologie bezeichnet wird, bindet das Reporterprotein GFP an spezifische mRNA-Sequenzen. Dabei werden bestimmte RNA-Bereiche von Bakteriophagen wie MS2 oder R17 verwendet, welche die Eigenschaft haben, von dem jeweiligen viralen Hüllprotein (Coatprotein CP) gebunden zu werden. Durch Integration einer solchen Sequenz in die mRNA des zu untersuchenden Organismus und gleichzeitiger Synthese einer Fusion aus Hüllprotein und GFP, kann spezifische mRNA fluoreszenzmarkiert und ein zeitlicher und räumlicher Nachweis spezifischer Genexpression ermöglicht werden. Dabei sollte der

Fluoreszenzreporter je nach mRNA-Lokalisation im Kern und dem Cytoplasma der Zelle lokalisiert sein.
In dieser Arbeit wurde die generelle Funktionalität dieses Systems zur Markierung von Zellkernen in *C. albicans* getestet, welches Analysen spezifischer Genexpression ermöglichen soll. Als Vorbereitung einer späteren Anwendung des Systems mit CaFbFP wurde zunächst das bereits etablierte Reporterprotein GFP verwendet. Ziel der Markierung stellte die mRNA des Transkriptionsfaktors Efg1 dar, welcher als Hauptregulator der Morphogenese in *C. albicans* fungiert (Ernst, 2000).
Der hier verwendete Mechanismus basiert auf dem des *E. coli* Phagen MS2. Dieser besitzt eine 19 nt lange RNA-Sequenz, welche eine spezifische Haarnadelstruktur (stem-loop) ausbildet und so von dem MS2-Hüllprotein erkannt und gebunden werden kann (Witherell *et al*., 1991; Valegard *et al*., 1994). Dem Phagen dient dieser Mechanismus normalerweise dazu, die Translation der viralen Replikase zu regulieren, deren Translationsstartpunkt innerhalb des „stem-loop" liegt (Bernardi & Spahr, 1972; Jansone *et al*., 1979). Durch Bindung von Hüllprotein-Homodimeren an den Startpunkt wird die Translation der mRNA unterbunden und die Bindung weiterer Hüllproteine sowie die Einkapselung der mRNA initiiert (Bernardi & Spahr, 1972; Witherell *et al*., 1991).

3.3.5.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Zellkernlokalisation von CaFbFP mittels green-RNA-Technologie

Zur Fluoreszenz-basierten Markierung der *EFG1* mRNA in *C. albicans* wurde in einem ersten Schritt der Stamm *C. albicans* CAIE3, welcher die CP-Bindesequenz in der 3' untranslatierten Region (UTR) des *EFG1*-Lokus beinhaltet, entwickelt (Abb. 3.26). Dazu wurde das Plasmid pIE10 wie unter 2.5.3 beschrieben konstruiert und der Adenin- und Uridin-auxotrophe *C. albicans* Stamm CAI8 mit dem Vektor transformiert. Das Plasmid enthält neben einer Ampicillinresistenz ein Uracil-Markergen (*URA3*) sowie 723 bp des 3'-Bereichs des *EFG1-ORF*s mit 1 kb *EFG1*-3' UTR. Über Homologie des *EFG1*-Fragments wurde der Vektor somit in den *EFG1*-Lokus integriert. Die 3'UTR in pIE10 enthielt dabei zweimal aufeinanderfolgend die DNA-Sequenz der MS2-CP-Bindestelle. Nach selektivem Wachstum auf Adenin-haltigem SD-Agar wurden einige Transformanden mit dem zirkulären Vektor pMS2CP-GFP/ADE transformiert, so dass eine Plasmid-kodierte Expression der Fusion aus *GFP* und dem Gen des viralen MS2-Hüllproteins (MS2CP) unter transkriptioneller Kontrolle des induzierbaren *PCK1*-Promoters ermöglicht wurde (Abb. 3.26). *PCK1* kodiert für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, welches eine Rolle bei der Glukoneogenese spielt, wodurch der *PCK1*-Promotor durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert und durch Zugabe glukoneogenetischer Kohlenstoffquellen wie Galaktose induziert wird (Leuker *et al*., 1997). Parallel wurde ein Referenzstamm durch Transformation von *C. albicans* CAI8 mit dem Plasmid pMS2CP-GFP/ADE hergestellt. Der Erfolg beider Transformationen wurde anschließend durch Fluoreszenzanalysen überprüft.
Im Folgenden werden die Transformanden CAIE3-GFP (CAIE3[pMS2CP-GFP/ADE]) bzw. der Kontrollstamm CAI8-GFP (CAI8[pMS2CP-GFP/ADE]) genannt.

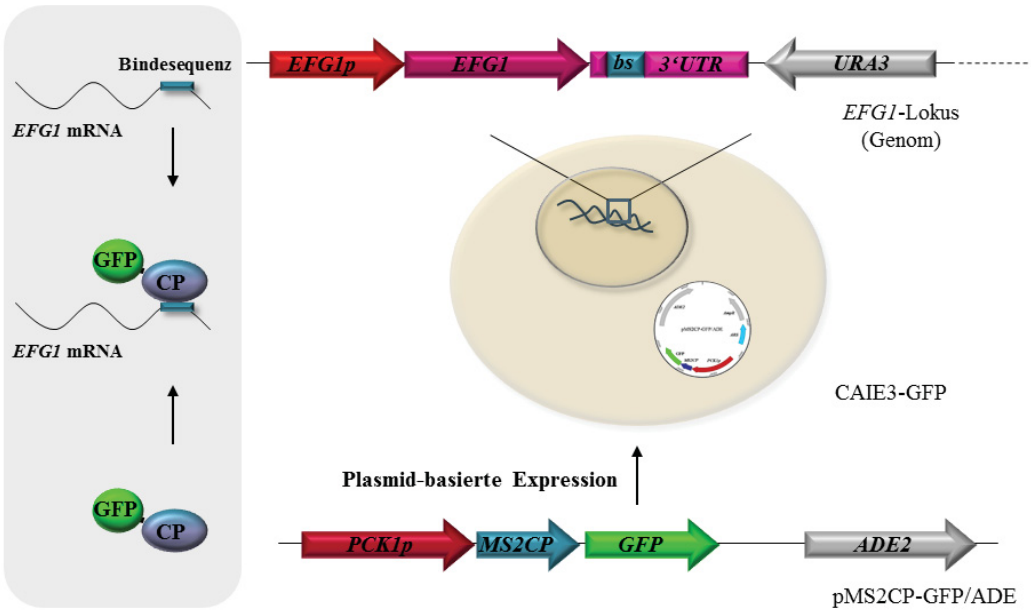


Abb. 3.26: Schema zur Konstruktion von *C. albicans* CAIE3-GFP. Links: Schematische Darstellung des „Green-RNA"-Mechanismus. In Anwesenheit des GFP-markierten MS2-Hüllproteins (CP) bindet dieses eine spezifische virale RNA-Sequenz (Bindesequenz, bs), welche in die mRNA von *EFG1* integriert wurde. Rechts: Konstruktion des *C. albicans*-Stamms CAIE3-GFP. Der Stamm *C. albicans* CAI8 (Δ*ura3*, Δ*ade2*) wurde mit dem Plasmid pIE10 transformiert, so dass es durch Homologie zu *EFG1* zur Integration des Vektors in den *EFG1*-Lokus kommt. Transformanden wurden anschließend zur Plasmid-basierten Expression von *MS2CP-GFP* mit dem Vektor pMS2CP-GFP/ADE transformiert, wodurch der *C. albicans*-Stamm CAIE3-GFP entstand.

3.3.5.2 Fluoreszenzanalysen zur mRNA-Markierung in *C. albicans*

Um die Funktionalität der mRNA-Markierung in *C. albicans* zu überprüfen, wurden der Stamm *C. albicans* CAIE3-GFP sowie die Kontrollstämme CAI8-GFP und der wildtypische Stamm CAF2-1 auf Glukose-freiem SGR- bzw. SGR-Agar mit Uridin (CAI8-GFP) ausgestrichen und für einen Tag bei 30 °C wachsen gelassen. Anschließend wurden jeweils einige Zellen der Platten entnommen und auf Objektträgern fluoreszenz-mikroskopisch untersucht (Abb. 3.27). Die Aufnahmen des Mikroskops zeigen für Zellen des Kontrollstamms CAF2-1 wie erwartet nur ein schwaches Hintergrundsignal nach Blaulichtbestrahlung. Für *MS2CP-GFP*-exprimierende Transformanden (CAI8-GFP) konnte ein Fluoreszenzsignal, welches sich gleichmäßig auf das Cytoplasma der Zelle verteilt, detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz bei Zellen des Stamms CAIE3-GFP mit zusätzlicher Hüllprotein-Bindesequenz im *EFG1*-3'UTR auf den Zellkern beschränkt und zeigt somit, dass das System zur Fluoreszenzmarkierung von Zellkernen in *C. albicans* verwendet werden kann. In weiterführenden Arbeiten könnte somit die Anwendung von CaFbFP anstelle GFP untersucht werden

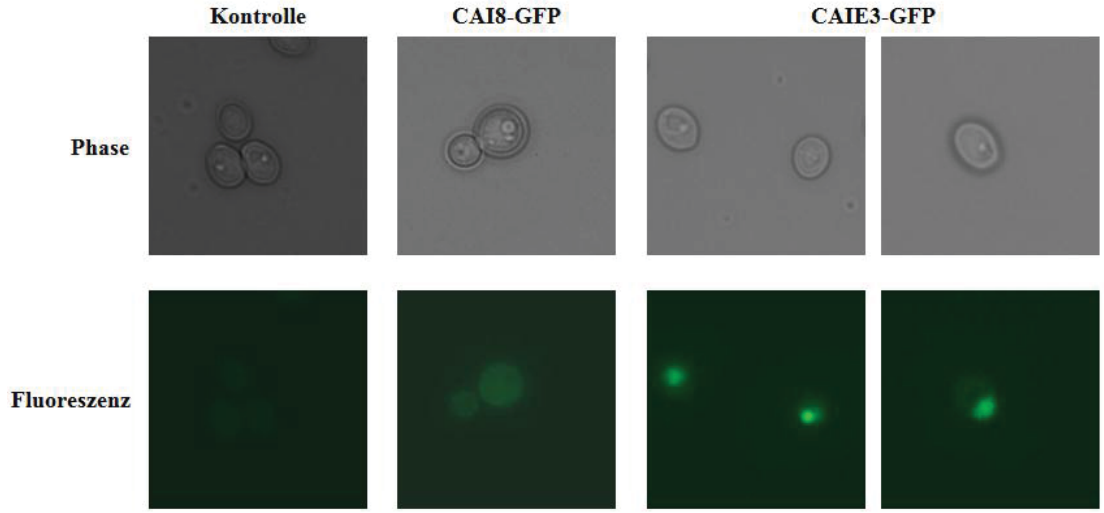


Abb. 3.27: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkernmarkierung mittels „green-RNA"-Technologie in *C. albicans*. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen von *C. albicans* CAF2-1 (Kontrolle), CAI8-GFP (*MS2CP-GFP*) und CAIE3-GFP (*MS2CP-GFP*, MS2CP-bs in *EFG1*-3'UTR) nach Bestrahlung mit weißem Licht (Phase) bzw. Blaulichtanregung (Fluoreszenz). Die Zellen wurden zuvor für einen Tag bei 30 °C auf SGR- bzw. SGR+Uri-Agar (CAI8-GFP) angezogen.

3.4 Anwendung von CaFbFP als Biosensor

Potzkei *et al.* entwickelten 2012 den Fluoreszenz-basierten Biosensor FluBO zur Messung intrazellulärer Sauerstoffkonzentrationen in *E. coli*. Dieser FRET-basierte Sensor besteht aus einer Fusion der Fluoreszenzproteine EcFbFP und YFP, welche unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften in An- und Abwesenheit von Sauerstoff aufweisen. Die Reifung von GFP und Farbvarianten wie YFP ist abhängig von der Verfügbarkeit molekularen Sauerstoffs, so dass unter anaeroben Bedingungen keine Fluoreszenz detektiert werden kann und diese auch unter hypoxischen Bedingungen eingeschränkt ist (Tsien, 1998; Coralli *et al*., 2001; Drepper *et al*., 2010). Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz von FbFP-Varianten sauerstoffunabhängig (Drepper *et al*., 2007; Tielker *et al*., 2009).
Die beiden Proteine werden durch eine kurze Verbindungssequenz stetig in räumlicher Nähe gehalten, so dass eine Energieübertragung ermöglicht wird. Dabei fungiert EcFbFP als Donor- und YFP als Akzeptorchromophor. Für *E. coli* konnten Potzkei *et al*. (2012) nachweisen, dass die beiden Proteine ein funktionelles FRET-Paar darstellen und anhand des Verhältnisses von FbFP- zu YFP-vermittelter Fluoreszenz intrazelluläre Sauerstoffkonzentrationen messen.
Ein solcher genetisch kodierter Sauerstoffsensor stellt auch für die Anwendung in eukaryotischen Systemen ein sehr interessantes molekularbiologisches Werkzeug dar, welches in dieser Form bisher nicht existiert. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines Sauerstoffsensors für die Verwendung in Hefezellen. Dabei soll das System, basierend auf der Konstruktion von FluBO, in *S. cerevisiae* und *C. albicans* getestet werden.

3.4.1 Anwendung von CaFbFP als Biosensor in *S. cerevisiae*

Zur Konstruktion eines Sauerstoffsensors bedurfte es zunächst der Herstellung verschiedener Plasmide zur optimalen Expression einer *YFP-FbFP*-Fusion in Hefe. Da die Fusion später auch in *C. albicans* angewendet werden sollte, wurde eine *YFP*-Variante verwendet, welche für die Expression in Hefe und speziell in *C. albicans* optimiert wurde (Gerami-Nejad *et al*., 2001) (im Folgenden „Ca*YFP*“ genannt). Außerdem wurde anstelle von *EcFbFP* das kodonoptimierte Ca*FbFP* genutzt (Tielker *et al*., 2009). Das in dieser Arbeit konstruierte FRET-System ist in Abbildung 3.28 A schematisch dargestellt.

3.4.1.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Expression von *YFP-FbFP*

Zur Expression von Ca*YFP*-Ca*FbFP* in *S. cerevisiae* wurde das Plasmid pOXY2 durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* THY.AP4 konstruiert (s. 2.5.4), wobei die Selektion der Transformanden über das Plasmid-kodierte *URA3*-Gen erfolgte. Der Vektor pOXY2 unterscheidet sich von dem Plasmid pIE3 (*GAL1p*-Ca*FbFP*) durch Integration einer Ca*YFP*-Variante zwischen *GAL1p* und Ca*FbFP* (Abb 3.28 B). Zusätzlich enthält die Fusion eine 42 bp lange Verbindungssequenz zwischen CaFbFP und CaYFP, welche auch bei der Konstruktion des prokaryotischen FluBO verwendet wurde und eine Schnittstelle für die Protease Thrombin enthält (Potzkei *et al*., 2012). In dieser Arbeit wurde die Verbindungssequenz an den *C. albicans* Kodongebrauch angepasst, indem anstelle des enthaltenen CUG- ein UUG-Kodon eingebaut wurde (Abb. 3.28 B). Die vollständige Sequenz der Fusion ist in 9.1 (Anhang) gezeigt.

Als Referenz wurde analog zu pOXY2 das Plasmid pOXY1 zur Expression von Ca*YFP* mit Verbindungssequenz unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors hergestellt (s. 2.5.4).

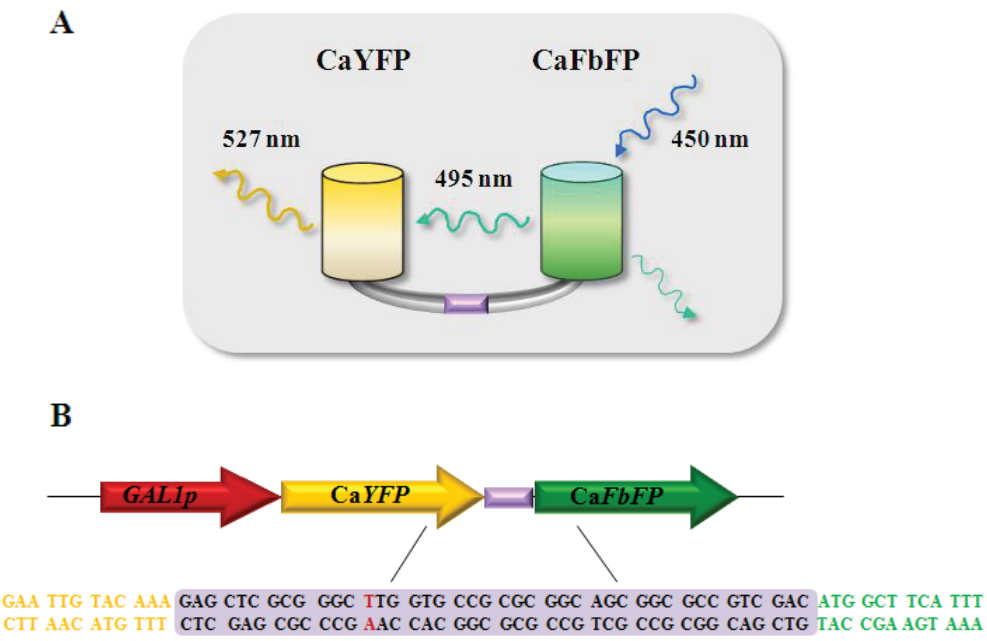


Abb. 3.28: Schema zum FRET-basierten Biosensor in Hefe. A: Schematische Darstellung des FRET-basierten Sauerstoffsensors zur Anwendung in Hefe. Theorie: CaFbFP wird mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und emittiert Licht bei 495 nm. Die Energie soll zur Anregung von CaYFP genutzt werden. Das Emissionsmaximum von CaYFP liegt bei 527 nm. CaYFP und CaFbFP werden durch eine kurze Verbindungssequenz (Violett) mit Thrombin-Schnittstelle in räumlicher Nähe zueinander gehalten. B: Schematischer Ausschnitt des Plasmids pOXY2 zur Expression der Ca*YFP*-Ca*FbFP*-Fusion unter Kontrolle von *GAL1p* und Ausschnitt der DNA-Sequenz: Gelb: 5‘-Ende von CaYFP; Violett: Verbindungsequenz mit Basenaustausch (Rot) zur Kodonoptimierung; Grün: 3‘-Ende von CaFbFP.

3.4.1.2 Nachweis der Proteinsynthese von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae*

Zum Nachweis der Expression und Synthese des Fusionsproteins wurden Transformanden der *S. cerevisiae*-Stämme THY.AP4 mit den Plasmiden p426GAL1 (LP), pOXY1 (CaYFP), pIE3 (CaFbFP) bzw. pOXY2 (CaYFP-CaFbFP) wie unter 3.1.2 beschrieben unter Bedingungen zur Induktion des *GAL1*-Promotors angezogen und Rohextrakte der Zellen hergestellt. Je 100 µg der Extrakte wurden anschließend in zweifacher Ausführung zur Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid) und darauffolgendem Immunoblot verwendet, wobei zum einen ein Antikörper gegen GFP-Varianten (Anti-YFP) und zum anderen zum Nachweis von FbFP (Anti-FbFP) gewählt wurde (Abb. 3.29). Die Proben von *S. cerevisiae* THY.AP4[pIE3] (CaFbFP) und THY.AP4[pOXY1] (CaYFP) dienten bei dem Nachweis als Positivkontrollen der jeweiligen Blots. So konnte bei Verwendung des Anti-FbFP-Antikörpers in der Spur der CaFbFP-haltigen Rohextrakte eine Bande bei etwa 16 kDa verzeichnet werden, die das

Fluoreszenzprotein repräsentiert. Auf derselben Membran waren sowohl in der Spur der Leerplasmidkontrolle als auch des Rohextrakts mit CaYFP wie erwartet keine Signale zu sehen. Die theoretische molekulare Masse des verwendeten CaYFP beträgt 30,6 kDa und konnte in dem Anti-YFP-Blot auf einer Höhe von etwa 35 kDa detektiert werden. Auch hier konnte erwartungsgemäß kein Signal in der Spur von THY.AP4[p426GAL1] (LP) verzeichnet werden, und auch die Bahn der Rohextrakte mit CaFbFP zeigte keine Bande.
Das CaYFP-CaFbFP-Fusionsprotein wurde bei beiden Nachweisen auf einer Höhe von 43,9 kDa erwartet. Für alle Transformanden von THY.AP4[pOXY2] (CaYFP-CaFbFP) konnte auf beiden Membranen eine Bande bei etwa 51 kDa detektiert werden, die die Synthese der Fusion zeigte. Zusätzlich wiesen beide Blots diffuse Banden im niedermolekularen Bereich dieser Spuren auf, welche auf den Abbau der Fusion hindeuten. Dabei zeichnete sich in dem FbFP-Blot eine Bande auf Höhe des einzelnen CaFbFP-Proteins ab. Somit konnte die Synthese von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* gezeigt werden, wobei die Fusion teilweise abgebaut wird.

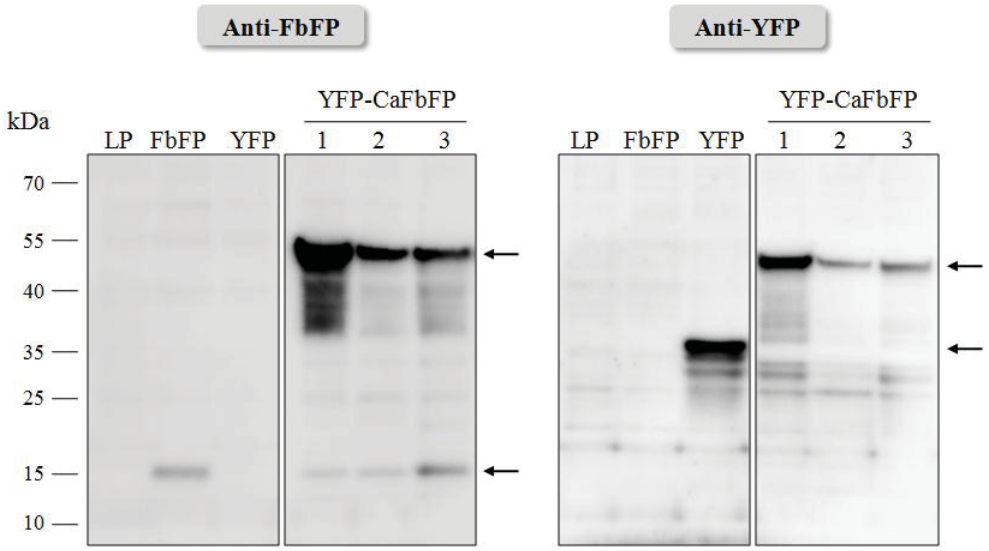


Abb. 3.29: Synthesenachweis von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae*. Immunoblot von Rohextrakten (100 µg) der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (LP), pIE3 (Ca*FbFP*), pOXY1 (Ca*YFP*) und pOXY2 (Ca*YFP*-Ca*FbFP*) nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid). Links: Membran nach Behandlung mit Anti-EcFbFP Antikörper. Rechts: Anti-GFP-Varianten. Pfeile kennzeichnen die Banden. Zahlen bezeichnen die biologischen Replikate.

3.4.1.3 Fluoreszenzanalysen Ca*YFP*-Ca*FbFP*-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen

Die Voraussetzung zur Verwendung von CaYFP-CaFbFP als Fluoreszenz-basiertem Sauerstoffsensor ist, dass die Fluoreszenz beider Proteine durch die Fusion nicht gestört wird. Nachdem die Synthese von CaYFP-CaFbFP durch Western Blot-Analysen erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde die Fluoreszenz beider Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden Zellen des Stamms THY.AP4 mit den

Plasmiden pIE3 (CaFbFP) und pOXY2 (CaYFP-CaFbFP) auf Galaktose-haltigem Agar (SGR Ura$^-$) ausgestrichen und unter normoxischen und anoxischen Bedingungen bei 30 °C für ein (Normoxie) bzw. drei Tage (Anoxie) wachsen gelassen. Anschließend wurden Kolonien nach Bestrahlung mit blauem Licht zur Anregung von CaFbFP bzw. grünem zur Anregung von CaYFP analysiert (Abb. 3.30). Dabei ist zu beachten, dass Ca*YFP*-tragende Zellen auch nach Anregung mit blauem Licht ein schwaches Fluoreszenzsignal abgeben (Daten nicht gezeigt).

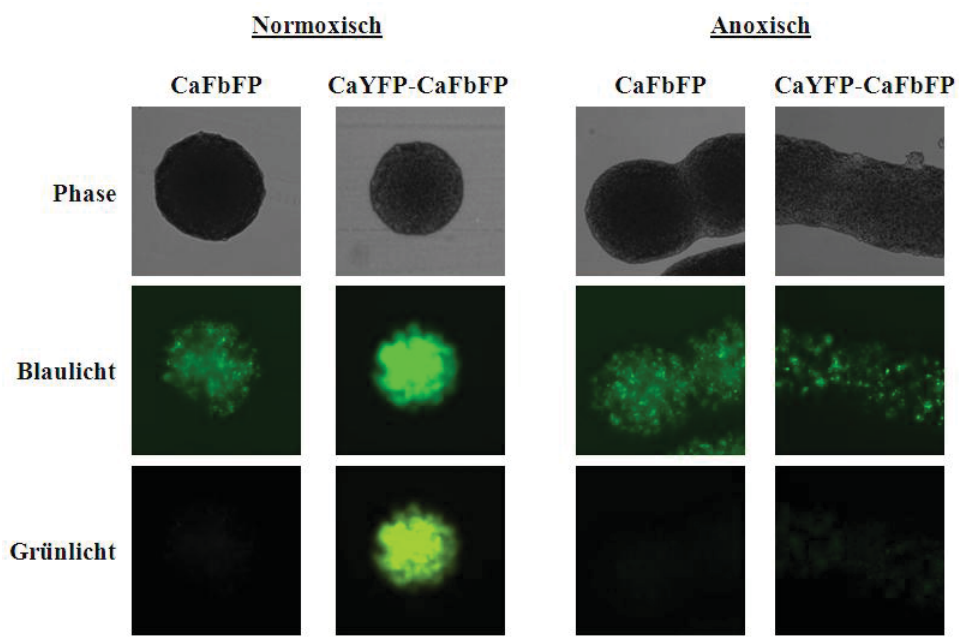


Abb. 3.30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kolonien verschiedener *S. cereviaisae*-Stämme nach Wachstum unter Normoxie oder Anoxie. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kolonien der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden pIE3 (CaFbFP) oder pOXY2 (CaYFP-CaFbFP) bei Weißlicht (Phase) bzw. Blaulicht- oder Grünlichtanregung. Das Wachstum erfolgte unter normoxischen oder anoxischen Bedingungen für 1 (Normoxie) bzw. 3 (Anoxie) Tage auf SGR Ura$^-$-Agar bei 30 °C.

Bei Betrachtung der Aufnahmen ist erneut zu erkennen, dass Kolonien mit CaFbFP sowohl unter normoxischen als auch unter anoxischen Bedingungen nach Anregung mit blauem Licht Fluoreszenz emittieren. Auch für Kolonien des Stamms mit CaYFP-CaFbFP konnte dies gezeigt werden, wobei die Fluoreszenz nach Wachstum unter Normoxie deutlich stärker war als nach Wachstum ohne Sauerstoff. Hier wurde sogar eine niedrigere Belichtungszeit (1/4) als bei allen anderen Aufnahmen gewählt. Unter anoxischen Bedingen zeigte dieser Stamm ein schwächeres Signal, dessen Intensität vergleichbar mit der normoxisch und anoxisch gewachsener Kolonien mit CaFbFP war. Da YFP unter anoxischen Bedingungen nicht fluoresziert, konnte folglich die Funktionalität von CaFbFP in der Fusion bestätigt werden. Durch Bestrahlung der Kolonien beider Stämme mit grünem Licht konnten CaFbFP-tragende Kolonien wie erwartet nicht angeregt werden und zeigten unter beiden Wachstumsbedingungen keine Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu

wiesen normoxisch gewachsene Kolonien mit dem Fusionsprotein nach Bestrahlung mit grünem Licht, genau wie bei Anregung mit Blaulicht, ein starkes Signal auf. Diese Beobachtung zeigte, dass auch die Fluoreszenzfähigkeit von CaYFP durch die Fusion nicht beeinflusst wird. Nach Wachstum des Ca*YFP*-Ca*FbFP*-exprimierenden Stamms unter anoxischen Bedingungen konnte nach Grünlichtanregung, aufgrund der Sauerstoff-abhängigen Fluoreszenz von YFP, so gut wie kein Signal detektiert werden.

3.4.1.4 Nachweis von FRET bei CaYFP-CaFbFP

Um zu überprüfen, ob ein Energietransfer zwischen CaFbFP und CaYFP stattfindet und somit bei Anregung von CaFbFP CaYFP-vermittelte Fluoreszenz detektiert werden kann, wurden quantitative Fluoreszenzanalysen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden die *S. cerevisiae*-Stämme THY.AP4[p426GAL1] (Leerplasmid), THY.AP4[pIE3] (Ca*FbFP*), THY.AP4[pOXY1] (Ca*YFP*) und THY.AP4[pOXY2] (Ca*YFP*-Ca*FbFP*) wie zuvor (3.4.1.2) bis zum exponentiellen Wachstum angezogen und drei technische Replikate in PBS zur Aufnahme von Emissionsspektren mittels Fluorometer (Tecan infinite M200, Tecan Group Ltd.) verwendet. Die Anregungs-wellenlänge (380 nm) wurde dabei so gewählt, dass nur FbFP, jedoch nicht YFP angeregt wird (Potzkei *et al*., 2012). In Abbildung 3.31 sind jeweils Mittelwerte relativer Fluoreszenzen dargestellt, wobei die Hintergrundfluoreszenz zuvor subtrahiert wurde. Bei dem Emissionsspektrum Ca*FbFP*-tragender Zellen ist zu sehen, dass die Kurve der relativen Fluoreszenz ab 465 nm zunächst stark ansteigt und mit 303 FE bei 505 nm ihr Maximum erreicht (Abb. 3.31 A). Danach sinkt sie flacher wieder ab, so dass die Emission bei 630 nm wieder im Bereich der Hintergrundemission lag. Bei Zellen mit CaYFP-CaFbFP-Fusion steigt die Kurve deutlich steiler an und erreicht die maximale Fluoreszenz (445 FE) bei einer Emission von 530 nm, was dem Emissionsmaximum von YFP (527 nm) entspricht (Patterson *et al*., 2001). Die emittierte Fluoreszenz liegt hier deutlich höher, als bei der Kurve Ca*FbFP*-exprimierender Zellen. Nach dem steilen Anstieg der Kurve sinkt diese in ähnlicher Weise wieder ab, so dass bei etwa 620 nm keine Fluoreszenz mehr zu verzeichnen war. Die Zellen des Stamms mit CaYFP wiesen nach Anregung bei 380 nm erwartungsgemäß keine Fluoreszenz auf, so dass sich die Kurve wie die des Kontrollstamms mit Leerplasmid verhielt. Durch die Tatsache, dass die Anregung von CaFbFP zur Detektion von CaYFP-spezifischer Fluoreszenz führte, konnte ein Energietransfer zwischen den beiden Proteinen gezeigt werden. Dies konnte ebenfalls bei Analyse von CaYFP-CaFbFP-haltigen Rohextrakten von *S. cerevisiae* gezeigt werden (Abb. 9.2). Aufgrund der Funktionalität des FRET-Systems wird die CaYFP-CaFbFP-Fusion im Folgenden als YFOS („Yeast Fluorescent Oxygen Sensor“) bezeichnet.

Zum Nachweis der generellen Fluoreszenzfähigkeit der CaYFP-tragenden Zellen wurde ergänzend zu den Emissionsspektren eine Fluoreszenzmessung durchgeführt, welche auf die Fluoreszenzmaxima von YFP abgestimmt war (λ_{Anr}= 500 nm, λ_{Em}= 530 nm) (Abb. 3 B). Dabei wurden die Werte des Kontrollstamms subtrahiert. Die Untersuchung zeigte für die Ca*YFP*- und Ca*YFP*-Ca*FbFP*-exprimierenden Zellen erwartungsgemäß deutliche Fluoreszenzsignale (1.621,8 bzw. 3.941,5 FE), wodurch die Fluoreszenzfähigkeit von CaYFP bestätigt werden konnte.

Zusätzlich zur Messung ganzer Zellen wurden quantitative Fluoreszenzanalysen von Rohextrakten der Zellen durchgeführt, welche vergleichbare Kurvenverläufe der Emissionsspektren aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

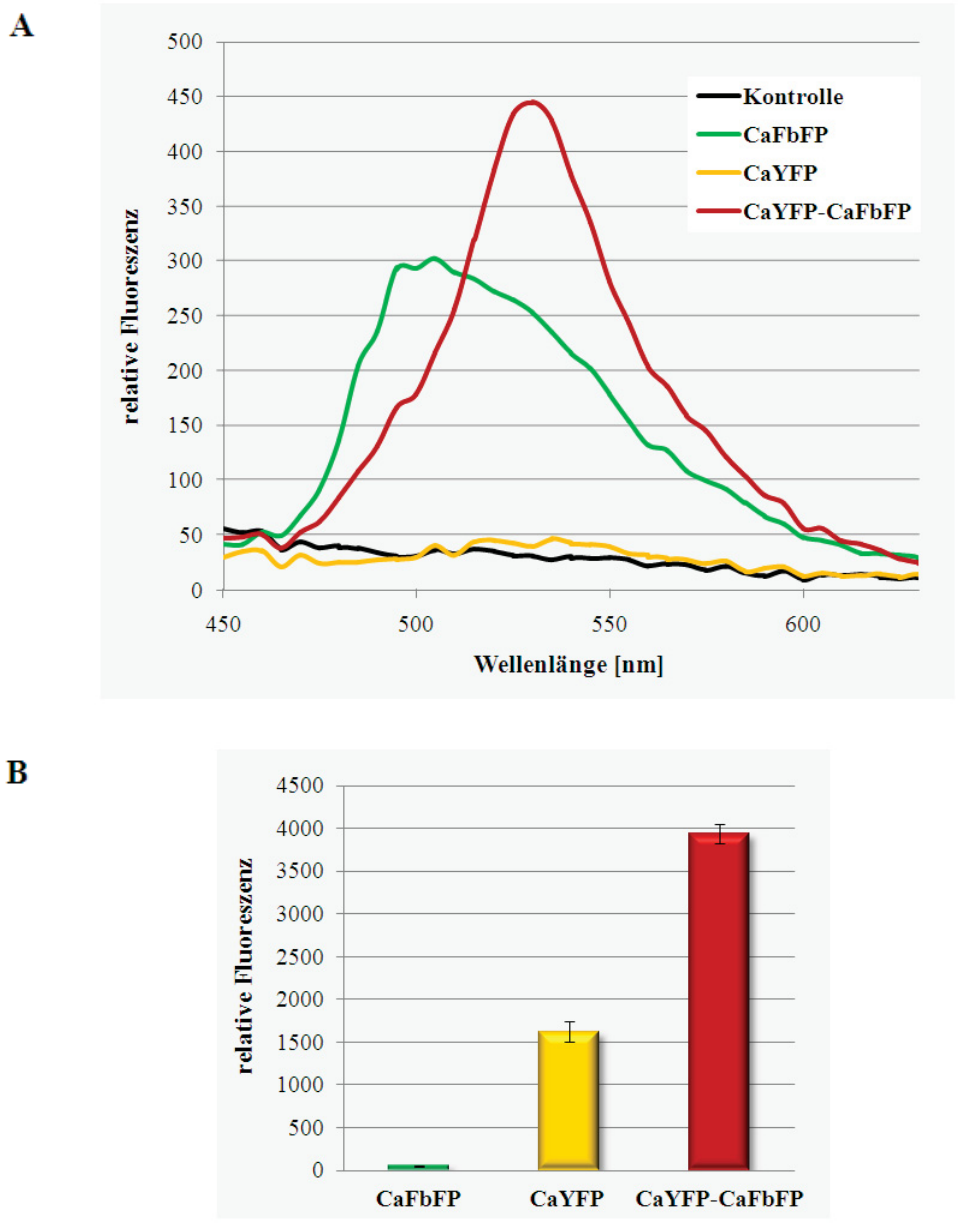


Abb. 3.31: Fluoreszenzanalysen von Zellen verschiedener *S. cerevisiae*-Stämme unter normoxischen Bedingungen. Fluoreszenzanalysen ganzer Zellen der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Kontrolle), pIE3 (CaFbFP), pOXY1 (CaYFP) und pOXY2 (CaYFP-CaFbFP). Anzucht der Zellen unter normoxischen Bedingungen bei 30 °C in SGR Ura$^-$-Medium bis zum exponentiellen Wachstum. Vor der Messung (Fluorometer: Tecan infinite M200) wurden die Zellen in PBS gewaschen. A: Emissionsspektren der Zellen (λ_{Anr}= 380 nm) abzüglich der Hintergrundfluoreszenz. B: Relative Fluoreszenz der Zellen (λ_{Anr}= 500 nm, λ_{Em}= 530 nm) abzüglich der Emission des Kontrollstamms. Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate).

3.4.1.5 Fluoreszenzanalysen von YFOS bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen

Die YFOS-Fusion aus CaYFP und CaFbFP sollte als Biosensor für Sauerstoff in Hefezellen verwendet werden. Nachdem die Fluoreszenz der Fusion sowie die Energieübertragung von CaFbFP auf CaYFP in *S. cerevisiae* prinzipiell gezeigt werden konnten, wurde im Folgenden das Fluoreszenzverhalten bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Stämme in dem Hypoxie-Inkubator (INVIVO$_2$ 200, Ruskinn) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (0,2 %, 4 %, 10 %) bis zur exponentiellen Phase wachsen gelassen (30 °C) und die Fluoreszenz der Zellen, analog zu den Analysen normoxisch gewachsener Zellen, untersucht (Abb. 3.32). Die CO_2-Konzentration wurde während des Wachstums auf den minimal möglichen Wert von 0,1 % eingestellt, um an normoxische Bedingungen der Luft (0,039 % CO_2) anzugleichen.

In Abbildung 3.32 A-C sind Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheiten aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate) nach Anregung der Zellen bei 380 nm graphisch dargestellt. Dabei wurden die Messungen der Zellen bei den einzelnen Sauerstoffkonzentrationen unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen bei 0,2, 4 und 10 % Sauerstoff zeigten für Zellen mit CaFbFP einen ähnlichen Kurvenverlauf wie unter normoxischen Bedingungen (Vgl. 3.4.1.4) und erreichten die jeweiligen Maxima bei 500 (0,2 und 4 % O_2) bzw. 505 nm (10 % O_2).

Die Kurvenverläufe der Emissionsspektren von YFOS-bildenden Zellen variierten dagegen bei den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. So unterscheidet sich das Spektrum bei 0,2 % O_2 deutlich von dem unter Normoxie aufgenommenen, indem die Kurve fast identisch zu der von Zellen mit CaFbFP verläuft und ein Maximum bei 500 nm (384 FE) aufweist. Bei 4 % O_2 zeigt die Kurve der Zellen mit dem Fusionsprotein zwischen 495 nm und 530 nm ein Plateau, wobei die höchste Fluoreszenz bei 500 nm (395 FE) verzeichnet wurde. Das Spektrum von YFOS bei einer Sauerstoffkonzentration von 10 % umfasst ebenso Charakteristika der Spektren CaFbFP- wie auch YFOS-bildender Zellen nach normoxischem Wachstum und erreicht bei 530 nm (306,7 FE) das Maximum. Bei den Zellen mit CaYFP konnte wie erwartet auch unter hypoxischen Bedingungen keine Fluoreszenz detektiert werden. Zusammen mit der Messung der Emission unter normoxischen Bedingungen (20,95 % O_2) zeigte sich, dass sich die Emissionsspektren der Zellen mit YFOS mit steigender Sauerstoffkonzentration in den höherwelligen Bereich verschoben. So wurde immer weniger CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz bei 500-505 nm gemessen, wohingegen die CaYFP-vermittelte Fluoreszenz bei 530 nm anstieg.

Setzt man das Verhältnis der Emission bei 530 nm (CaYFP-Fluoreszenz) zum Mittelwert der Emissionen bei 500 und 505 nm (CaFbFP-Fluoreszenz) [Em530/$\bar{x}$(Em500, Em505)] in Abhängigkeit der O_2-Konzentration, so ist zu erkennen, dass der Quotient mit zunehmender O_2-Konzentration ansteigt (Abb. 3.33). Das Verhältnis der Emissionen bei 530 nm zu der bei 500-505 nm liefert ein indirektes Maß für intrazelluläre Sauerstoffbedingungen, so dass sich anhand der Messpunkte eine Eichgerade erstellen ließ, welche die Bestimmung unbekannter O_2-Konzentrationen in YFOS-synthetisierenden *S. cerevisiae*-Zellen durch die Fluoreszenz ermöglicht.

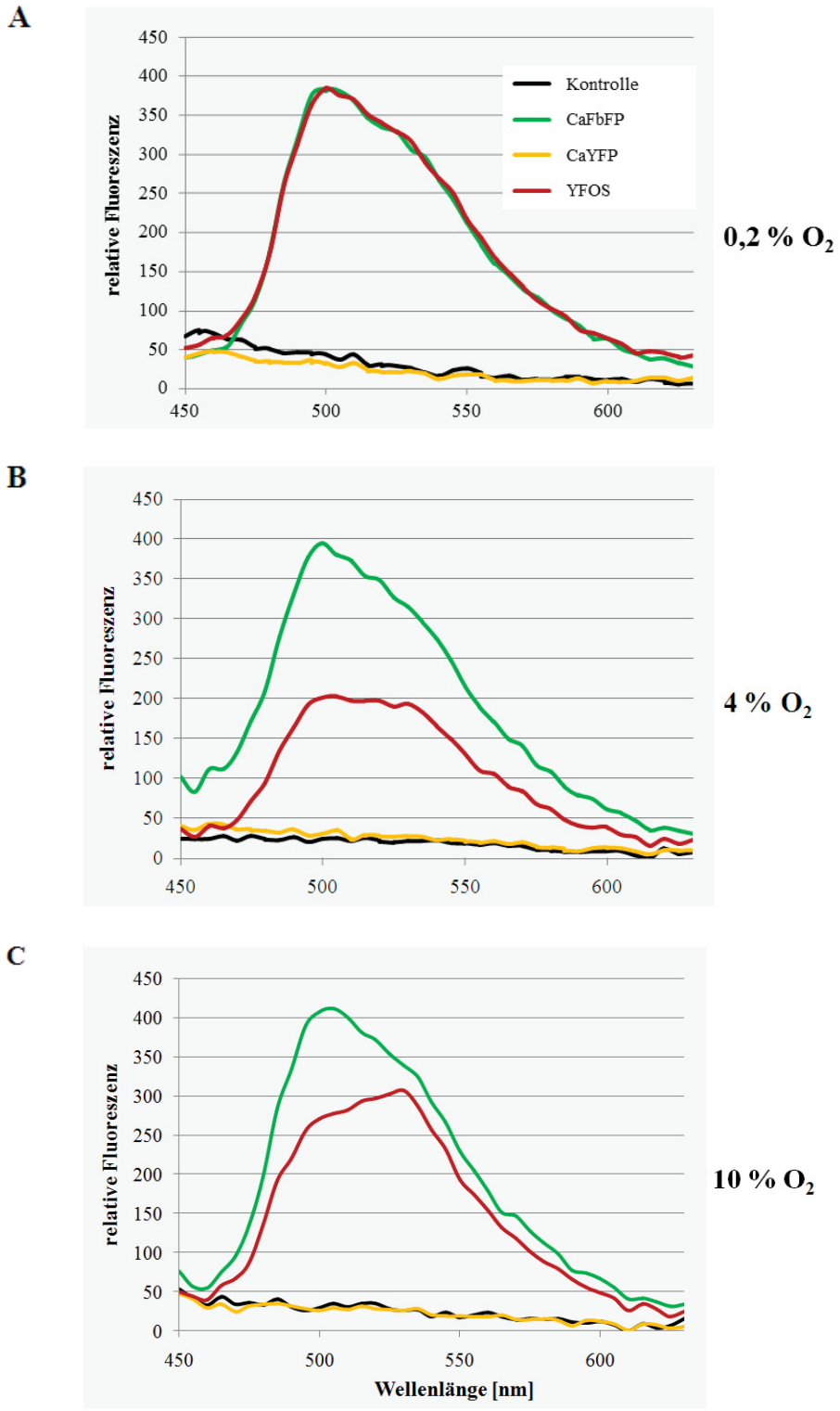


Abb. 3.32 Emissionsspektren YFOS-bildender *S. cerevisiae*-Zellen bei verschiedenen O_2-Konzentrationen. Emissionsspektren (λ_{Anr}= 380 nm) ganzer Zellen der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Kontrolle), pIE3 (CaFbFP), pOXY1 (CaYFP) und pOXY2 (CaYFP-CaFbFP, YFOS). Anzucht der Zellen im Hypoxie-Inkubator bei 0,1 % CO_2 und 0,2 (A), 4 (B) oder 10 % O_2 (C) bei 30 °C in SGR Ura$^-$-Medium bis zum exponentiellen Wachstum. Messung der Zellen in PBS mittels Fluorometer.

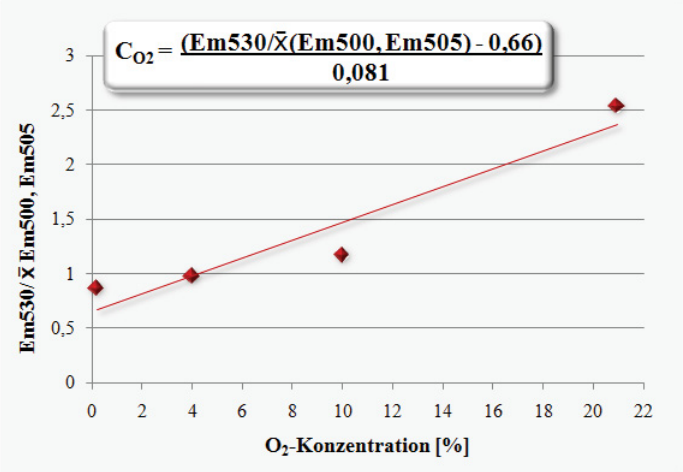


Abb. 3.33: YFOS-Emission zur Bestimmung intrazellulärer O_2-Konzentrationen. Verhältnis der Emission von *S. cerevisiae* THY.AP4[pOXY2] (YFOS) bei 530 nm zu dem Mittelwert der Emissionen bei 500 und 505 nm (λ_{Anr}= 380 nm) in Abhängigkeit der O_2-Konzentration. Durch die Messpunkte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt und anhand der Steigung die Formel zur Bestimmung intrazellulärer O_2-Konzentrationen (C_{O2}) erstellt.

Die generelle Fluoreszenz von Ca*YFP*-tragenden Zellen wurde wie bei den Untersuchungen unter Normoxie analysiert und zeigte, dass die emittierte Fluoreszenz von CaYFP und YFOS mit zunehmender O_2-Konzentration während des Wachstums der Zellen anstieg (Abb. 3.34). Dadurch konnte die generelle Fluoreszenz von CaYFP in den Zellen gezeigt werden Die Werte der Zellen mit Fusionsprotein lagen dabei deutlich über den Emissionswerten von Zellen mit ungebundenem CaYFP.

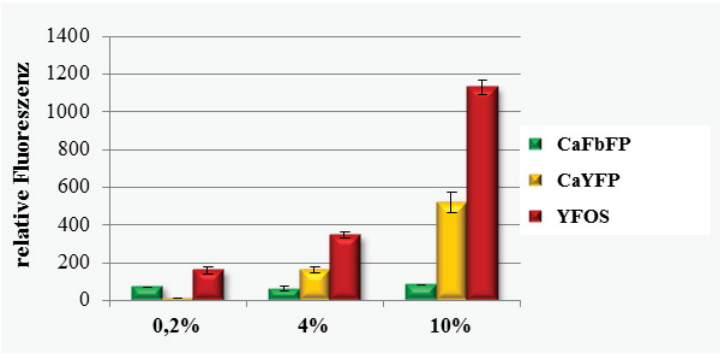


Abb. 3.34: Fluoreszenzanalysen verschiedener *S. cerevisiae*-Stämme bei unterschiedlichen O_2-Konzentrationen. Relative Fluoreszenz der Zellen aus Abb. 3.32 (λ_{Anr}= 500 nm, λ_{Em}= 530 nm). Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate), wobei die Werte des Kontrollstamms subtrahiert wurden.

3.4.2 Anwendung von CaFbFP als Biosensor in *C. albicans*

C. albicans besiedelt als Kommensale und Pathogen viele verschiedene Bereiche des menschlichen Körpers, in denen unterschiedliche Sauerstoffbedingungen herrschen (Ernst & Tielker, 2009). Daher würde die Verwendung eines genetisch kodierten Sauerstoff-sensors auch in diesem Organismus große Vorteile zur weiteren Untersuchung des Pilzes bieten.

Nachdem die generelle Funktion einer CaYFP-CaFbFP-Fusion als Sensor für Sauerstoff in dem Hefemodellorganismus *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, sollte somit im Folgenden die Anwendbarkeit in *C. albicans* getestet werden

3.4.2.1 Herstellung von *C. albicans*-Stämmen zur Expression von Ca*YFP*-Ca*FbFP*

Bei der Konstruktion von Expressionsplasmiden für *C. albicans* wurde sowohl das einfache Ca*FbFP* als auch die Tandemfusion aus zwei Ca*FbFP*-Genen verwendet. Außerdem wurde ein Referenzplasmid mit Ca*YFP* hergestellt (s. 2.5.4). Dabei leiten sich die konstruierten Plasmide pOXY7 (*TDH3p*-Ca*YFP*), pOXY8 (*TDH3p*-Ca*YFP*-Ca*FbFP*) und pOXY9 (*TDH3p*-Ca*YFP*-2xCa*FbFP*) von den Vektoren pIE5, pIE5-1 bzw. pIE5-2 ab (s. 3.2.1) und unterscheiden sich durch die Integration von Ca*YFP* (s. 3.4.1.1) stromabwärts von *TDH3p* (Abb. 3.35). Die Sequenz von CaYFP-2xCaFbFP ist unter 9.2 (Anhang) dargestellt.

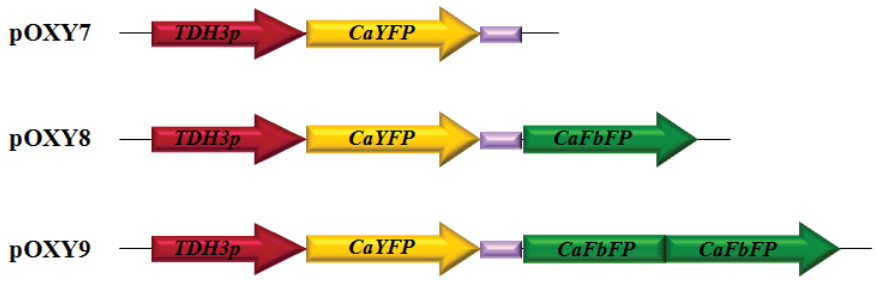


Abb. 3.35: Ausschnitte verschiedener Expressionsplasmide für *C. albicans*. Plasmide zur Expression von Ca*YFP* (pOXY7), Ca*YFP*-Ca*FbFP* (pOXY8) bzw. Ca*YFP*-2xCa*FbFP* (pOXY9) unter Kontrolle des induzierbaren *TDH3p* in *C. albicans*. Violett: Verbindungssequenz (s. 3.4.1.1).

3.4.2.2 Nachweis der Proteinsynthese von YFOS-Varianten in *C. albicans*

Zum Funktionalitätstest von YFOS in *C. albicans* wurde zunächst die Synthese der Fusionen analysiert. Dazu wurden Übernachtkulturen von Transformanden der *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pOXY7, pOXY8 und pOXY9 sowie pIE5 (Leerplasmid), pIE5-1 (Ca*FbFP*) und pIE5-2 (2xCa*FbFP*) zum Beimpfen von Hauptkulturen in Glukose-haltigem SD-Medium verwendet. Die Kulturen wurden bis zu der exponentiellen Phase bei 30 °C unter normoxischen Bedingungen wachsen gelassen, woraufhin der Aufschluss der Zellen erfolgte. Mit den Proteinrohextrakten (100 µg)

wurden analog zum immunologischen Nachweis von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* (s. 3.4.1.2) Immunoblots (Anti-EcFbFP bzw. Anti-YFP) durchgeführt (Abb. 3.36).
Dabei zeigte sich wie erwartet auf beiden Membranen in den Spuren von Rohextrakten des Kontrollstamms (LP) kein Signal. Auch in der Spur von Rohextrakten mit dem einzelnen CaFbFP-Protein konnte keine Bande verzeichnet werden. Im FbFP-Blot wurde hier eine Bande bei 15,7 kDa erwartet, welche wahrscheinlich auf Grund der geringen Proteinmenge nicht detektierbar war. Im Gegensatz dazu konnte auf dieser Membran die doppelte

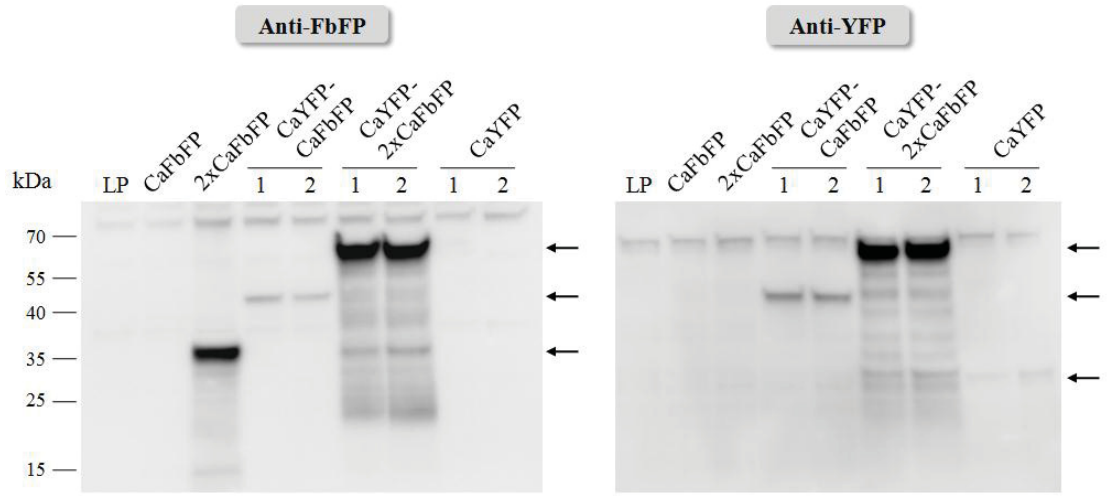


Abb. 3.36: Synthesenachweis von CaYFP-CaFbFP in *C. albicans*. Immunoblot von Rohextrakten (100 µg) der *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pIE5 (LP), pIE5-1 (Ca*FbFP*), pIE5-2 (2xCa*FbFP*), pOXY7 (Ca*YFP*), pOXY8 (Ca*YFP*-Ca*FbFP*) und pOXY9 (Ca*YFP*-2xCa*FbFP*) nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid). Links: Anti-FbFP-Blot. Rechts: Anti-YFP-Blot. Zahlen bezeichnen die biologischen Replikate.

Variante des Fluoreszenzproteins in der Spur mit 2xCaFbFP als deutliches Signal auf einer Höhe von etwa 36 kDa detektiert werden. In beiden Blots wurde in den Spuren CaYFP-CaFbFP- und CaYFP-2xCaFbFP-haltiger Rohextrakte jeweils dasselbe Bandenmuster beobachtet. So konnte das CaYFP-CaFbFP-Fusionsprotein mit einer theoretischen molekularen Masse von 44 kDa auf einer Höhe von etwa 48 kDa nachgewiesen werden, wohingegen CaYFP-2xCaFbFP (60 kDa) bei etwa 67 kDa verzeichnet wurde. Dabei war zu erkennen, dass die Bandenintensität von CaYFP-2xCaFbFP deutlich höher war als die der CaYFP-CaFbFP-Fusion. In den Bahnen der Rohextrakte mit CaYFP-2xCaFbFP ließen sich zudem auf beiden Membranen ein leichter Schmier sowie schwache Banden auf Höhe von 2xCaFbFP (Anti-FbFP-Blot) und CaYFP (Anti-YFP-Blot) verzeichnen, welche auf partielle Spaltung der Fusion hindeuten. In den Bahnen der Rohextrakte Ca*YFP*-exprimierender Zellen konnte in dem Anti-YFP-Blot eine schwache Bande bei etwa 31 kDa detektiert werden, welche in dem FbFP-Blot fehlte. Diese kann somit CaYFP mit einer theoretischen molekularen Masse von 28,3 kDa zugeordnet werden.

Somit konnte die Synthese von CaYFP, CaYFP-CaFbFP und CaYFP-2xCaFbFP in *C. albicans* sichergestellt werden, wobei die Proteinmengen von CaYFP und CaYFP-CaFbFP gering waren.

3.4.2.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse von YFOS-Varianten in *C. albicans*

Nachdem die Expression der YFOS-Varianten in *C. albicans* gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden die Energieübertragung zwischen CaFbFP und CaYFP durch Aufnahme von Emissionsspektren der zuvor hergestellten Proteinrohextrakte (400 µg) (s. 3.4.2.2) durchgeführt (Abb. 3.37).

Die Fluoreszenzanalysen wurden zunächst wie bei *S. cerevisiae* bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm durchgeführt, wobei diese in *C. albicans* nicht zur optimalen Anregung von CaFbFP führte und keine Energieübertragung auf CaYFP zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde nach einigen Fluoreszenztests eine Anregungswellenlänge von 430 nm gewählt, durch die die Emission von CaFbFP deutlich erhöht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Außerdem wurden als Kontrolle bei der Aufnahme von Emissionsspektren Rohextrakte (400 µg) des *S. cerevisiae*-Stamms THY.AP4[pOXY1] (*GAL1p*-Ca*YFP*) verwendet. Zuvor zeigten Untersuchungen der Fluoreszenz bei YFP-spezifischen Wellenlängen (λ_{Anr}= 500, λ_{Em}= 530 nm) nur ein sehr schwaches Signal für Rohextrakte des Stamms *C. albicans* CAI4[pOXY7] (CaYFP) (Daten nicht gezeigt), und auch durch Immunoblot-Analysen (Anti-YFP) konnten nur sehr geringe Mengen des Proteins im Rohextrakt nachgewiesen werden (Abb. 3.36).

Bei der Aufnahme des Emissionsspektrums von Rohextrakten Ca*YFP*-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen war wie erwartet keine Steigung zu beobachten, wohingegen Untersuchungen der Fluoreszenz nach Anregung bei 500 nm und Emission bei 530 nm die generelle Fluoreszenz des Reporters bestätigten (Daten nicht gezeigt). Bei den Fluoreszenzanalysen der Rohextrakte mit einzelnem CaFbFP bzw. CaYFP-CaFbFP-Fusion wurden nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten gemessen, so dass die jeweiligen Emissionsspektren sehr flach verliefen. Die Probe mit der CaFbFP-Tandem-Fusion wies hingegen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf als das einzelne Protein. Hier zeigte das Spektrum den charakteristischen Kurvenverlauf von CaFbFP in Rohextrakten, mit einem Maximum bei 505 nm (909 FE) und einer Schulter bei 530 nm (807 FE). Auch die Kurve des Rohextraktes mit 2xCaFbFP-CaYFP (CAI4[pOXY9]) verlief deutlich höher als die der Probe mit CaFbFP-CaYFP. Im Gegensatz zu der Kurve des 2xCaFbFP-haltigen Rohextrakts konnte eine Verschiebung in den höherwelligen Bereich beobachtet werden. So steigt die Emissionskurve zunächst deutlich flacher an und erreicht erst bei 525 (500 FE) und 530 nm (500 FE) das Maximum. Anschließend fällt die Kurve wieder sehr flach ab. Somit konnte nach Anregung von CaFbFP CaYFP-vermittelte Emission detektiert werden, was die Energieübertragung zwischen den FRET-Partnern in *C. albicans* zeigt. Die FRET-Fusion aus CaYFP und 2xCaFbFP für *C. albicans* wird als YFOS-2 bezeichnet.

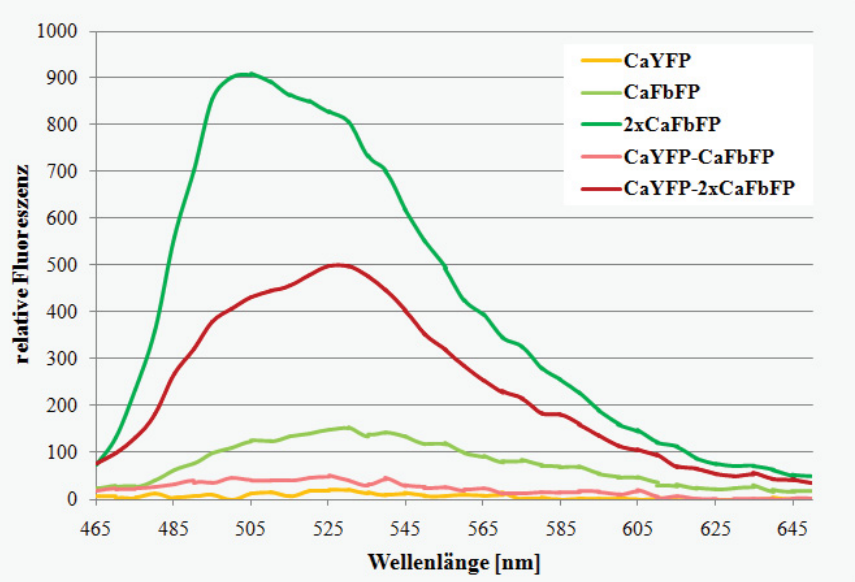


Abb. 3.37: Emissionsspektren von Zellen verschiedener *C. albicans*-Stämme unter normoxischen Bedingungen. Emissionsspektrum von Rohextrakten (400 µg) der *C. albicans* CAI4-Stämme mit den Plasmiden pIE5 (LP), pIE5-1 (Ca*FbFP*), pIE5-2 (2xCa*FbFP*), pOXY8 (Ca*YFP*-Ca*FbFP*) und pOXY9 (Ca*YFP*-2xCa*FbFP*) sowie *S. cerevisiae* THY.AP4[pOXY1] (Ca*YFP*) nach Anregung bei 430 nm. Alle Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen (technische Replikate), wobei Werte der Rohextrakte des jeweiligen Kontrollstamms (*C. albicans* CAI4[pIE5] bzw. *S. cerevisiae* THY.AP4 [p426GAL1]) subtrahiert wurden.

3.4.3 Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae*

Da die generelle Funktionalität von YFOS als Biosensor für Sauerstoff in *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, eröffnen sich weitere Möglichkeiten zur Nutzung des FRET-basierten Reportersystems. Bisher ermöglichte die cytoplasmatische Lokalisation der Fusion einen Nachweis intrazellulären Sauerstoffs, wohingegen eine Exposition von YFOS auf der Oberfläche von Hefezellen Untersuchungen des Sauerstoffgehalts in der Umgebung der Zelle ermöglichen könnte. Dies wäre besonders interessant zur Analyse der Sauerstoffbedingungen in bestimmten Gewebestrukturen oder Wirtszellen, in die Hefezellen wie *C. albicans* durch Invasion eindringen oder durch Phagozytose aufgenommen werden können.
Die generelle Funktionalität des FRET-Paars nach Sekretion und Lokalisation an der Oberfläche von Hefezellen wurde in dieser Arbeit in *S. cerevisiae* untersucht.

3.4.3.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen zur Lokalisation von YFOS auf der Zelloberfläche

Zur Lokalisation von YFOS auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* wurde das Plasmid pOXY4 basierend auf pIE9-2µ über homologe Rekombination in dem Stamm *S. cerevisiae* EBY100 konstruiert (s. 2.5.5), wobei die Selektion über das *TRP1*-Markergen des Vektors

erfolgte. Das Plasmid wies anschließend, zusätzlich zu den Eigenschaften des Multikopie-Vektors pIE9-2µ zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP, das Ca*YFP*-Gen mit Verbindungssequenz stromaufwärts von Ca*FbFP* auf (Abb. 3.38). Parallel wurde der Vektor pOXY3 zur Expression von *AGA2*-Ca*YFP* als Referenz zur FRET-Fusion konstruiert (s. 2.5.5). Dieses Plasmid leitet sich von dem Leervektor pYD1-2µ ab und trägt zudem Ca*YFP* mit Verbindungssequenz stromabwärts von *GAL1p-AGA2* (Abb. 3.38).

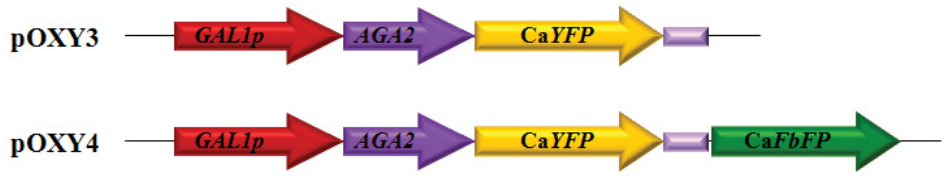


Abb. 3.38: Ausschnitte der Expressionsplasmide zur Lokalisation von CaYFP bzw. YFOS auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae*. Plasmide zur Expression von *AGA2*-Ca*YFP* (pOXY3) bzw. *AGA2*-Ca*YFP*-Ca*FbFP* (pOXY4) unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1p* in *S. cerevisiae*. Basis der Konstruktionen sind die Multikopie-Plasmide pYD1-2µ bzw. pIE9-2µ (s. 3.3.1.4). Hellviolett: Verbindungssequenz.

3.4.3.2 Nachweis- der Proteinsynthese von Aga2-CaYFP-CaFbFP

Um die Synthese und mögliche Modifikationen der Fusionsproteine Aga2-CaYFP-CaFbFP und Aga2-CaYFP zu untersuchen, wurden immunologische Nachweise von YFP und FbFP durchgeführt. Dazu wurden die *S. cerevisiae*-Stämme EBY100[pYD1-2µ] (Leerplasmid), EBY100[pOXY3] (*AGA2*-Ca*YFP*) und EBY100[pOXY4] (*AGA2*-Ca*YFP*-Ca*FbFP*), wie unter 3.3.1.2 beschrieben, angezogen und zur Herstellung von Rohextrakten verwendet. Diese wurden wie bisher zum Nachweis spezifischer Proteine mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen FbFP (Anti-FbFP) bzw. GFP-Varianten (Anti-YFP) genutzt (Abb. 3.39). Die theoretischen molekularen Massen der reifen Fusionsproteine Aga2-CaYFP und Aga2-CaYFP-CaFbFP betragen 40,5 bzw. 59,4 kDa, wobei die tatsächlichen Größen im Immunoblot aufgrund möglicher Glykosylierungen erwartungsgemäß höher liegen.

Nach Behandlung mit dem Anti-EcFbFP Antikörper wies die Membran in der Spur des Rohextrakts von Zellen mit Aga2-CaFbFP (EBY100[pIE9-2µ]) das bereits in 3.3.1.5 detektierte Bandenmuster auf, welches bei dem Anti-YFP Blot wie erwartet nicht nachzuweisen war. Ebenso waren nur nach Behandlung mit dem gegen GFP-Varianten gerichteten Antikörper, nicht aber mit Anti-EcFbFP, Signale in den Spuren von Rohextrakten *AGA2*-Ca*YFP*-exprimierender Zellen zu verzeichnen. Dort konnten jeweils drei eng beieinander liegende Banden bei etwa 46, 53 und 56 kDa sowie eine Bande bei etwa 67 kDa detektiert werden, welche die Aga2-CaYFP-Fusion verschiedener Glykosylierungszustände repräsentieren.

In den Spuren der Rohextrakte von EBY100[pOXY4] (Aga2-CaYFP-CaFbFP) konnte bei dem Immunoblot gegen FbFP das gleiche Bandenmuster wie in den Spuren Aga2-CaFbFP-haltiger Rohextrakte detektiert werden, wobei zusätzliche Banden im Bereich von etwa 70-

85 kDa die Synthese des Fusionsproteins zeigten. Diese Banden konnten auch bei dem Anti-YFP-Blot verzeichnet werden. Zusätzlich wurde hier jeweils eine schwache Bande auf der Höhe von Aga2-CaYFP detektiert. In der Spur von Rohextrakten mit Leerplasmid (*AGA2*) konnte erwartungsgemäß auf beiden Membranen kein Signal verzeichnet werden. Somit konnte die Synthese von Aga2-CaYFP sowie Aga2-CaYFP-CaFbFP gezeigt werden, wobei die Fusion teilweise prozessiert wird.

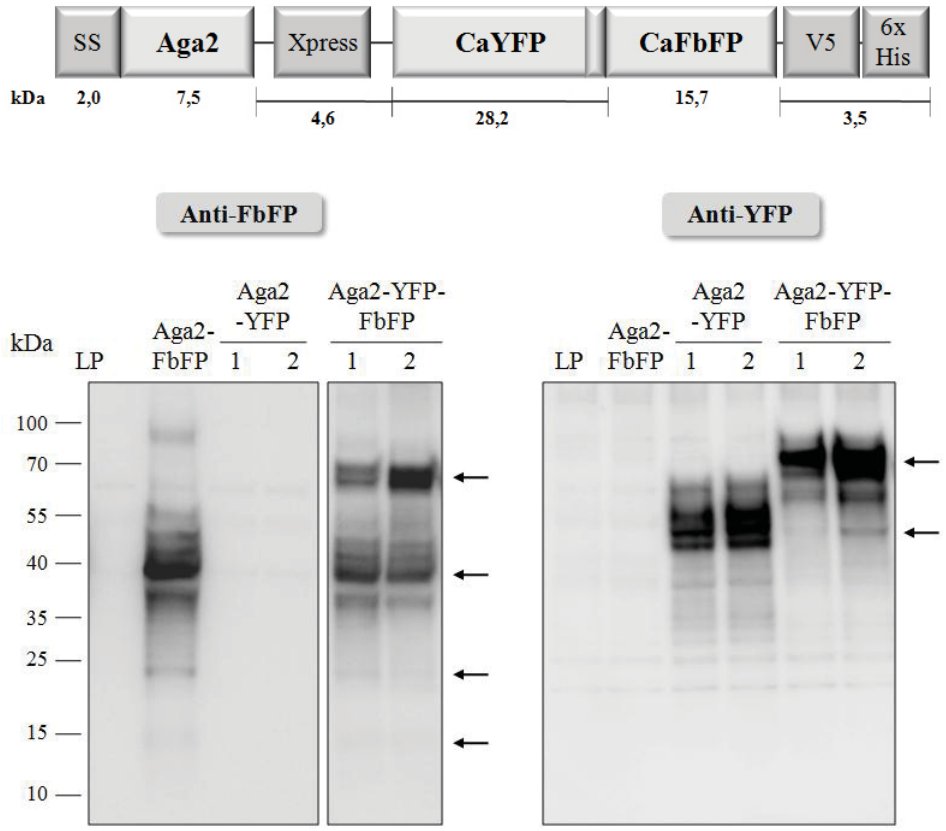


Abb. 3.39: Synthesenachweis zur Oberflächenpräsentation von YFOS in *S cerevisiae*. Immunoblot von Rohextrakten (100 µg) der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Plasmiden pYD1-2µ (Leerplasmid, LP), pIE9-2µ (Aga2-CaFbFP), pOXY3 (Aga2-CaYFP) und pOXY4 (Aga2-CaYFP-CaFbFP) nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (4-20 % Acrylamid). Links: Anti-FbFP, Rechts: Anti-YFP. Pfeile kennzeichnen die wichtigsten Banden. Zahlen bezeichnen die biologischen Replikate. Darüber: Schema der Aga2-CaYFP-CaFbFP-Fusion mit theoretischen molekularen Massen der Komponenten in kDa.

3.4.3.3 Quantitative Fluoreszenzanalyse zur Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae*

Im Folgenden wurde die Funktionalität des FRET-Systems nach Fusion mit dem Zellwand-assoziierten Protein Aga2 untersucht. Dazu wurden, wie auch bei cytoplasmatischer Lokalisation, Emissionsspektren aufgenommen. Die Zellen der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Plasmiden pYD1-2µ, pIE9-2µ, pOXY3 und

pOXY4 wurden, wie oben beschrieben, unter normoxischen Bedingungen angezogen und aufgeschlossen. Anschließend wurde die Emission der Proteine in Rohextrakten (400 µg) in Dreifachbestimmung (technische Replikate) nach Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm untersucht. In Abbildung 3.40 sind Mittelwerte der Messungen nach Subtraktion der Werte des Kontrollstamms (EBY100[pYD1-2µ]) graphisch dargestellt.

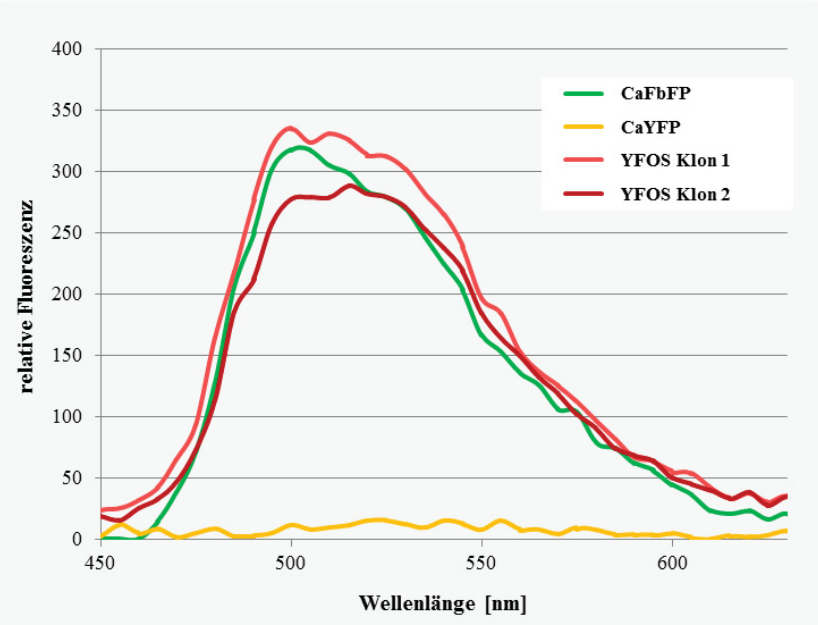


Abb. 3.40: Emissionsspektrum zur Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae*. Emissionsspektren (λ_{Anr}= 380 nm) von Rohextrakten (400 µg) der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Plasmiden pIE9-2µ (CaFbFP), pOXY3 (CaYFP) und pOXY4 (YFOS Klon 1 und 2). Anzucht der Zellen unter normoxischen Bedingungen bei 21 °C in SGR+Leu-Medium für etwa 24 h. Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate), wobei die Werte des Kontrollstamms subtrahiert wurden.

Die Spektren der Stämme mit Aga2-CaFbFP und Aga2-CaYFP dienten als Kontrolle und wiesen die nach Anregung bei 380 nm charakteristischen Kurvenverläufe der Fluoreszenzproteine auf. Die Kurve der Emission von Rohextrakten mit YFOS (Klon1 und 2) verläuft ähnlich der Kurve CaFbFP-haltiger Rohextrakte und erreicht bei 500 nm das Maximum. Zwischen 500 und 530 nm blieb die relative Fluoreszenz jedoch konstant, was die Energieübertragung von CaFbFP auf CaYFP zeigte. Da die Verschiebung des Spektrums in den höherwelligen Bereich im Vergleich zu dem Spektrum bei cytoplasmatischer Lokalisation von YFOS unter normoxischen Bedingungen (Vgl. 3.4.1.3) deutlich schwächer ausgeprägt war, scheint der Energietransfer eingeschränkt zu sein.
Die generelle Fluoreszenzfähigkeit von CaYFP in Rohextrakten mit Aga2-CaYFP und Aga2-CaYFP-CaFbFP wurde durch Messung der Emission (530 nm) nach Anregung bei 500 nm bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.4.3.4 Untersuchungen der Oberflächenpräsentation von YFOS mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation von CaYFP und YFOS auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* zu überprüfen, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Einzelzellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Stämme EBY100[pYD1-2µ] (Leerplasmid), EBY100[pOXY3] (*AGA2*-Ca*YFP*) und EBY100[pOXY4] (*AGA2*-Ca*YFP*-Ca*FbFP*) wie zur Oberflächenpräsentation von CaFbFP (s. 3.3.1.2) angezogen und die Fluoreszenz der Zellen nach Anregung mit blauem bzw. grünem Licht mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht (Abb. 3.41).

Die Aufnahmen zeigen, dass sowohl CaYFP, als auch die FRET-Fusion YFOS auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Dabei ist zu erkennen, dass das Signal auf der Oberfläche von Zellen mit YFOS deutlich stärker ist als bei Zellen mit CaYFP. Hier ist jedoch zu beachten, dass die YFP-vermittelte Fluoreszenz durch Bestrahlung mit blauem Licht ebenfalls minimal angeregt wird. Der Kontrollstamm mit Leerplasmid zeigte wie erwartet kein Signal.

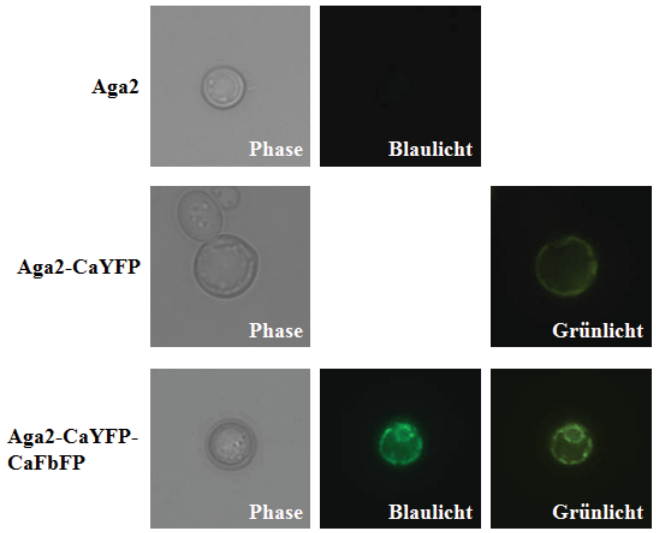


Abb. 3.41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Oberflächenpräsentation von CaYFP und YFOS in *S. cerevisiae*. Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops von Zellen der *S. cerevisiae* EBY100-Stämme mit den Plasmiden pYD1-2µ (Aga2), pOXY3 (Aga2-CaYFP) und pOXY4 (Aga2-CaYFP-CaFbFP) bei Weißlicht (Phase) bzw. Blaulicht- oder Grünlichtanregung. Die Stämme wurden zuvor in SD+Leu-Medium bei 21 °C unter Normoxie für etwa 24 h angezogen.

4 Diskussion

Fluoreszierende Reporterproteine stellen wichtige molekularbiologische Werkzeuge dar, die vor allem zur Analyse der Genexpression sowie zur Verfolgung der Synthese, Lokalisation und Interaktion von Proteinen verwendet werden. Auch für die Grundlagenforschung und Anwendungen in Medizin und Biotechnologie spielen solche Proteine eine wichtige Rolle. Zum Nachweis der Fluoreszenzproteine bedarf es, im Gegensatz zu anderen Reporterproteinen, keiner Zugabe von Substraten. Darüber hinaus sind Untersuchungen nicht nur auf Ebene ganzer Populationen, sondern auch in Einzelzellen möglich (Giepmans *et al*., 2006). Es existiert bereits eine Vielzahl an Fluoreszenzreportern, welche sich von dem „Grün Fluoreszierenden Protein" (GFP) aus der Qualle *A. victoria* sowie dem roten DsRed aus der Weichkoralle *D. stratia* ableiten. Die Fluoreszenzeigenschaften dieser Proteine wurden durch ungerichtete und gerichtete Mutationen optimiert und verschiedene Farbvarianten entwickelt (Zimmer, 2009). Die komplexe Proteinfaltung sowie die langsam ablaufende Chromophor-Reifung dieser Reporter stellen jedoch Nachteile bei Analysen transienter Genexpressionen dar. Der Chromophor-Reifungsprozess weist bei den meisten derzeit verwendeten Fluoreszenz-proteinen eine Halbzeit von etwa 40 min bis zu 2 h auf (Chudakov *et al*., 2010). Ein weiterer Nachteil dieser Reporter ist, dass sich ihre Anwendung auf aerobe Systeme beschränkt, da das proteineigene Chromophor molekularen Sauerstoff zur Ausbildung der fluoreszenzfähigen Form benötigt (Heim, 1994; Coralli *et al*., 2001). Viele Mikro-organismen leben jedoch fakultativ oder obligat anaerob, so dass Untersuchungen auch unter diesen Bedingungen von großem Interesse sind. Um eine Verwendung von fluoreszierenden Reporterproteinen auch unter anoxischen sowie sauerstoffarmen, hypoxischen Bedingungen zu ermöglichen, entwickelten Drepper *et al*. (2007) die sauerstoffunabhängigen Fluoreszenzreporter FbFP („Flavin mononucleotide (FMN) -based Fluorescent Proteins"), welche sich von bakteriellen Blaulichtrezeptoren ableiten. In Vorarbeiten wurde die Sequenz von *EcFbFP* an den ungewöhnlichen Kodongebrauch von *C. albicans* angepasst und für die Expression in Hefezellen optimiert (Eichhof, 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die generellen Fluoreszenzeigenschaften von CaFbFP im Cytoplasma von *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Zellen charakterisiert und optimiert. Durch die fakultativ anaerobe Lebensweise der beiden Hefen bietet die Verwendung sauerstoffunabhängiger Fluoreszenzreporter neue Möglichkeiten zur Analyse zellulärer Prozesse.
In dieser Arbeit wurde außerdem CaFbFP-Fluoreszenz in weiteren Hefe-Zellkompartimenten nachgewiesen und die Verwendung des Proteins als Biosensor für Sauerstoff etabliert.

4.1 Steigerung der Fluoreszenzintensität durch Mehrfachfusion von CaFbFP

Die Synthese und Fluoreszenz der Kodon-optimierten FbFP-Variante CaFbFP konnte bereits für die Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden (Eichhof, 2008). Zudem konnte die schwache Fluoreszenz in *C. albicans* durch Konstruktion einer Tandemfusion, bestehend aus zwei Ca*FbFP*-Leserastern (2xCa*FbFP*), erhöht werden. Diese Steigerung konnte in

S. cerevisiae unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors dagegen nicht beobachtet werden (Eichhof, 2008; Tielker *et al*., 2009). Da die Fluoreszenz von CaFbFP in Hefe relativ schwach ist und ein rasches Ausbleichen die Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder erschwert, sollte die Fluoreszenzintensität in der aktuellen Arbeit durch Konstruktion von Mehrfachfusionen in *S. cerevisiae* und *C. albicans* optimiert werden.

Mehrfachfusionen in *S. cerevisiae*

In dieser Arbeit wurde 2xCa*FbFP* in *S. cerevisiae* unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors kloniert und parallel eine Fusion aus drei Ca*FbFP*-Genen hergestellt. Die vergleichenden Untersuchungen der CaFbFP-Varianten zeigten die Synthese und Fluoreszenz aller Fusionen in *S. cerevisiae* (Abb. 3.2 & 3.3). Dabei war im Gegensatz zu den vorhergegangenen Analysen eine 1,3-fache Steigerung der Fluoreszenzintensität von 2xCaFbFP im Vergleich zu dem einzelnen Protein festzustellen. *GAL1p* wird in *S. cerevisiae* unter den verwendeten Bedingungen stärker exprimiert als *ACT1p* (Eichhof, 2008), so dass der Effekt der doppelten Fusion unter Kontrolle des *GAL1p* deutlicher zu erkennen war. Aufgrund der doppelten LOV-Domäne in 2xCaFbFP ist die Bindung eines weiteren Moleküls FMN denkbar. Die Fluoreszenzintensität von 2xCaFbFP war jedoch nicht, wie erwartet, doppelt so hoch im Vergleich zu dem einzelnen Protein, was möglicherweise durch eine veränderte Konformation der FMN-Bindetaschen zu begründen ist. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der Dreifachfusion gestützt, welche zeigten, dass durch das Anhängen eines weiteren Fluoreszenzproteins (3xCaFbFP) keine weitere Steigerung der Intensität erreicht wurde. Hier war möglicherweise eine der FMN-Bindestellen aufgrund der veränderten Tertiärstruktur nicht mehr zugänglich. Die Immunoblot-Analysen zeigten außerdem, dass die Proteinmengen und somit auch die Stabilität aller Varianten in *S. cerevisiae* in etwa gleich hoch waren (Abb. 3.2). Die unterschiedlich starken Banden im Immunoblot sind dabei auf die Anzahl der Antikörperbindestellen des entsprechenden denaturierten Proteins zurückzuführen.
Somit erwies sich 2xCaFbFP in *S. cerervisiae* als Variante mit der höchsten Fluoreszenzintensität, wobei die Größe des Proteins (ca. 31 kDa) vergleichbar mit Reportern der GFP-Familie (ca. 27 kDa) ist (Tsien, 1998).

Mehrfachfusionen in *C. albicans*

Für die Hefe *C. albicans* konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass das einzelne CaFbFP-Protein kaum Fluoreszenz aufweist, wohingegen eine Fluoreszenz der 2xCaFbFP-Fusion in Kolonien unter Normoxie sichtbar war (Eichhof, 2008). Ergänzend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass ein 2xCa*FbFP*-exprimierender *C. albicans*-Stamm auch unter Anoxie in der Lage ist, zu fluoreszieren (Abb. 3.9 A). Außerdem wurden die einzelne und doppelte Ca*FbFP*-Variante Plasmid-basiert unter Kontrolle des *TDH3*-Promotors gestellt, wodurch der Nachweis von 2xCaFbFP in Einzelzellen von *C. albicans* gezeigt werden konnte (Abb. 3.9 B). Quantitative Fluoreszenzanalysen der beiden Fusionen sowie einer neu konstruierten dreifachen CaFbFP-Variante zeigten zudem auch in *C. albicans*, dass das Anhängen eines dritten Fluoreszenzproteins keine weitere Steigerung der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte (Abb. 3.8). Hier war die Intensität von 3xCaFbFP sogar nur vergleichbar mit der des einzelnen Proteins. Im Unterschied zu

S. cerevisiae sind die schwachen Fluoreszenzsignale von 1xCaFbFP und 3xCaFbFP in *C. albicans* mit der Instabilität dieser Proteine zu begründen. So korrelierten die Fluoreszenzintensitäten der Varianten mit den jeweiligen Proteinkonzentrationen in der Zelle (Abb. 3.7). Zusätzlich ist auch hier wahrscheinlich, wie für *S. cerevisiae* angenommen, dass die FMN-Bindestelle von 3xCaFbFP schwer zugänglich ist.
Im Gegensatz dazu zeigten *C. albicans*-Zellen, welche eine Fusion aus vier Ca*FbFP*-Genen exprimierten, wiederum eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als alle anderen Varianten (Abb. 3.10). Dies wurde durch vergleichende Analysen von Zellausstrichen beobachtet, wobei die Fluoreszenzintensität etwa doppelt so hoch war wie die der 2xCaFbFP-Variante. Der Zusammenhang zwischen Stabilität und Fluoreszenzintensität von 4xCaFbFP ist bisher unklar und könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.
4xCaFbFP ist mit einer theoretischen molekularen Masse von etwa 63 kDa relativ groß, jedoch stellt sich das Protein durch die intensive Fluoreszenz vor allem für die Fusion mit regulatorischen Sequenzen oder cytoplasmatischen Proteinen als äußerst geeignet dar und könnte für die generelle Markierung von *C. albicans*-Zellen in hypoxischen Geweben genutzt werden. Durch die Verwendung von 4xCaFbFP eröffnen sich neue Möglichkeiten für Untersuchungen von *C. albicans*-Infektionen im Maus-Modell, wo CaFbFP im Gegensatz zu GFP auch in sauerstoffarmen Regionen wie dem Gehirn, der Leber oder in Muskelzellen nachgewiesen werden könnte. Die gesteigerte Fluoreszenzintensität von 4xCaFbFP könnte zudem für die Konstruktion eines weiteren YFOS-Sauerstoffsensors genutzt werden, um die Energieübertragung auf CaYFP zu optimieren.

4.2 Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Fluoreszenz von CaFbFP in *S. cerevisiae*

Da CaFbFP als Reporterprotein verwendet werden soll, spielen die Fluoreszenz-eigenschaften unter verschiedenen Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle.

Einfluss der Riboflavinkonzentration auf die Fluoreszenzintensität von CaFbFP

Die Fluoreszenz von FbFP-Proteinen ist abhängig von der Bindung des Kofaktors FMN, welcher von pro- und eukaryotischen Zellen selbst synthetisiert wird (Abbas & Sibirny, 2011). Zudem ist die Vorstufe und Chromophoralternative Riboflavin in den meisten Wachstumsmedien enthalten. In diesem Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob die Anwesenheit von Riboflavin im Medium essentiell für die Fluoreszenz des Proteins ist und die Steigerung der Riboflavinkonzentration die Fluoreszenzintensität des Proteins beeinflusst. Durch quantitative Fluoreszenzanalysen zeigte sich, dass die Fluoreszenz von CaFbFP auch ohne Riboflavin im Medium ausgebildet wird und die Intensität nur geringfügig durch erhöhte Konzentration des Vitamins gesteigert werden kann (Abb. 3.4). Somit sind die vom Wirt bereitgestellten Riboflavin- bzw. FMN-Konzentrationen ausreichend für die Fluoreszenz des Proteins.
Das Chromophor von FbFPs ist im Gegensatz zu dem GFP-Chromophor nicht Teil des Proteins und lässt sich daher auch nicht durch Mutationen optimieren. Allerdings könnte eine mögliche Steigerung der Fluoreszenzintensität in zukünftigen Studien durch Zugabe eines synthetischen, chemisch optimierten FMN-Chromophors untersucht werden. Auf

diese Weise konnten Mansurova *et al.* (2011) die Quantenausbeute des FMN-bindenden Blaulichtrezeptors YtvA aus *B. subtilis* erhöhen.

pH-Stabilität von CaFbFP

Der intrazelluläre pH-Wert ist ein variabler Faktor und ändert sich in Hefe infolge zellulärer Prozesse, der Umgebungsbedingungen sowie der Verfügbarkeit von Nährstoffen. Außerdem herrschen in den verschiedenen eukaryotischen Organellen unterschiedliche pH-Bedingungen, welche wichtig für die individuellen Vorgänge in diesen Kompartimenten sind (Orij *et al*., 2011). Die Nachweisbarkeit von Fluoreszenzreportern wie GFP wird jedoch durch bestimmte pH-Bedingungen limitiert, so dass die Fluoreszenzfähigkeit vieler Fluoreszenzproteine, insbesondere im sauren Bereich, stark eingeschränkt ist (Patterson *et al*., 1997; Kneen *et al*., 1998).

CaFbFP bietet möglicherweise unter diesen Bedingungen Vorteile als Reporter, so dass in dieser Arbeit die Fluoreszenz des Proteins bei verschiedenen pH-Bedingungen getestet wurde. Dazu wurden CaFbFP-haltige Rohextrakte in Puffern verschiedener pH-Werte inkubiert. Die Messung der pH-abhängigen Fluoreszenz von CaFbFP zeigte, dass das Protein deutlich toleranter gegenüber verschiedenen pH-Bedingungen ist als das Referenzprotein CaYFP. So wies CaFbFP bereits ab einem pH-Wert von 4 mehr als 50 % maximale Fluoreszenz auf, wohingegen CaYFP unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar war (Abb. 3.5). Vakuolen von *S. cerevisiae* besitzen einen pH-Wert von 4,8 (Brett *et al*., 2005), so dass Untersuchungen mit CaYFP dort kaum möglich wären. CaFbFP weist bei diesem pH-Wert hingegen sogar fast maximale Fluoreszenz (etwa 85 %) auf. Doch nicht nur die Fluoreszenz von YFP ist unter sauren Bedingungen eingeschränkt, auch für die native Form von GFP, welche als relativ pH-stabil beschrieben wird, berichteten Patterson *et al*. (1997) nahezu maximale Fluoreszenz erst etwa bei pH 6. Die optimierten Varianten EGFP sowie das blaue EBFP erreichten diese sogar erst bei pH 7 (Patterson *et al*., 1997). Auch der pH-Wert von Hefemedien liegt mit einem pH von etwa 5,8 im leicht sauren Bereich und säuert sich bei Anwesenheit von Glukose während des aeroben und anaeroben Wachstums durch entstehende Stoffwechselprodukte weiter an (Sigler *et al*., 1980). Zur fermentativen Produktion von Ethanol werden zudem sogar Medien mit pH-Werten zwischen 4 und 5 verwendet (Lin *et al*., 2012). Die stabile Fluoreszenz von CaFbFP im sauren Bereich könnte somit Vorteile gegenüber anderen Fluoreszenzproteinen als Reporter in Hefe, insbesondere bei der Kontrolle von Produktionsprozessen, bieten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten außerdem, dass die Fluoreszenzintensität von CaFbFP im Gegensatz zu CaYFP im Bereich zwischen pH 5,5 und 8,8 in etwa konstant hoch blieb. Dies könnte besonders für Untersuchungen in Organellen mit schwankenden pH-Bedingungen oder bei Sekretions-Analysen von großem Vorteil sein. Entlang des sekretorischen Wegs durchlaufen Proteine Bedingungen von pH 7,2 im ER bis zu 5,2 und niedriger in sekretorischen Vesikeln (Paroutis *et al*., 2004). Im basischen Bereich zeigte CaFbFP maximale Fluoreszenz, wobei in dieser Arbeit Bedingungen bis zu einem pH von 8,8 untersucht wurden (Abb. 3.5). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte die Fluoreszenz von EcFbFP bis zu einem pH-Wert von 11 nachgewiesen werden (Mukherjee *et al*., 2013), so dass für CaFbFP ein ähnliches Verhalten anzunehmen ist.

4.3 Lokalisation von CaFbFP in verschiedenen Hefe-Zellkompartimenten

Nachdem die generelle Funktionalität von CaFbFP im Cytoplasma der Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* gezeigt werden konnte, wurden in dieser Arbeit der Transport des Proteins in weitere Zellkompartimente und dessen dortige Nachweisbarkeit untersucht.
CaFbFP bindet FMN als Chromophor, welches im Cytoplasma der Zelle in ausreichender Form vorkommt (vgl. 4.2). Es ist jedoch bisher unklar, zu welchem Zeitpunkt des Transports in andere Zellkompartimente die Kofaktorbeladung von FbFPs erfolgt, so dass eine Limitierung von FMN die Fluoreszenz in bestimmten Bereichen der Zelle beeinflussen könnte. Um die Anwendung von CaFbFP als Reporter in verschiedenen Kompartimenten zu testen, wurde die Lokalisation des Fluoreszenzproteins auf der Zelloberfläche sowie im Zellkern von *S. cerevisiae* und *C. albicans* untersucht.

4.3.1 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae*

Die Sekretion und Lokalisation von FbFPs auf der Zelloberfläche sowie dessen dortiges Fluoreszenzverhalten wurden für Eukaryoten in bisherigen Studien noch nicht untersucht. In dieser Arbeit sollte daher die Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *S. cerevisiae* analysiert werden. Unter Verwendung eines kommerziellen Systems (Invitrogen) zur Oberflächenpräsentation von Proteinen in *S. cerervisiae* wurde eine Fusion von CaFbFP mit dem Zellwand-assoziierten Protein Aga2 konstruiert. Aga2 bildet zusammen mit Aga1 das Paarungsagglutinin der *MAT*a-Zellen. Dabei besitzt Aga1 neben einem N-terminalen Sekretionssignal einen GPI-Anker am C-Terminus, welcher die Verankerung des Proteins in der Hefezellwand bewirkt. Aga2 ist über zwei Disulfidbrücken mit Aga1 verbunden und vermittelt durch eine Adhäsionsdomäne sowie den C-Terminus den eigentlichen Zellkontakt mit dem α-Agglutinin (Roy *et al*., 1991; Cappellaro *et al*., 1994).
Es zeigte sich in Immunoblot-Analaysen, dass die Fusion aus CaFbFP und Aga2 synthetisiert wird (Abb. 3.14). Aufgrund der starken *O*-Glykosylierung von Aga2 (Capellaro *et al*., 1991) lag die tatsächliche Größe des Fusionsproteins jedoch über der theoretischen Größe. Die Agglutinin-Untereinheit weist 21 potentielle Glykosylierungsstellen auf, wobei bereits für 10 dieser Serin- bzw. Threonin-Reste Mannosylierungen gezeigt werden konnten (Cappellaro *et al*., 1991). Zusätzlich enthält die CaFbFP-Sequenz 7 und die restliche Sequenz 16 weitere Serin- oder Threoninreste (vgl. Abb. 3.13), welche potentielle *O*-Glykosylierungsstellen darstellen und die Größe des Proteins zusätzlich beeinflusst haben könnten.
Neben dem Nachweis der Synthese konnte die erfolgreiche Lokalisation von CaFbFP auf der Oberfläche durch FITC-Markierung *AGA2*-Ca*FbFP*-exprimierender Zellen von *S. cerevisiae* gezeigt werden (Abb. 3.15). Die Fluoreszenz des Proteins selbst konnte zudem nach Steigerung der Proteinmenge durch Expression von einem Mehrfachkopie-Plasmid auf der Oberfläche detektiert werden (Abb. 3.17). Dabei wurde eine ungleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz beobachtet, welche auch bereits bei der FITC-Markierung von CaFbFP zu sehen war. Eine heterogene Verteilung dieser Art wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie bei Transmembranproteinen wie Can1 in der Plasmamembran (PM) von Hefezellen gezeigt (Spira *et al*., 2012). Dort wurde

beschrieben, dass die Verteilung dieser Proteine in der PM von der Lipid-Zusammensetzung abhängt, wodurch es zu fleckenartiger Anordnung gleichartiger Proteine in den Ergosterol- und Sphingolipid-reichen Lipid Rafts kommt. Lipid Rafts spielen allerdings auch bei dem vesikulären Transport GPI-verankerter Proteine sowie der Protein-Sortierung an der Plasmamembran eine wichtige Rolle (Surma *et al*., 2012). Daher lässt sich vermuten, dass die Verteilung GPI-verankerter Proteine in der Plasmamembran in ähnlicher Weise abläuft wie für Transmembranproteine beschrieben. In Säugerzellen konnte dies zudem bereits gezeigt werden (Sharma *et al*., 2004). Nach GPI-vermittelter Verankerung in der Plasmamembran werden Oberflächenproteine auf das β1,6-Glukan der Zellwand übertragen (Kollar *et al*., 1997), wo deren Anordnung wahrscheinlich beibehalten wird. Da Aga2 ohne CaFbFP (Leerplasmid) hingegen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt ist (Daten nicht gezeigt), wird vermutet, dass die Lipid Raft-abhängige Sortierung durch CaFbFP beeinflusst wird.
FbFPs sowie auch die ursprünglichen YtvA-LOV-Domäne aus *B. subtilis* weisen zudem eine Tendenz zur Dimerisierung auf (Drepper *et al*., 2013; Buttani *et al*., 2007). Somit kann die verstärkte Fluoreszenz einzelner Regionen der Zelloberfläche zusätzlich mit einer möglichen Dimerbildung einiger Aga2-CaFbFP-Proteine während der Sekretion begründet werden. Infolgedessen käme es zur Lokalisation des doppelten Proteins auf der Zellwand und einer verstärkten Fluoreszenz an dieser Stelle.
Zusammenfassend konnte durch die vorgenannten Ergebnisse erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, CaFbFP in *S. cerevisiae* zu sekretieren und auf der Oberfläche zu lokalisieren und nachzuweisen. In zukünftigen Studien könnte CaFbFP daher als Reporter auf der Zelloberfläche dieser Hefe genutzt werden.

Aga2-CaFbFP wird teilweise prozessiert

Bei den Immunoblot-Analysen nach Expression von *AGA2*-Ca*FbFP* von dem Niedrigkopie- als auch dem Mehrfachkopie-Plasmid wurden neben den Banden des Fusionsproteins zwei weitere kleinere Banden detektiert (Abb. 3.14 & 3.16). Die FITC-Markierung von Sphäroplasten ohne Zellwand lies zudem CaFbFP im intrazellulären Bereich erkennen (Abb. 3.15). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Aga2-CaFbFP während der Sekretion partiell geschnitten und somit die Menge unprozessierten Fusionsproteins auf der Oberfläche verringert wird. Diese Annahme wird außerdem dadurch gestützt, dass erst nach Steigerung der Expressionsrate und folglich der Proteinmenge der Fusion ein Nachweis CaFbFP-assoziierter Fluoreszenz auf der Oberfläche möglich war.
Zur Identifizierung potentieller Schnittstellen wurden die Immunoblot-Analysen mit Antikörpern, welche gegen die verschiedenen Epitopmarkierungen N- bzw. C-terminal von CaFbFP gerichtet waren, herangezogen. Die verkürzten Versionen der Fusion bei 25 und 16 kDa konnten sowohl mit dem Anti-FbFP- als auch dem Anti-V5-Antikörper detektiert werden. Sie waren hingegen nicht auf dem Nachweis des Xpress-Epitops zu verzeichnen (Abb. 3.14). Daher befindet sich vermutlich eine Schnittstelle zwischen dem Xpress-

Epitop und CaFbFP oder am Anfang der CaFbFP-Sequenz. Da das verwendete System zur Oberflächenpräsentation jedoch bereits in mehreren Studien erfolgreich verwendet wurde (Mölleken, 2005; Bidlingmaier & Liu, 2011), ist nicht davon auszugehen, dass die Prozessierung am C-Terminus des Xpress-Epitops erfolgte. Die Bande bei 25 kDa könnte bei Spaltung im N-Terminus von CaFbFP einem verkürzten Fragment zugeordnet werden (CaFbFP mit V5- und His-Epitiop), für welches eine molekulare Masse von etwa 20 kDa zuzüglich möglicher Glykosylierungen angenommen werden kann.
Bei der Identifizierung von Proteaseschnittstellen wurde in dieser Arbeit mit potentiellen Motiven der Golgi-assoziierten Protease Kex2 begonnen, welche Proteine während der Passage des sekretorischen Wegs C-terminal von dibasischen Aminosäuren schneidet (Fuller *et al*., 1989). Putative Schnittstellen von Kex2 konnten am N-Terminus sowie im zweiten Drittel von CaFbFP identifiziert werden (Abb. 3.13). Nach Entfernung des ersten Motivs durch Mutation konnte die Prozessierung durch Kex2 bereits ausgeschlossen werden (vgl. 3.3.1.7). Ziele zukünftiger Arbeiten könnten somit Untersuchungen zur Beteiligung weiterer Proteasen des sekretorischen Wegs an der Prozessierung von CaFbFP darstellen. Außerdem wären die Isolierung der verkürzten Banden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel sowie anschließende massenspektrometrische Analysen denkbar, um mögliche Schnittstellen innerhalb der CaFbFP-Sequenz zu identifizieren.

4.3.2 Lokalisation von CaFbFP auf der Zelloberfläche von *C. albicans*

Zur Untersuchung der Oberflächenlokalisation von CaFbFP in *C. albicans* wurde ein Expressionsplasmid verwendet, welches in *C. utilis* erfolgreich zur Exposition der *C. antarctica* Lipase CalB auf der Zelloberfläche genutzt wurde (Kunigo *et al*., 2013). Bei Verwendung dieses Systems sollte die Lokalisation von CaFbFP in der Zellwand über einen GPI-Anker vermittelt werden, indem die Signalsequenz des Oberflächenproteins Gas1 aus *C. utilis* zur Translokation in das ER-Lumen N-terminal angehängt wurde. Außerdem wurde das Protein am C-Terminus mit der Gas1-Signalsequenz zur Anheftung eines GPI-Ankers fusioniert. Das Protein Gas1 wurde in *C. utilis* aufgrund seiner Homologie zu Gas1 aus *S. cerevisiae* identifiziert (Kunigo *et al*., 2013). In *S. cerevisiae* verläuft die Translokation von Gas1 in das ER SRP-unabhängig und wird vermutlich über den sogenannten „GET-Weg“ vermittelt (Ast *et al*., 2013). Das Protein wird als Vorläufer synthetisiert und die C-terminale Signalsequenz im ER durch einen GPI-Anker ersetzt, welcher der Integration in die Plasmamembran dient (Nuoffer *et al*., 1993). Dabei erfolgt der Transport dorthin durch Lipid Raft-abhängige Sortierung (Surma *et al*., 2011). Über den Transport von Gas1 in *C. utilis* sowie der Gas1-Homologe Phr1 und Phr2 aus *C. albicans* existieren hingegen bisher noch keine Erkenntnisse.
In dieser Arbeit konnte für eine Transformande des *SS*-2xCa*FbFP*-*GPI*-exprimierenden *C. albicans*-Stamms die Synthese gezeigt werden (Abb. 3.19). Es wurde jedoch keine CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz auf der Oberfläche der *C. albicans*-Zellen verzeichnet (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund hierfür ist ein fehlerhafter Transport von 2xCaFbFP auf die Zelloberfläche, da die verwendeten Gas1-Sequenzen aus der Hefe

C. utilis stammen und in *C. albicans* möglicherweise nicht als Signale für eine korrekte Translokation in das ER sowie das Anhängen eines GPI-Ankers erkannt werden. Diese Annahme wird auch durch die Untersuchungen zur Oberflächenlokalisation von CaYFP gestützt, da auch in diesem Fall keine Fluoreszenz auf der Oberfläche der Zellen detektiert wurde (vgl. 3.3.2.3). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Synthese von SS-CaYFP-GPI in den analysierten Transformanten bisher noch nicht untersucht wurde.
Weiterhin ist es möglich, dass 2xCaFbFP in einer nicht-fluoreszierenden Form in der Zelle vorliegt. Dies würde auch die fehlende intrazelluläre Fluoreszenz, welche bei inkorrektem Transport erwartet würde, erklären. Die Fluoreszenz von 2xCaFbFP könnte zum Beispiel durch Faltungsfehler während der Sekretion oder durch *O*-Glykosylierung beeinflusst sein, wodurch der Kofaktor FMN nicht korrekt gebunden werden kann. Somit kann über die Fluoreszenzfähigkeit von CaFbFP nach Sekretion und Lokalisation auf der Oberfläche von *C. albicans* bisher keine Aussage gemacht werden. In zukünftigen Arbeiten könnte die Fluoreszenz nach Austausch der Signal- und GPI-Sequenz von Gas1 gegen die Sequenzen von Phr1 oder Phr2 aus *C. albicans* analysiert werden. Alternativ könnte CaFbFP an Oberflächenproteine wie Hwp1, Als3 oder Rbt5 aus *C. albicans* fusioniert werden, welche in einer Studie von Mao *et al*. (2003) bereits erfolgreich zur Sekretion und Oberflächenpräsentation von GFP in *C. albicans* verwendet wurden.

4.3.3 Lokalisation von CaFbFP im Kern von Hefezellen

Neben der Untersuchung der Oberflächenlokalisation von CaFbFP wurde auch die Verwendung des Fluoreszenzproteins als Reporter in Zellkernen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* getestet. Die Lokalisation im Zellkern sollte dabei durch Fusion von CaFbFP an das DNA-bindende Histon H2B der jeweiligen Hefe erreicht werden. Histone weisen in Hefe eine N-terminale „Nuclear Localization Sequence“ (NLS) auf, welche den Kernimport durch Importine vermittelt (Mosammaparast *et al*., 2002; Görlich *et al*., 1994). In *S. cerevisiae* wird das Histon H2B beispielsweise durch die Importine Pse1, Kap104, Kap114 und Yrb4 (Kap123) in den Zellkern transportiert (Greiner *et al*., 2004).

Lokalisation von CaFbFP im Zellkern von *S. cerevisiae*

Für die Fusion von CaFbFP an das Histon H2B aus *S. cerevisiae* wurde sowohl das einzelne Fluoreszenzprotein als auch die Tandemversion verwendet, um die Eigenschaften beider Varianten in dieser Fusion charakterisieren zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass beide Fusionsproteine synthetisiert wurden und CaFbFP infolge der Histon-Fusion in Zellkernen von *S. cerevisiae* lokalisiert und dort fluoreszieren kann (Abb. 3.21 & 3.22). Dabei zeigte sich auch, dass H2B-2xCaFbFP, im Gegensatz zu der Fusion mit dem einzelnen Protein, teilweise abgebaut wurde, trotzdem jedoch ein starkes Signal im Immunoblot aufwies. Zudem war die Fluoreszenzintensität von H2B-2xCaFbFP sogar höher als die der Fusion mit 1xCaFbFP, so dass der Abbau die Nachweisbarkeit nicht beeinträchtigt. Die erhöhte Signalstärke der Tandemfusion stimmt somit mit den

Fluoreszenzanalysen der verschiedenen CaFbFP-Varianten im Cytoplasma von *S. cerevisiae* (vgl. Abb. 3.3) überein.

Lokalisation von CaFbFP im Zellkern von *C. albicans* durch Histonfusion

Zur Lokalisation von CaFbFP in Zellkernen von *C. albicans* wurde Ca*FbFP* analog zu den Untersuchungen in *S. cerevisiae* mit dem Gen *HTB1* des Histons H2B aus *C. albicans* fusioniert, wobei nur die doppelte Ca*FbFP*-Variante verwendet wurde. Wie auch bei *S. cerevisiae* beobachtet, wurde H2B-2xCaFbFP teilweise abgebaut, wobei der Großteil des Proteins als scharfe Bande im Immunoblot verzeichnet werden konnte (Abb. 3.24). Die Ergebnisse der Fluoreszenzanalysen zeigten, dass die Histonfusion auch in dieser Hefe, wie gewünscht, zum Transport von CaFbFP in den Zellkern und dortiger Fluoreszenz führt (Abb. 3.25). Somit kann CaFbFP als Reporter in Zellkernen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* verwendet werden.

Bei Expression von *HTB1*-2xCa*FbFP* unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors konnte keine Fluoreszenz detektiert werden, da dieser unter den verwendeten Bedingungen schwächer exprimiert wird als *TDH3p* (vgl. 3.2.4). Dadurch war die 2xCaFbFP-Konzentration wahrscheinlich nicht ausreichend, um die schwache Fluoreszenz des Proteins in *C. albicans* zu detektieren.

mRNA-Markierung von *C. albicans*

Neben der Histonfusion von CaFbFP sollte eine Möglichkeit zur Markierung von Zellkernen in *C. albicans* durch Bindung von CaFbFP an mRNA getestet werden. Dazu wurden in dieser Arbeit vorbereitende Untersuchungen durchgeführt, in denen die generelle Funktionalität eines sogenannten „green-RNA"-Systems in *C. albicans* mit Hilfe von GFP getestet wurde. Das Prinzip der mRNA-Markierung basiert auf einer Fusion aus dem Reporter GFP und dem Mantelprotein des Bakteriophagen MS2 (MS2-CP), welches die Eigenschaft zur Bindung einer spezifischen RNA-Sequenz besitzt (Valegard *et al*., 1994). Die zweite Komponente des Systems besteht aus einer beliebigen mRNA, in welche die RNA-Binderegion für MS2-CP integriert wird. Bei Anwesenheit beider Komponenten bindet GFP-CP an die mRNA und ermöglicht deren Nachweis. In *S. cerevisiae* wurde ein solches System zur Analyse der mRNA des Proteins Ash1 genutzt (Bertrand *et al*., 1998). Die Markierung der mRNA resultierte dabei in der Fluoreszenz der Zellkerne. In dieser Arbeit wurde ein green-RNA-System für die Anwendung in *C. albicans* konstruiert, wobei die CP-Bindesequenz in die mRNA des Transkriptionsfaktors Efg1 eingefügt wurde. Dieser stellt als Hauptregulator der Morphogenese einen wichtigen Virulenzfaktor in *C. albicans* dar (Ernst, 2000).

Analysen des green-RNA-Stamms zeigten Fluoreszenz von GFP, welche auf die Kerne der Zellen beschränkt war (Abb. 3.27). Somit konnte die prinzipielle Funktionalität des Systems erstmalig auch für *C. albicans* gezeigt werden. In weiterführenden Arbeiten soll dieses System zur Markierung der Efg1 mRNA in Hyphenzellen verwendet werden, da hierdurch ein individueller Nachweis der *EFG1*-Transkription für einzelne Kammern des Filaments möglich wäre. Für GFP wird eine Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden

angenommen (Li *et al*., 1998), so dass sich das Protein nicht als Reporter für Studien transienter Genexpression eignet. CaFbFP bietet hingegen möglicherweise Vorteile bei der Analyse wechselnder Genregulation und soll als Ziel zukünftiger Studien anstelle von GFP eingesetzt werden.

4.4 Anwendung von CaFbFP als Biosensor für Sauerstoff

Ein Biosensor setzt sich im Allgemeinen aus einem biologischen Erkennungselement und einem Signalumwandler (Tracer) zusammen, welche die Messung bestimmter Substanzen in einer Probe erlauben. Bei Erkennung einer Substanz kommt es durch den „Tracer" zur Umwandlung in ein elektrisches oder optisches Signal, wobei das Erkennungselement ein Enzym, ein Antikörper, DNA oder eine ganze Zelle sein kann (Rodriguez-Mozaz *et al*., 2006). Alternativ kann diese Signalübertragung infolge eines biologischen Ereignisses wie bei FRET-basierten Biosensoren durch Fluoreszenz zwischen zwei Proteinen erfolgen.
FRET-basierte Biosensoren spielen eine wichtige Rolle bei Analysen diverser zellulärer Prozesse und haben gegenüber Alternativen, wie konjugierten Farbstoffen, den Vorteil, dass sie nicht-invasiv und meist nicht schädlich für die Zelle sind (Li *et al*., 2006). Zudem lassen sich durch die genetische Kodierung Veränderungen nicht nur innerhalb ganzer Populationen, sondern auch auf Einzelzellebene nachverfolgen (Zadran *et al*., 2012).
Neben der Untersuchung von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen, werden solche Sensoren zur Analyse der Konformationsänderung von Proteinen oder der Messung von pH-Bedingungen sowie zellulärer Bestandteile wie Glukose, Saccharose, Calcium oder Wasserstoffperoxid genutzt (Okumoto, 2010).
Zur Messung von molekularem Sauerstoff in der Zelle entwickelten Potzkei *et al*. (2012) den FRET-basierten Sensor FluBO. Dazu wurden der sauerstoffunabhängige Reporter EcFbFP als Donorchromophor und YFP, welches sensitiv auf Sauerstoffmangel reagiert, als Akzeptorchromophor verwendet. Die Autoren konnten zeigen, dass die abgegebene Energie von EcFbFP zur Anregung von YFP genutzt werden kann und die beiden Fluoreszenzproteine ein geeignetes FRET-Paar in *E. coli* darstellen. Außerdem konnten wechselnde O_2-Bedingungen in dem Bakterium durch FluBO dargestellt werden (Potzkei *et al*., 2012).
Bei einem weiteren, nicht auf FRET-basierenden Reportersystem können O_2-Bedingungen in Bakterien- und Säugerzellen durch unterschiedliches Fluoreszenzverhalten von GFP unter Normoxie und Hypoxie widergespiegelt werden (Takahashi *et al*., 2005). Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, dass GFP unter normoxischen Bedingungen eine grüne Fluoreszenz aufweist, wohingegen unter Hypoxie, nach Anregung mit grünem Licht, ein rotes Signal emittiert wird (Elowitz *et al*., 1997). Zudem wurde ein System zum Nachweis von Sauerstofflimitation in *E. coli* auf Grundlage sauerstoffabhängig exprimierter Promotoren entwickelt (Garcia *et al*., 2009). Die genaue Bestimmung von O_2-Konzentrationen ist mit diesen Systemen, im Gegensatz zu dem FRET-basierten FluBO, jedoch nicht möglich, da die Fluoreszenz von GFP und dessen Varianten

sauerstoffabhängig ausgebildet wird und nicht der tatsächlichen Konzentration des Reporters in der Zelle entspricht (Drepper *et al*., 2010; Potzkei *et al*., 2012). Das FRET-basierte System besitzt mit EcFbFP hingegen ein Referenzprotein, welches unter allen O_2-Bedingungen konstant Fluoreszenz aufweist (Drepper *et al*., 2010).
Sauerstoff ist ein wichtiger Faktor für das Zellwachstum, und der Wechsel von normoxischen zu hypoxischen oder anoxischen Bedingungen führt in fakultativ und obligat anaeroben Organismen zu einer veränderten Regulation des Energiemetabolismus. Auch andere Vorgänge, wie bestimmte sauerstoffabhängige Synthese- oder Abbauprozesse, laufen bei Sauerstofflimitation verändert ab (Ward, 2008). Die Anpassung an hypoxische Bedingungen spielt auch für die Virulenz von Humanpathogenen wie *C. albicans* eine wichtige Rolle (Tielker & Ernst, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Verwendung von FbFP als Sauerstoffsensor in den Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* untersucht. Gemäß dem bakteriellen Sensor FluBO wurde eine Proteinfusion, bestehend aus den Hefe-optimierten Proteinen CaFbFP bzw. 2xCaFbFP (*C. albicans*) und CaYFP, konstruiert. CaYFP ist eine gelbe Farbvariante des *A. victoria* GFP, welche für die Anwendung in *C. albicans* durch Einführung der Mutationen V68L und T203Y in das für Hefe optimierte *EGFP*-Gen hergestellt wurde (Gerami-Nejad *et al*., 2001). Die Verbindungssequenz zwischen Ca*YFP* und Ca*FbFP* unterscheidet sich zu der Sequenz in FluBO durch Austausch des CUG-Kodons gegen das Triplett UUG (vgl. Abb. 3.28), um eine korrekte Translation in *C. albicans* zu gewährleisten.

4.4.1 CaFbFP-basierter Sauerstoffsensor in *S. cerevisiae*

Für die Konstruktion von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* wurde die einzelne CaFbFP-Variante genutzt, da diese ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Hefe aufweist und zusätzlich eine geringe Größe (16 kDa) hat. Nach Plasmid-basierter Konstruktion der Fusion unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors konnte die Synthese von CaYFP-CaFbFP durch Immunoblot-Analysen gezeigt werden (Abb. 3.29). Die entsprechende Bande wurde etwas höher detektiert als erwartet, allerdings lief auch die Bande von CaYFP des Kontrollstamms (THY.AP4[pOXY1]) etwa 5 kDa über der theoretisch angenommenen molekularen Masse. Somit scheint das abweichende Laufverhalten nicht aus einer veränderten Größe von CaYFP-CaFbFP, sondern der Auftrennung im Gel in diesem Bereich zu resultieren. Wie auch bei der Histonfusion von CaFbFP in *S. cerevsiae* und *C. albicans* (4.3.3) war hier ein partieller Abdau des Fusionsproteins zu erkennen. Da die Mengen prozessierten Proteins jedoch nur sehr gering waren, konnte dies für die weiteren Untersuchungen vernachlässigt werden.
Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass die Fluoreszenz von CaFbFP und CaYFP durch die Fusion nicht beeinträchtigt wurde und CaYFP-CaFbFP auch unter anaeroben Bedingungen CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz emittierte (Abb. 3.30). Zudem konnte die erfolgreiche Energieübertragung zwischen CaFbFP und CaYFP in ganzen Zellen von *S. cerevisiae* erwiesen werden, was die Funktionalität des FRET-Systems in Hefe zeigte. Nach Anregung von CaFbFP in Ca*YFP*-Ca*FbFP*-exprimierenden Zellen

wurde ein Spektrum mit einem Maximum bei 530 nm verzeichnet (Abb. 3.31 A), was dem Emissionsmaximum von YFP (Abb. 4.1 B) entspricht. Gleichzeitig wurde ungebundenes CaYFP durch die verwendete Wellenlänge nicht angeregt. Ein typisches Emissionsspektrum von YFP zeichnet sich durch einen steilen Anstieg der Kurve ab 500 nm sowie einem Maximum bei 527 nm aus (McAnaney *et al*., 2005). Bei CaYFP-CaFbFP ist im Vergleich dazu bereits ab 470 nm ein Anstieg der Emission zu beobachten (Abb. 4.1 A). Dies ist mit der Fluoreszenz von CaFbFP selbst zu begründen, welche bereits bei 470 nm detektiert werden kann (Abb. 4.1 A). Bei der Energieübertragung mittels FRET gibt das Donorchromophor nicht die vollständige Lichtenergie an das Akzeptorchromophor ab, sondern ein Teil der Energie wird als Fluoreszenz emittiert und kann somit ebenfalls gemessen werden (Gordon *et al*., 1998). Die Charakteristika des Emissionsspektrums von CaYFP-CaFbFP gleichen außerdem dem Spektrum des prokaryotischen FluBO (Abb. 4.1 C), was die Funktionalität von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* zusätzlich bestätigt. Auch in Rohextrakten von *S. cerevisiae* konnte die Funktionalität des Systems gezeigt werden (Abb. 9.2). Die Emissionskurven wiesen die gleichen Charakteristika wie die ganzer Zellen auf.

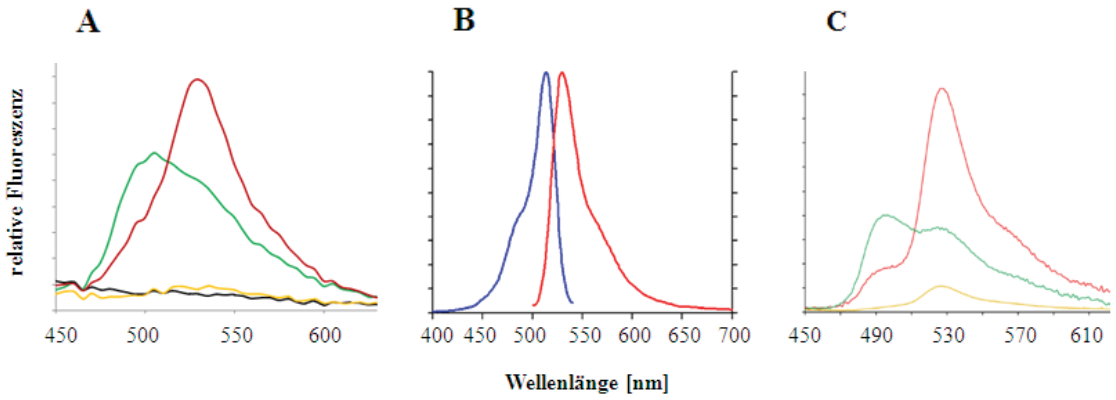


Abb. 4.1: Emissionsspektren von CaYFP-CaFbFP, YFP und FluBO. A: Emissionsspektren verschiedener *S. cerevisiae*-Stämme mit CaFbFP (grün), CaYFP (gelb), CaYFP-CaFbFP (rot) bzw. einem Kontrollstamm (Leerplasmid, schwarz) nach Anregung bei 380 nm (vgl. Abb. 3.31 A). B: typisches Anregungs- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von YFP (modifiziert aus: Homepage der Carl Zeiss AG). C: Emissionsspektren verschiedener *E. coli*-Stämme mit EcFbFP (grün), YFP (gelb) und FluBO (rot) (Potzkei *et al*., 2012, modifiziert).

Da ungebundenes CaYFP nach Anregung bei einer Wellenlänge von 380 nm erwartungsgemäß keine Fluoreszenz aufwies, wurde durch separate Anregung bei 500 nm (Anregungsmaximum von YFP) die Funktionalität des Ca*YFP*-Konstrukts (pOXY1) gezeigt (Abb. 3.31 B). Diese Messungen ließen zudem erkennen, dass CaYFP in Fusion mit CaFbFP eine mehr als doppelt so hohe Fluoreszenzintensität aufweist wie das ungebundene Protein. Für CaFbFP wurde unter diesen Bedingungen hingegen, wie

erwartet, kaum Fluoreszenz detektiert. Somit scheint die Fluoreszenz von CaYFP durch die Fusion begünstigt zu werden.

Das Emissionsspektrum von CaYFP-CaFbFP ändert sich infolge unterschiedlicher Sauerstoffbedingungen

Neben der generellen Funktionalität von CaYFP-CaFbFP in *S. cerevisiae* wurde zudem der Einsatz der Fusion als Biosensor für Sauerstoff untersucht. Dazu wurde die Fluoreszenz der Stämme unter verschiedenen O_2-Bedingungen (0,2, 4, 10 %) bestimmt. Es wurde deutlich, dass sich das Emissionsspektrum von CaYFP-CaFbFP mit abnehmender O_2-Konzentration immer mehr dem Verlauf der CaFbFP-assoziierten Kurve anglich (Abb. 3.32). Das Spektrum von CaFbFP blieb hingegen bei allen Bedingungen unverändert. Reporter der GFP-Familie sind unter stark hypoxischen und anoxischen Bedingungen nicht mehr in der Lage, zu fluoreszieren (Heim *et al*., 1994), so dass bei einer O_2-Konzentration von 0,2 % lediglich CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz verzeichnet wurde (Abb. 3.32). Das Verhältnis der Fluoreszenz von YFP zu dem CaFbFP-Signal stieg mit zunehmender O_2-Konzentration und ermöglichte die Aufnahme einer Eichgeraden (Abb. 3.33). Die daraus ermittelte Formel dient der Berechnung unbekannter O_2-Konzentrationen anhand der CaYFP-CaFbFP-vermittelten Fluoreszenz und könnte unter Beibehaltung der Versuchsbedingungen in zukünftigen Studien genutzt werden. Bei gleicher Vorgehensweise ließe sich das im Folgenden YFOS („Yeast Fluorescent Oxygen Sensor“) genannte System außerdem für andere Bedingungen eichen und in diversen Analysen der O_2-Bedingungen in *S. cerevisiae*-Zellen anwenden. Dabei würde sich der Sensor besonders für die Erforschung sauerstoffabhängiger Prozesse sowie der Anpassung von Hefen an wechselnde O_2-Konzentrationen eignen. Außerdem könnte YFOS zur Kontrolle der O_2-Bedingungen in biotechnologischen Prozessen genutzt werden.

pH-Stabilität von YFOS

Bei der Verwendung FRET-basierter Biosensoren ist zu beachten, dass die Fluoreszenzeigenschaften durch Umweltbedingungen verändert werden können. Der Einfluss wechselnder pH-Bedingungen auf die Fluoreszenz von YFOS wurde in dieser Arbeit parallel zu den Untersuchungen der pH-Toleranz von CaYFP und CaFbFP (vgl. 4.2) analysiert. Es zeigte sich eine ähnliche pH-Sensitivität von YFOS wie für CaYFP beobachtet, wobei die Fusion mit CaFbFP zu einer Stabilisierung von CaYFP im sauren pH-Bereich führte (Abb. 3.5). So wurde zwischen pH 3,5 und 4,5 keine Fluoreszenz für CaYFP detektiert, wohingegen YFOS in diesem pH-Bereich ein schwaches Fluoreszenzsignal (10 %) aufwies. Die Sensitivität von Reportern der GFP-Familie gegenüber sauren pH-Bedingungen ist durch Anlagerung von Wasserstoffatomen an das Chromophor bedingt, welches in der protonierten Form nicht mehr in der Lage ist, Fluoreszenz zu emittieren (Elsliger *et al*., 1999). Durch Fusion an CaFbFP wird das CaYFP-Chromophor möglicherweise vor dem Angriff durch Protonen geschützt und läge so auch bei saurem pH-Wert noch in der deprotonierten, fluoreszierenden Form vor.

Ein stabilisierender Effekt durch Fusion mit FbFPs konnte auch in *A. thaliana* beobachtet werden (Scholz *et al*., 2013). Dort wurde die Aktivität und Stabilität des Enzyms Hydroxynitrillyase im sauren pH-Bereich (4,5-5) durch Anhängen eines EcFbFP-Proteins stabilisiert. Die veränderten Eigenschaften des Proteins wurden in dieser Studie auf eine abweichende Quartärstruktur zurückgeführt.

4.4.2 CaFbFP-basierter Sauerstoffsensor in *C. albicans*

Wie bereits erwähnt, spielt die schnelle Anpassungsfähigkeit an wechselnde Sauerstoffbedingungen eine große Rolle für die Virulenz der fakultativ humanpathogenen Hefe *C. albicans*. So führen hypoxische Bedingungen, wie sie in Organen oder tieferen Gewebsschichten des menschlichen Körpers vorherrschen, zu morphologischer Veränderung des Pilzes, was die Kolonialisierung dieser Regionen begünstigt (Setiadi *et al*., 2006). Auch die ATP-Produktion wird sauerstoffabhängig durch abweichende Regulation des oxidativen Metabolismus sowie glykolytischer Gene reguliert (Setiadi *et al*., 2006). Für die Erforschung sauerstoffabhängiger Prozesse würde somit ein FRET-basierter Sauerstoffsensor auch in *C. albicans* von großem Vorteil sein. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität FRET-basierter YFOS-Varianten getestet.

In *C. albicans* wurden sowohl Ca*YFP*-Ca*FbFP* (YFOS), als auch eine Variante mit dem doppelten Ca*FbFP* unter Kontrolle des *TDH3*-Promotors, kloniert. Die Ergebnisse der Immunoblot-Analysen zeigten die Synthese beider Fusionen in *C. albicans*, wobei die Proteinmenge von CaYFP-2xCaFbFP deutlich höher war als die von CaYFP-CaFbFP (Abb. 3.36). Dies lässt sich durch die geringe Stabilität des einzelnen Proteins in *C. albicans* begründen, welche zuvor bereits für ungebundenes CaFbFP gezeigt wurde (vgl. Abb. 3.7). Die Proteinstabilität wird allerdings durch die Fusion mit CaYFP erhöht, da für CaYFP-CaFbFP im Gegensatz zu CaFbFP ein deutliches Signal im Immunoblot detektiert werden konnte. Die geringen Proteinmengen von CaFbFP und CaYFP-CaFbFP spiegelten sich in den aufgenommen Emissionsspektren wieder. So wurde für beide Proteine kaum Fluoreszenz beobachtet (Abb. 3.37). Die Proteinmenge von CaYFP in den Rohextrakten erwies sich ebenfalls als sehr gering, so dass diese Proben für die weiteren Analysen nicht verwendet wurden. Da CaYFP lediglich als Negativkontrolle diente, war die Verwendung der CaYFP-haltigen Rohextrakte aus *S. cerevisiae* ausreichend.

Bei der Aufnahme der Emissionsspektren wurde, abweichend von den Untersuchungen in *E. coli* (Potzkei *et al*., 2012) und *S. cerevisiae* (3.4.1.4), eine Anregungswellenlänge von 430 nm verwendet, welche die Effizienz der Energieübertragung zwischen CaFbFP und CaYFP in *C. albicans* erhöhte (vgl. 3.4.2.3). Dabei konnte unerwünschte Anregung von CaYFP auch unter Verwendung dieser Wellenlänge ausgeschlossen werden (Abb. 3.37). CaYFP-2xCaFbFP wies deutliche Fluoreszenz auf und lies, im Vergleich zu der Kurve von 2xCaFbFP, eine Verschiebung in Richtung CaYFP-vermittelter Fluoreszenz erkennen. Die Verschiebung des Spektrums stellte sich nicht so deutlich ausgeprägt dar wie in *S. cerevisiae*, was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, dass die Fluoreszenz von CaFbFP in *C. albicans* schwächer ist als in *S. cerevisiae*. Jedoch liegt das Maximum der

Emissionskurve von CaYFP-2xCaFbFP bei 525 nm, was die erfolgreiche Energieübertragung zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen und somit die generelle Funktionalität des entwickelten FRET-Systems (YFOS-2) in *C. albicans* bestätigt. Zur Verwendung von YFOS-2 als Sauerstoffsensor sollten analog zu *S. cerevisiae* zukünftig Aufnahmen von Emissionspektren bei unterschiedlichen O_2-Bedingungen erfolgen.

4.4.3 Oberflächenpräsentation von YFOS in *S. cerevisiae*

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, das YFOS-Fusionsprotein auf der Zelloberfläche zu lokalisieren, um Änderungen der O_2-Konzentration in der Umgebung zu bestimmen.

Die generelle Funktionalität des FRET-Systems auf der Hefezelloberfläche wurde zunächst in *S. cerevisiae* untersucht. Dazu wurde wie zuvor das Aga2-basierte System zur Oberflächenpräsentation von Proteinen verwendet (vgl. 4.3.1). Die Fluoreszenzanalysen von *S. cerevisiae*-Zellen zeigten, dass YFOS sowie das zur Kontrolle fusionierte CaYFP erfolgreich auf die Oberfläche transportiert wurden und dort Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 3.41). Zur Untersuchung der Energieübertragung zwischen CaYFP und CaFbFP wurden auch hier Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm aufgenommen. Diese zeigten, dass das YFOS FRET-System auch auf der Oberfläche funktionell ist (Abb. 3.40), jedoch fand die Energieübertragung von CaFbFP auf CaYFP eingeschränkt statt. So wurde nach Anregung von CaFbFP, neben der CaYFP-vermittelten Emission, auch ein starkes CaFbFP-Signal detektiert, wodurch die Kurve kein definiertes Maximum bei 530 nm (CaYFP) aufwies. Im Gegensatz zur cytoplasmatischen Lokalisation der Fusion, wurde ein Großteil der Energie nicht auf CaYFP übertragen, sondern direkt in Form CaFbFP-vermittelter Fluoreszenz (500 bzw. 505 nm) abgegeben. Vor der Oberflächenpräsentation durchläuft das Protein den Sekretionsweg der Zelle, wodurch Modifikationen wie die *O*-Glykosylierung von Aga2 (Cappellaro *et al*., 1991) oder der Fluoreszenzproteine selbst erfolgen und die Energieübertragung beeinflussen können. Die Immunoblot-Analysen bestätigten die Glykosylierung des Fusionsproteins (Abb. 3.39). Hier wurden diffuse Banden detektiert, welche die verschiedenen Glykosylierungsstufen der Fusion repräsentieren. Da die Anzahl tatsächlich modifizierter Ser-/Thr-Reste an Aga2 unklar ist (Cappellaro *et al*., 1991), kann anhand des Bandenmusters keine Aussage über mögliche Glykosylierung von CaFbFP und CaYFP gemacht werden. Um den Einfluss der Glykosylierung auf die Energieübertragung zu untersuchen, könnten *O*-glykosidische Bindungen in weiterführenden Untersuchungen vor der Aufnahme von Emissionsspektren entfernt werden.

Bei den Immunoblot-Analysen CaFbFP-assoziierter Proteine fiel in der Spur von Aga2-CaYFP-CaFbFP außerdem eine verkürzte Form des Proteins auf der gleichen Höhe wie Aga2-CaFbFP auf (Abb. 3.39). Diese Bande konnte bei dem Nachweis von CaYFP hingegen nicht verzeichnet werden. Da CaYFP zwischen Aga2 und CaFbFP fusioniert wurde, ist die Zuordnung dieser Bande bisher unklar. Wenn es sich dabei um Aga2-

CaFbFP handeln sollte, würde sich dadurch die hohe CaFbFP-vermittelte Fluoreszenz in Rohextrakten mit Aga2-CaYFP-CaFbFP erklären.
Die Exposition von YFOS auf der Zelloberfläche würde sich bei Anwendung in *C. albicans* beispielsweise zur Bestimmung der O_2-Konzentrationen in bestimmten Geweben eignen, welche von der Hefe besiedelt werden. Hier wäre die Messung der O_2-Bedingungen in Phagozyten in einem *C. albicans*-Infektionsmodell von besonderem Interesse. Die Aufnahme von *C. albicans*-Zellen durch diese Immunzellen ist Teil der Reaktion des menschlichen Immunsystems auf Infektionen mit der Hefe (Vasquez-Torres & Balish, 1997), jedoch sind die O_2-Bedingungen innerhalb dieser „Fresszellen“ bisher unklar (Tielker & Ernst, 2009).

5 Zusammenfassung

Apathogene Pilze wie der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* werden in der Grundlagenforschung und für biotechnologische Anwendungen genutzt, während der humanpathogene Pilz *Candida albicans* dem menschlichen Wirt durch schwere Infektionen schadet. Die Anpassung an sauerstofflimitierende Umgebungen ist für das Wachstum beider Typen der Pilze von Bedeutung. Da verfügbare Fluoreszenzreporter, wie das „Grün Fluoreszierende Protein“ (GFP) und dessen Varianten, nur unter aeroben Bedingungen emittieren, wurde in dieser Arbeit die Verwendung des sauerstoff-unabhängigen „*C. albicans* Flavinmononukleotid-basierten Fluoreszenzproteins“ (CaFbFP) als Reporterprotein in *S. cerevisiae* und *C. albicans* etabliert.

Die Fluoreszenzintensität von CaFbFP konnte durch Mehrfachfusionen des Proteins erhöht werden. So führte eine Tandemfusion aus zwei CaFbFP-Proteinen (2xCaFbFP) bei *S. cerevisiae* zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität und bei *C. albicans* verstärkte eine vierfache Fusion (4xCaFbFP) die Intensität ebenfalls deutlich. Unter Verwendung der Tandemfusionen 2xCaFbFP und 4xCaFbFP wurde die Fluoreszenz des Proteins erstmals in Einzelzellen von *C. albicans* gezeigt. In Analysen der pH-abhängigen Fluoreszenz generierte CaFbFP im Gegensatz zu dem Referenzprotein CaYFP auch im sauren pH-Bereich signifikante Fluoreszenz.

Neben seiner Lokalisation und Funktion im Cytoplasma wurde die Aktivität von CaFbFP in verschiedenen Hefezellkompartimenten untersucht. Ein Fusionsprotein, bestehend aus CaFbFP und Histon H2B, war in Zellkernen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* lokalisiert und wurde durch seine Fluoreszenz nachgewiesen. Um die Sekretion und Oberflächen-lokalisation von CaFbFP in Hefen zu erreichen, wurden Transformanden von *S. cerevisiae* konstruiert, die eine Fusion aus dem Zellwand-assoziierten Aga2-Protein und CaFbFP synthetisieren. Die Biosynthese, Lokalisation an der Zelloberfläche und die Fluoreszenz dieses Fusionsproteins konnten nachgewiesen werden. Immunoblot-Analysen ließen außerdem eine partielle Prozessierung der Aga2-CaFbFP-Fusion erkennen, wobei eine proteolytische Schnittstelle im N-terminalen Bereich von CaFbFP vermutet wird. Die Beteiligung der Protease Kex2 konnte durch Mutation eines potentiellen Kex2-Erkennungsmotivs ausgeschlossen werden.

Zur Analyse sauerstoffabhängiger Prozesse in Hefe wurden Expressionsvektoren für Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) -basierte Sauerstoff-Sensoren konstruiert (YFOS, Yeast Fluorescent Oxygen Sensor). Diese Sensoren sind Fusionsproteine, bestehend aus dem sauerstoffunabhängigen Donorchromophor CaFbFP (*S. cerevisiae*) bzw. 2xCaFbFP (*C. albicans*) und dem sauerstoffabhängigen Akzeptorprotein CaYFP. In Transformanden von *S. cerevisiae* und *C. albicans* wurde durch Immunoblot- und Fluoreszenzanalysen die Funktionalität dieser FRET-Systeme gezeigt. Bei *S. cerevisiae*-Transformanden wurde der YFOS-Sensor durch Fluoreszenzmessungen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kalibriert und erwies sich als geeignet, intrazelluläre Sauerstoff-konzentrationen zu bestimmen. Fluoreszenzanalysen erbrachten außerdem den Nachweis, dass das YFOS Sensor-System bei *S. cerevisiae* auf der Zelloberfläche lokalisiert werden kann und dort funktionell ist. Möglicherweise könnte die Aktivität eines solchen FRET-Systems auf der Zelloberfläche von *C. albicans* daher Aufschluss über Sauerstoff-bedingungen im menschlichen Wirt geben.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass das CaFbFP-Protein als fluoreszierender Reporter unter hypoxischen Bedingungen in Hefen genutzt werden kann und dadurch neue Möglichkeiten für die Erforschung hypoxischer Prozesse in diesen eukaryotischen Organismen bietet.

6 Summary

Apathogenic fungi like the model organism *Saccharomyces cerevisiae* are used in basic research and for biotechnological purposes, while the human pathogenic fungus *Candida albicans* affects the human host by severe infections. The adaption to oxygen-limited environments is of importance for both types of fungi. Because available fluorescence reporters like the "Green Fluorescent Protein" (GFP) and its variants emit only under aerobic conditions, the use of oxygen-independent „*C. albicans* Flavin-mononucleotide-based Fluorescent Protein" (CaFbFP) was established in this dissertation as a reporter protein in *S. cerevisiae* and *C. albicans*.

The fluorescence intensity of CaFbFP could be increased by multiple fusions of the protein. Thus, in *S. cerevisiae*, a tandem fusion of two CaFbFP proteins (2xCaFbFP) led to an increase of fluorescence intensity, while in *C. albicans*, a fourfold fusion (4xCaFbFP) also enhanced the intensity significantly. Using the tandem fusions 2xCaFbFP and 4xCaFbFP the fluorescence of the protein was shown for the first time in single cells of *C. albicans*. In analyses of the pH-dependent fluorescence CaFbFP generated significant fluorescence also in the acidic pH-range in contrast to the reference protein CaYFP.

Besides its localization and functionality in the cytoplasm the activity of CaFbFP was investigated in different yeast cell compartments. A fusion protein consisting of CaFbFP and histone H2B was located in the nuclei of *S. cerevisiae* and *C. albicans* and was detected by its fluorescence. To achieve secretion and surface localization of CaFbFP in yeast *S. cerevisiae* transformants were constructed that synthesized a fusion of the cell wall-associated Aga2 protein to CaFbFP. Biosynthesis, localization on the cell surface and fluorescence of the fusion protein could be shown. Additionally, immunoblot analyses revealed partial processing of the Aga2-CaFbFP fusion, which presumably was due to a proteolytic cleavage site located in the N-terminal part of CaFbFP. Involvement of the protease Kex2 could be excluded by mutation of a potential Kex2 recognition motif.

To analyze oxygen-dependent processes in yeast, expression vectors for fluorescence resonance energy transfer (FRET) –based oxygen-sensors (YFOS, Yeast Fluorescent Oxygen Sensor) were constructed. These sensors are fusion proteins consisting of the oxygen-independent donor chromophore CaFbFP (*S. cerevisiae*) and 2xCaFbFP (*C. albicans*), respectively, and the oxygen-dependent acceptor chromophore CaYFP. The functionality of these FRET systems could be shown in transformants of *S. cerevisiae* and *C. albicans* by immunoblot and fluorescence analyses. In *S. cerevisiae* transformants the YFOS sensor was calibrated by fluorescence measurements at different oxygen concentrations and was found to be suitable for the determination of intracellular oxygen concentrations. Furthermore, fluorescence analyses provided evidence that the YFOS sensor system can be located and be functional on the yeast cell surface. Possibly, the activity of such a FRET-based system on the cell surface of *C. albicans* will provide information on oxygen conditions in the human host.

In summary, the results show that the CaFbFP protein can be used as fluorescent reporter under hypoxic conditions in yeasts, thus offering new possibilities for research of hypoxic processes in these eukaryotic organisms.

7 Literaturverzeichnis

Abbas, C. A. & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**, 321-360.

Anderson, J., Cundiff, L., Schnars, B., Gao, M. X., Mackenzie, I. & Soll, D. R. (1989). Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect Immun* **57**, 458-467.

Aravind, L. & Koonin, E. V. (2000). The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol* **10**, R53-55.

Ast, T., Cohen, G. & Schuldiner, M. (2013). A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **152**, 1134-1145.

Ávila-Pérez, M., Hellingwerf, K. J. & Kort, R. (2006). Blue light activates the σB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* **188**, 6411-6414.

Awais, M., Sato, M., Lee, X. & Umezawa, Y. (2006). A fluorescent indicator to visualize activities of the androgen receptor ligands in single living cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 2707-2712.

Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G. & Miyazaki, S. (2001). Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 457-462.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T. & other authors (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.

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.

Becker, J., Walter, W., Yan, W. & Craig, E. A. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol Cell Biol* **16**, 4378-4386.

Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V. & Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* **3**, 281-286.

Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D. & Frommer, W. B. (2010). Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. *Biochem J* **432**, 399-406.

Bernardi, A. & Spahr, P. F. (1972). Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3033-3037.

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H. & Long, R. M. (1998). Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**, 437-445.

Bidlingmaier, S. & Liu, B. (2011). Construction of yeast surface-displayed cDNA libraries. *Methods Mol Biol* **729**, 199-210.

Bitter, G. A., Egan, K. M., Burnette, W. N., Samal, B., Fieschko, J. C., Peterson, D. L., Downing, M. R., Wypych, J. & Langley, K. E. (1988). Hepatitis B vaccine produced in yeast. *J Med Virol* **25**, 123-140.

Bitterman, K. J., Medvedik, O. & Sinclair, D. A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 376-399.

Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**, 852-862.

Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (2000). Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol* **328**, 430-444.

Bonhomme, J., Chauvel, M., Goyard, S., Roux, P., Rossignol, T. & d'Enfert, C. (2011). Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **80**, 995-1013.

Botstein, D., Falco, S. C., Stewart, S. E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W. (1979). Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**, 17-24.

Botstein, D., Chervitz, S. A. & Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* **277**, 1259-1260.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Braliou, G. G., Venieris, E., Kalousi, A. & Simos, G. (2006). Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1alpha effectors. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 1289-1296.

Breeden, L. L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr Biol* **13**, R31-38.

Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. & Rao, R. (2005). The yeast endosomal Na+K+/H+ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **16**, 1396-1405.

Briggs, W. R. & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **7**, 204-210.

Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J. & Brown, C. M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc* **8**, 265-281.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G. & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**, 165rv113.

Brown, J. M. & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **4**, 437-447.

Buttani, V., Losi, A., Eggert, T., Krauss, U., Jaeger, K. E., Cao, Z. & Gartner, W. (2007). Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochem Photobiol Sci* **6**, 41-49.

Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7877-7882.

Cappellaro, C., Hauser, K., Mrsa, V., Watzele, M., Watzele, G., Gruber, C. & Tanner, W. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J* **10**, 4081-4088.

Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R. & Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13**, 4737-4744.

Caras, I. W., Weddell, G. N., Davitz, M. A., Nussenzweig, V. & Martin, D. W., Jr. (1987). Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science* **238**, 1280-1283.

Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1239-1253.

Casadaban, M. J., Martinez-Arias, A., Shapira, S. K. & Chou, J. (1983). Beta-galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol* **100**, 293-308.

Cha, H. J., Choi, S. S., Yoo, Y. J. & Bentley, W. E. (1997). Enhancement of production of cloned glucoamylase under conditions of low aeration from recombinant yeast using a *SUC2* promoter. *Process Biochemistry* **32**, 679-684.

Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. (2012). *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses* **55**, 46-57.

Chang, D. Y., Newitt, J. A., Hsu, K., Bernstein, H. D. & Maraia, R. J. (1997). A highly conserved nucleotide in the Alu domain of SRP RNA mediates translation arrest through high affinity binding to SRP9/14. *Nucleic Acids Res* **25**, 1117-1122.

Chapman, S., Faulkner, C., Kaiserli, E., Garcia-Mata, C., Savenkov, E. I., Roberts, A. G., Oparka, K. J. & Christie, J. M. (2008). The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20038-20043.

Chen, X., Nielsen, K. F., Borodina, I., Kielland-Brandt, M. C. & Karhumaa, K. (2011). Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol Biofuels* **4**, 21.

Chook, Y. & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 703-715.

Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-45.

Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* **90**, 1103-1163.

Clark-Walker, G. D. & Miklos, G. L. (1974). Localization and quantification of circular DNA in yeast. *Eur J Biochem* **41**, 359-365.

Clarke, L. & Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* **287**, 504-509.

Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-1218.

Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. & Bron, C. (1988). A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J* **7**, 2233-2240.

Cook, J. C., Joyce, J. G., George, H. A. & other authors (1999). Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **17**, 477-484.

Coralli, C., Cemazar, M., Kanthou, C., Tozer, G. M. & Dachs, G. U. (2001). Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res* **61**, 4784-4790.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.

Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S. & Brown, A. J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143 (Pt 2)**, 303-311.

Crosson, S. & Moffat, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2995-3000.

Crosson, S., Rajagopal, S. & Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 448-455.

Cullen, P. J. & Sprague, G. F., Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13619-13624.

Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.

Cyr, D. M. (1995). Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett* **359**, 129-132.

Davies, A. N., Brailsford, S., Broadley, K. & Beighton, D. (2002). Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* **17**, 79-84.

Day, R. N., Periasamy, A. & Schaufele, F. (2001). Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interactions in the living cell nucleus. *Methods* **25**, 4-18.

Day, R. N. & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* **38**, 2887-2921.

Dechant, R., Binda, M., Lee, S. S., Pelet, S., Winderickx, J. & Peter, M. (2010). Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J* **29**, 2515-2526.

Demchenko, A. P. (2008). Förster Resonance Energy Transfer in: Introduction to Fluorecent Sensing. *Springer Verlag*, 91-99.

Denning, D. W., Baily, G. G. & Hood, S. V. (1997). Azole resistance in *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**, 261-280.

Dingwall, C. & Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-481.

Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Honer, C. B. & Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692.

Dongari-Bagtzoglou, A., Kashleva, H., Dwivedi, P., Diaz, P. & Vasilakos, J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* **4**, e7967.

Dorn, M., Jurk, M., Wartenberg, A., Hahn, A. & Schmieder, P. (2013). LOV Takes a Pick: Thermodynamic and Structural Aspects of the Flavin-LOV-Interaction of the Blue-Light Sensitive Photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **8**, e81268.

Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**, 30-36.

Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F. & other authors (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**, 443-445.

Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A. K., Buchs, J. & Jaeger, K. E. (2010). Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5990-5994.

Drepper, T., Gensch, T. & Pohl, M. (2013). Advanced *in vivo* applications of blue light photoreceptors as alternative fluorescent proteins. *Photochem Photobiol Sci* **12**, 1125-1134.

Dworetzky, S. I., Lanford, R. E. & Feldherr, C. M. (1988). The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *J Cell Biol* **107**, 1279-1287.

Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V. & Tanner, W. (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**, 11523-11529.

Eichhof, I. (2008). Reporterfusionen zur Charakterisierung der Zelldifferenzierung von *Candida albicans*. Masterarbeit.

Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J. & Leibler, S. (1997). Photoactivation turns green fluorescent protein red. *Curr Biol* **7**, 809-812.

Elsliger, M. A., Wachter, R. M., Hanson, G. T., Kallio, K. & Remington, S. J. (1999). Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**, 5296-5301.

Enenkel, C., Blobel, G. & Rexach, M. (1995). Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* **270**, 16499-16502.

Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146 (Pt 8)**, 1763-1774.

Ernst, J. F. & Tielker, D. (2009). Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cell Microbiol* **11**, 183-190.

Esposito, A., Gralle, M., Dani, M. A., Lange, D. & Wouters, F. S. (2008). pHlameleons: a family of FRET-based protein sensors for quantitative pH imaging. *Biochemistry* **47**, 13115-13126.

Fehr, M., Frommer, W. B. & Lalonde, S. (2002). Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9846-9851.

Fehrenbacher, G., Perry, K. & Thorner, J. (1978). Cell-cell recognition in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of mating-specific adhesion. *J Bacteriol* **134**, 893-901.

Fiechter, A., Fuhrmann, G. F. & Kappeli, O. (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol* **22**, 123-183.

Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L. M., Zhang, J., Kim, K. & Verkhusha, V. V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* **29**, 757-761.

Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75.

Fuller, R. S., Brake, A. J. & Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-486.

Garcia, J. R., Cha, H. J., Rao, G., Marten, M. R. & Bentley, W. E. (2009). Microbial nar-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microb Cell Fact* **8**, 6.

Gerami-Nejad, M., Berman, J. & Gale, C. A. (2001). Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast* **18**, 859-864.

Gerami-Nejad, M., Dulmage, K. & Berman, J. (2009). Additional cassettes for epitope and fluorescent fusion proteins in *Candida albicans*. *Yeast* **26**, 399-406.

Ghannoum, M. A., Spellberg, B., Saporito-Irwin, S. M. & Fonzi, W. A. (1995). Reduced virulence of *Candida albicans PHR1* mutants. *Infect Immun* **63**, 4528-4530.

Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A. & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* **6**, e1000713.

Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224.

Gietz, R. D. & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87-96.

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. & Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol* **179**, 4992-4999.

Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.

Giniger, E., Varnum, S. M. & Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of *GAL4*, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**, 767-774.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H. & other authors (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.

Goins, T. L. & Cutler, J. E. (2000). Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Clin Microbiol* **38**, 2862-2869.

Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B. & Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* **74**, 2702-2713.

Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. & Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**, 767-778.

Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. & Hartmann, E. (1996). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* **15**, 1810-1817.

Görlich, D. & Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-660.

Gould, S. J. & Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* **175**, 5-13.

Gow, N. A., Brown, A. J. & Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**, 366-371.

Greiner, M., Caesar, S. & Schlenstedt, G. (2004). The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur J Cell Biol* **83**, 511-520.

Griffiths, G. & Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443.

Hall, R. A. & Gow, N. A. (2013). Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition. *Mol Microbiol*.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

Harsay, E. & Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**, 297-310.

Hart, R. C., Stempel, K. E., Boyer, P. D. & Cormier, M. J. (1978). Mechanism of the enzyme-catalyzed bioluminescent oxidation of coelenterate-type luciferin. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 980-986.

Hauser, K. & Tanner, W. (1989). Purification of the inducible alpha-agglutinin of S. *cerevisiae* and molecular cloning of the gene. *FEBS Lett* **255**, 290-294.

Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C. E. & Robbins, P. W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: *MNT1* encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in *O*-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6846-6850.

Hawser, S. P. & Douglas, L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2128-2131.

Hayette, M. P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D. W. & Poulain, D. (1992). Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans O*-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol* **30**, 411-417.

Hecker, M. & Völker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**, 35-91.

Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12501-12504.

Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.

Heim, R. & Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**, 178-182.

Helenius, A. & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of *N*-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.

Herscovics, A. & Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J* **7**, 540-550.

Herscovics, A. (1999). Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 275-285.

Höckel, M. & Vaupel, P. (2001). Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol* **28**, 36-41.

Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. & Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis NPH1*: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.

Hube, B. (2004). From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 336-341.

Hwang, C. S., Choi, E. S., Han, S. S. & Kim, G. J. (2012). Screening of a highly soluble and oxygen-independent blue fluorescent protein from metagenome. *Biochem Biophys Res Commun* **419**, 676-681.

Izadi, M., Abiri, M. & Keramatipour, M. (2009). Producing a Mammalian GFP Expression Vector Containing Neomycin Resistance Gene. *Avicenna J Med Biotechnol* **1**, 33-36.

Jansone, I., Berzin, V., Gribanov, V. & Gren, E. J. (1979). The regulatory region of MS2 phage RNA replicase cistron. III. Characterization of fragments resulting from S1 nuclease digestion. *Nucleic Acids Res* **6**, 1747-1760.

Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8447-8451.

Johnson, A. E. & van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 799-842.

Jones, D. P. (1986). Intracellular diffusion gradients of O_2 and ATP. *Am J Physiol* **250**, C663-675.

Joshi, K. R., Solanki, A. & Prakash, P. (1993). Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* **36**, 48-52.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. & Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**, 1075-1089.

Kadir, T., Pisiriciler, R., Akyuz, S., Yarat, A., Emekli, N. & Ipbuker, A. (2002). Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil* **29**, 452-457.

Kang, H. A., Kim, S. J., Choi, E. S., Rhee, S. K. & Chung, B. H. (1998). Efficient production of intact human parathyroid hormone in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in yeast aspartic protease 3 (*YAP3*). *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 187-192.

Keppler-Ross, S., Noffz, C. & Dean, N. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics* **179**, 705-710.

Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. & Shimazaki, K.-i. (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660.

Kitson, A. (2011). Mechanics of knowledge translation. *Int J Evid Based Healthc* **9**, 79-80.

Kjeldsen, T., Ludvigsen, S., Diers, I., Balschmidt, P., Sorensen, A. R. & Kaarsholm, N. C. (2002). Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *J Biol Chem* **277**, 18245-18248.

Klein, R. S., Harris, C. A., Small, C. B., Moll, B., Lesser, M. & Friedland, G. H. (1984). Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **311**, 354-358.

Klis, F. M., Boorsma, A. & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.

Kneen, M., Farinas, J., Li, Y. & Verkman, A. S. (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* **74**, 1591-1599.

Kojic, E. M. & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**, 255-267.

Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1→)3-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**, 17762-17775.

Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M. & other authors (2002). High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 291-296.

Kooijman, E. E., Tieleman, D. P., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D. T., Burger, K. N. & de Kruijff, B. (2007). An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J Biol Chem* **282**, 11356-11364.

Kotyk, A. (1963). Intracellular pH of Baker's yeast. *Folia Microbiol (Praha)* **8**, 27-31.

Krauss, U., Losi, A., Gartner, W., Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2005). Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Phys Chem Chem Phys* **7**, 2804-2811.

Krauss, U. (2007). Bacterial Blue-Light Photorezeptors of the LOV-Family. Dissertation.

Krauss, U., Minh, B. Q., Losi, A., Gartner, W., Eggert, T., von Haeseler, A. & Jaeger, K. E. (2009). Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *J Bacteriol* **191**, 7234-7242.

Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. & Piston, D. W. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 157-160.

Kunigo, M., Buerth, C., Tielker, D. & Ernst, J. F. (2013). Heterologous protein secretion by *Candida utilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7357-7368.

Kuroda, S., Otaka, S. & Fujisawa, Y. (1994). Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements. *J Biol Chem* **269**, 6153-6162.

Kurtz, M. B., Cortelyou, M. W., Miller, S. M., Lai, M. & Kirsch, D. R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **7**, 209-217.

Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J. & Soll, D. R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**, 6652-6662.

Kvaal, C. A., Srikantha, T. & Soll, D. R. (1997). Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**, 4468-4475.

Lager, I., Fehr, M., Frommer, W. B. & Lalonde, S. (2003). Development of a fluorescent nanosensor for ribose. *FEBS Lett* **553**, 85-89.

Lakowicz, J. R. (2010). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer Verlag* 3. Auflage.

Le, Q. T., Chen, E., Salim, A., Cao, H., Kong, C. S., Whyte, R., Donington, J., Cannon, W., Wakelee, H., Tibshirani, R., Mitchell, J. D., Richardson, D., O'Byrne, K. J., Koong, A. C. & Giaccia, A. J. (2006). An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* **12**, 1507-1514.

Lengeler, K. B., Tielker, D. & Ernst, J. F. (2008). Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci* **65**, 528-544.

Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbruck, S. & Ernst, J. F. (1997). Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* **192**, 235-240.

Li, I. T., Pham, E. & Truong, K. (2006). Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnol Lett* **28**, 1971-1982.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C. & Kain, S. R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* **273**, 34970-34975.

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy* **47**, 395-401.

Liu, Z., Osterlund, T., Hou, J., Petranovic, D. & Nielsen, J. (2013). Anaerobic alpha-amylase production and secretion with fumarate as the final electron acceptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2962-2967.

Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.

Losberger, C. & Ernst, J. F. (1989). Sequence and transcript analysis of the *C. albicans URA3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *Curr Genet* **16**, 153-158.

Losi, A., Polverini, E., Quest, B. & Gartner, W. (2002). First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* **82**, 2627-2634.

Losi, A., Quest, B. & Gartner, W. (2003). Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochem Photobiol Sci* **2**, 759-766.

Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. & Lipke, P. N. (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **128**, 333-340.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389**, 251-260.

Luger, K. & Richmond, T. J. (1998). DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 33-40.

Ma, J., Goryaynov, A., Sarma, A. & Yang, W. (2012). Self-regulated viscous channel in the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7326-7331.

Mansurova, M., Scheercousse, P., Simon, J., Kluth, M. & Gartner, W. (2011). Chromophore exchange in the blue light-sensitive photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *Chembiochem* **12**, 641-646.

Mao, Y., Zhang, Z. & Wong, B. (2003). Use of green fluorescent protein fusions to analyse the N- and C-terminal signal peptides of GPI-anchored cell wall proteins in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **50**, 1617-1628.

Martin, M. V. (1999). The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother* **44**, 429-437.

Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B. & Rapoport, T. A. (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**, 938-941.

Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. & Rapoport, T. A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553-564.

Matthews, J. C., Hori, K. & Cormier, M. J. (1977). Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* **16**, 85-91.

Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-973.

Mayor, S. & Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 110-120.

McAnaney, T. B., Zeng, W., Doe, C. F. & other authors (2005). Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): a unifying mechanism. *Biochemistry* **44**, 5510-5524.

McIlvaine, T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparaison. *J Biol Chem* **49**, 183-186.

Menacho-Marquez, M. & Murguia, J. R. (2007). Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* **9**, 221-228.

Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L. & Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* **114**, 497-509.

Miller, J. D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R. & Walter, P. (1993). GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature* **366**, 351-354.

Mishin, A. S., Subach, F. V., Yampolsky, I. V., King, W., Lukyanov, K. A. & Verkhusha, V. V. (2008). The first mutant of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein that forms a red chromophore. *Biochemistry* **47**, 4666-4673.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887.

Möglich, A. & Moffat, K. (2007). Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol* **373**, 112-126.

Mölleken, K. & Hegemann, J. H. (2008). The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol Microbiol* **67**, 403-419.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656-2662.

Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Pemberton, L. F. (2002). Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* **277**, 862-868.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. & Latge, J. P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**, 14882-14889.

Mühlschlegel, F. A. & Fonzi, W. A. (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* **17**, 5960-5967.

Mukherjee, A., Walker, J., Weyant, K. B. & Schroeder, C. M. (2013). Characterization of flavin-based fluorescent proteins: an emerging class of fluorescent reporters. *PLoS One* **8**, e64753.

Müller, M., Padberg, W., Schindler, E., Sticher, J., Osmer, C., Friemann, S. & Hempelmann, G. (1998). Renocortical tissue oxygen pressure measurements in patients undergoing living donor kidney transplantation. *Anesth Analg* **87**, 474-476.

Mumberg, D., Muller, R. & Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* **22**, 5767-5768.

Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inouye, S., Hirose, K., Iino, M. & Hagiwara, M. (2000). A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation *in vivo*. *Nat Biotechnol* **18**, 313-316.

Netzer, N. C. & Breitenbach, M. (2010). Metabolic changes through hypoxia in humans and in yeast as a comparable cell model. *Sleep Breath* **14**, 221-225.

Ng, D. T., Brown, J. D. & Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 269-278.

Nguyen, A. W. & Daugherty, P. S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* **23**, 355-360.

Nicod, L. P., Pache, J. C. & Howarth, N. (2001). Fungal infections in transplant recipients. *Eur Respir J* **17**, 133-140.

Nuoffer, C., Horvath, A. & Riezman, H. (1993). Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**, 10558-10563.

Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T. & other authors (2004). K+ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12242-12247.

Odds, F. C. (1988). *Candida* and Candidosis. *Bailliere Tindall, London,* 2nd edition.

Odds, F. C., Kibbler, C. C., Walker, E., Bhamra, A., Prentice, H. G. & Noone, P. (1989). Carriage of *Candida* species and *C. albicans* biotypes in patients undergoing chemotherapy or bone marrow transplantation for haematological disease. *J Clin Pathol* **42**, 1259-1266.

Odds, F. C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.

Okumoto, S. (2010). Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 45-54.

Orij, R., Brul, S. & Smits, G. J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 933-944.

Orij, R., Urbanus, M. L., Vizeacoumar, F. J., Giaever, G., Boone, C., Nislow, C., Brul, S. & Smits, G. J. (2012). Genome-wide analysis of intracellular pH reveals quantitative control of cell division rate by pH(c) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* **13**, R80.

Orlean, P. & Menon, A. K. (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycophospholipids. *J Lipid Res* **48**, 993-1011.

Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775-818.

Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.

Otero, J. M., Vongsangnak, W., Asadollahi, M. A. & other authors (2010). Whole genome sequencing of *Saccharomyces cerevisiae*: from genotype to phenotype for improved metabolic engineering applications. *BMC Genomics* **11**, 723.

Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-114.

Paroutis, P., Touret, N. & Grinstein, S. (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* **19**, 207-215.

Patterson, G., Day, R. N. & Piston, D. (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**, 837-838.

Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. & Piston, D. W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**, 2782-2790.

Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**, 79-88.

Periyasamy, S., Venkatachalam, S., Ramasamy, S. & Srinivasan, V. (2009). Production of Bio-ethanol from sugar molasses using *Saccharomyces cerevisiae*. *Modern Applied Science* **3**, 32.

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

Pimentel, C., Batista-Nascimento, L., Rodrigues-Pousada, C. & Menezes, R. A. (2012). Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 132146.

Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J. & Rapoport, T. A. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**, 795-807.

Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K. E. & Buchs, J. (2012). Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC Biol* **10**, 28.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

Ramirez-Zavala, B., Reuss, O., Park, Y. N., Ohlsen, K. & Morschhauser, J. (2008). Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **4**, e1000089.

Redding, K., Holcomb, C. & Fuller, R. S. (1991). Immunolocalization of Kex2 protease identifies a putative late Golgi compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **113**, 527-538.

Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B. & Piston, D. W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* **22**, 445-449.

Robzyk, K. & Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**, 3790.

Rodriguez-Cuesta, J., Hernando, F. L., Mendoza, L., Gallot, N., de Cerio, A. A., Martinez-de-Tejada, G. & Vidal-Vanaclocha, F. (2010). *Candida albicans* enhances experimental hepatic melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis* **27**, 35-42.

Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J. & Barcelo, D. (2006). Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal Bioanal Chem* **386**, 1025-1041.

Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.

Romoser, V. A., Hinkle, P. M. & Persechini, A. (1997). Detection in living cells of Ca2+-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem* **272**, 13270-13274.

Rothman, J. E. (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**, 81-96.

Rout, M. P. & Blobel, G. (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**, 771-783.

Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N. & Kurjan, J. (1991). The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol Cell Biol* **11**, 4196-4206.

Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. & Okada, K. (2001). *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6969-6974.

Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press NY* 2nd edition.

Santos, M. A., Keith, G. & Tuite, M. F. (1993). Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J* **12**, 607-616.

Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D. & Schekman, R. W. (1992). Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* **69**, 353-365.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**, 601-613.

Sawano, A. & Miyawaki, A. (2000). Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **28**, E78.

Scholz, K. E., Kopka, B., Wirtz, A., Pohl, M., Jaeger, K. E. & Krauss, U. (2013). Fusion of a flavin-based fluorescent protein to hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* improves enzyme stability. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4727-4733.

Scholz, O., Thiel, A., Hillen, W. & Niederweis, M. (2000). Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. p6. *Eur J Biochem* **267**, 1565-1570.

Selvin, P. R. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat Struct Biol* **7**, 730-734.

Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C. & Ernst, J. F. (2006). Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**, 399-411.

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572.

Shaner, N. C. (2013). The mFruit collection of monomeric fluorescent proteins. *Clin Chem* **59**, 440-441.

Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R. C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M. & Mayor, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**, 577-589.

Shaw, A. S., Rottier, P. J. & Rose, J. K. (1988). Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7592-7596.

Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press NY.*

Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.

Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* **324**, 804-807.

Sigler, K., Knotkova, A., Paca, J. & Wurst, M. (1980). Extrusion of metabolites from baker's yeast during glucose-induced acidification. *Folia Microbiol (Praha)* **25**, 311-317.

Simon, S. M. & Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-380.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-197.

Soll, D. R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* **81**, 101-110.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P. & Ernst, J. F. (1999). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**, 5514-5517.

Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J. & Wedlich-Soldner, R. (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol* **14**, 640-648.

Spradling, A., Ganetsky, B., Hieter, P., Johnston, M., Olson, M., Orr-Weaver, T., Rossant, J., Sanchez, A. & Waterston, R. (2006). New roles for model genetic organisms in understanding and treating human disease: report from the 2006 Genetics Society of America meeting. *Genetics* **172**, 2025-2032.

Sprague, G. F., Jr., Blair, L. C. & Thorner, J. (1983). Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* **37**, 623-660.

Srikantha, T., Morrow, B., Schroppel, K. & Soll, D. R. (1995). The frequency of integrative transformation at phase-specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. *Mol Gen Genet* **246**, 342-352.

Stichternoth, C. & Ernst, J. F. (2009). Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3663-3672.

Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**, 819-846.
Su, J. H., Chuang, Y. C., Tsai, Y. C. & Chang, M. C. (2001). Cloning and characterization of a blue fluorescent protein from *Vibrio vulnificus*. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 359-365.

Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**, 645-653.

Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**, 675-690.

Surma, M. A., Klose, C., Klemm, R. W., Ejsing, C. S. & Simons, K. (2011). Generic sorting of raft lipids into secretory vesicles in yeast. *Traffic* **12**, 1139-1147.

Surma, M. A., Klose, C. & Simons, K. (2012). Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1059-1067.

Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. & Bogomolni, R. A. (2001). The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500.

Takahashi, E., Takano, T., Numata, A., Hayashi, N., Okano, S., Nakajima, O., Nomura, Y. & Sato, M. (2005). Genetic oxygen sensor: GFP as an indicator of intracellular oxygenation. *Adv Exp Med Biol* **566**, 39-44.

Tanner, W. & Lehle, L. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **906**, 81-99.

Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.

Thanka Christlet, T. H. & Veluraja, K. (2001). Database analysis of *O*-glycosylation sites in proteins. *Biophys J* **80**, 952-960.

Thomlinson, R. H. & Gray, L. H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* **9**, 539-549.

Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K. E. & Ernst, J. F. (2009). Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**, 913-915.

Truong, K. & Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 573-578.

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544.

Tuite, M. F., Dobson, M. J., Roberts, N. A., King, R. M., Burke, D. C., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1982). Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **1**, 603-608.

Valegard, K., Murray, J. B., Stockley, P. G., Stonehouse, N. J. & Liljas, L. (1994). Crystal structure of an RNA bacteriophage coat protein-operator complex. *Nature* **371**, 623-626.

Vazquez-Torres, A. & Balish, E. (1997). Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 170-192.

Veine, D. M., Arscott, L. D. & Williams, C. H., Jr. (1998). Redox potentials for yeast, *Escherichia coli* and human glutathione reductase relative to the NAD+/NADH redox couple: enzyme forms active in catalysis. *Biochemistry* **37**, 15575-15582.

Vojinovic, V. & von Stockar, U. (2009). Influence of uncertainties in pH, pMg, activity coefficients, metabolite concentrations, and other factors on the analysis of the thermodynamic feasibility of metabolic pathways. *Biotechnol Bioeng* **103**, 780-795.

Wachter, R. M., Elsliger, M. A., Kallio, K., Hanson, G. T. & Remington, S. J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **6**, 1267-1277.

Walter, P., Ibrahimi, I. & Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**, 545-550.

Wang, W., Winlove, C. P. & Michel, C. C. (2003). Oxygen partial pressure in outer layers of skin of human finger nail folds. *J Physiol* **549**, 855-863.

Ward, J. P. (2008). Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1-14.

Ward, W. W. & Cormier, M. J. (1979). Energy-Transfer Protein in Coelenterate Bioluminescence - Characterization of the *Renilla* Green-Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 781-788.

Wei, J. & Hendershot, L. M. (1996). Protein folding and assembly in the endoplasmic reticulum. *Exs* **77**, 41-55.

West, R. W., Jr., Yocum, R. R. & Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10* divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UAS_G. *Mol Cell Biol* **4**, 2467-2478.

Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F. & Wenzel, R. P. (1989). Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study. *Arch Intern Med* **149**, 2349-2353.

Whitten, S. T., Garcia-Moreno, E. B. & Hilser, V. J. (2005). Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4282-4287.

Wilson, R. B., Davis, D., Enloe, B. M. & Mitchell, A. P. (2000). A recyclable *Candida albicans URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* **16**, 65-70.

Witherell, G. W., Gott, J. M. & Uhlenbeck, O. C. (1991). Specific interaction between RNA phage coat proteins and RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**, 185-220.

YaDeau, J. T., Klein, C. & Blobel, G. (1991). Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 517-521.

Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.

Yuen, K. W., Montpetit, B. & Hieter, P. (2005). The kinetochore and cancer: what's the connection? *Curr Opin Cell Biol* **17**, 576-582.

Zadran, S., Standley, S., Wong, K., Otiniano, E., Amighi, A. & Baudry, M. (2012). Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 895-902.

Zhang, L., Patel, H. N., Lappe, J. W. & Wachter, R. M. (2006). Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **128**, 4766-4772.

Zhang, Y., Xie, Q., Robertson, J. B. & Johnson, C. H. (2012). pHlash: a new genetically encoded and ratiometric luminescence sensor of intracellular pH. *PLoS One* **7**, e43072.

Zhou, X., Herbst-Robinson, K. J. & Zhang, J. (2012). Visualizing dynamic activities of signaling enzymes using genetically encodable FRET-based biosensors from designs to applications. *Methods Enzymol* **504**, 317-340.

Zimmer, M. (2009). GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chem Soc Rev* **38**, 2823-2832.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	Alanin / Adenin
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A. victoria	*Aequorea victoria*
Abb	Abbildung
Ade	Adenin
AK	Antikörper
Anr	Anregung
ARS	„autonomous replication sequence“ (autonom replizierende Sequenz)
Asn	Asparagin
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
BFP	Blau Fluoreszierendes Protein
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
Bs	*Bacillus subtilis*
bs	Bindestelle
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
C. albicans	*Candida albicans*
C	Cytosin
c	Konzentration
C-terminal	carboxyterminal
Ca	*Candida albicans*
CEN	Zentromersequenz
CFP	Cyan Fluoreszierendes Protein
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COP	„Coated Protein“ (ummanteltes Protein)
CP	„Coat Protein“ (Hüllprotein)
Cys	Cystein
DAPI	4‘-6-Diamidin-2-phenylindol
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithithreitol
E. coli	*Escherichia coli*
Ec	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	*et alii*/*aliae* (und andere)
FbFP	FMN-basiertes Fluoreszenzprotein
FE	Fluoreszenzeinheit
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat

FluBO	„Fluorescence Biosensor for Oxygen“
FRET	Förster-/Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanosin
g	Gramm / Gravitationskonstante
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K	Lysin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
Leu	Leucin
LOV	„Light-Oxygen-Voltage“ (Licht-Sauerstoff-Ladung)
LP	Leerplasmid
Lys	Lysin
µ	Mikro
M	Molar
m	Meter
max	maximal
min	Minute
ml	Milliliter
mM	milimolar
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MP	Meerrettichperoxidase
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)
N	Asparagin
N-terminal	aminoterminal
NAD^+	Nikotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
NLS	„Nuclear Localization Sequence“ (Kernlokalisierungssequenz)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O_2	Sauerstoff
OD_x	optische Dichte bei λ= x nm
ORF	„Open Reading Frame“ (offener Leserahmen)
ori	“origin of replication” (Replikationsursprung)
p.a.	per analysis (für Analyse)
P. putida	*Pseudomonas putida*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion

PEG	Polyethylenglycol
Pir	„Protein with internal repeats“
pmol	Picomol
Pmt	Protein-*O*-Mannosyltransferasen
Pp	*Pseudomonas putida*
PM	Plasmamembran
RLuc	*Renilla reniformis* Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
scw	„soluble cell wall proteins“ (lösliche Zellwandproteine)
SD	synthetisches Minimalmedium mit Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SGR	synthetisches Minimalmedium mit Galaktose und Raffinose
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
SRP	Signal-Erkennungspartikel
SS	Signalsequenz
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGN	*trans*-Golgi-Netzwerk
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TWEEN	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
Tyr	Tyrosin
U	„Unit“ (Einheit)
ÜK	Übernachtkultur
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
Uri	Uridin
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vgl	vergleiche
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
yEGFP	„yeast Enhanced Green Fluorescent Protein“
YFOS	„Yeast Fluorescent Oxygen Sensor“
YFP	„Yellow Fluorescent Protein“ (Gelb Fluoreszierendes Protein)
YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose
z. B.	zum Beispiel

9 Anhang

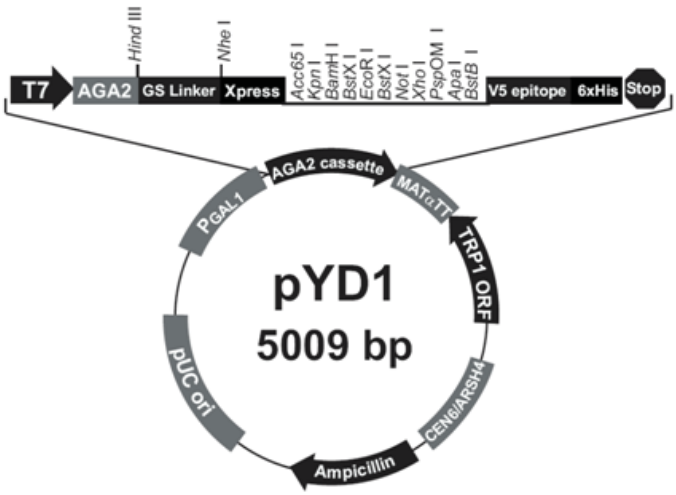


Abb. 9.1: Expressionsplasmid pYD1 zur Oberflächenlokalisation von Proteinen in *S. cerevisiae*. Bei Integration in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pYD1 aus dem „pYD1 Yeast Display Vector Kit“ kommt es zur Fusion mit *AGA2* und der Sequenz des Xpress-Epitops (5‘) sowie den Sequenzen der V5- und 6xHis-Epitope (3‘). Die Fusion steht unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors. (aus: Anleitung des „pYD1 Yeast Display Vector Kit“, Invitrogen).

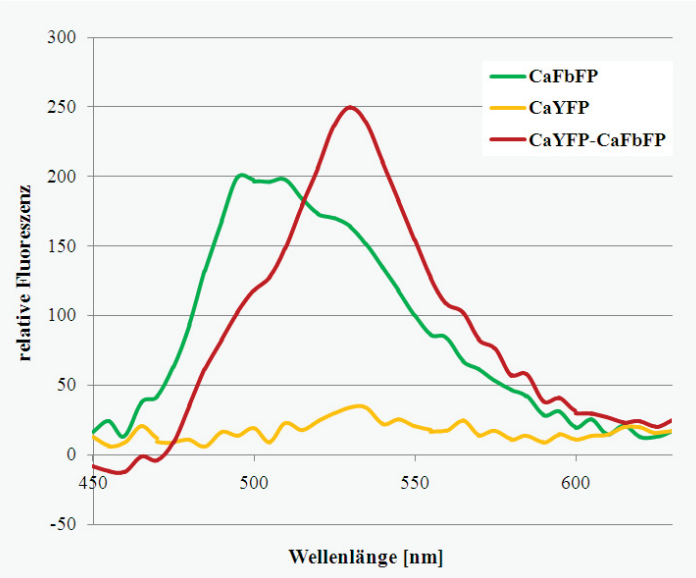
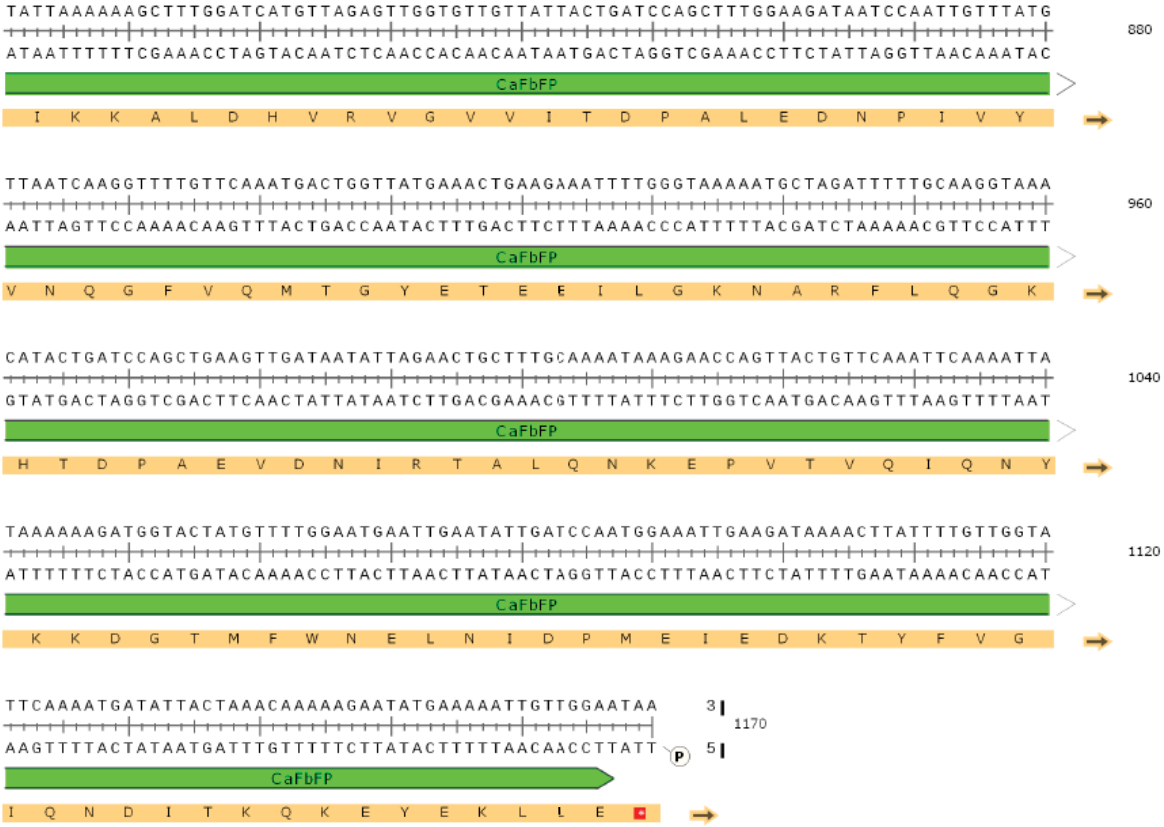


Abb. 9.2: Emissionsspektren von Rohextrakten Ca*YFP*-Ca*FbFP*-tragender *S. cerevisiae* THY.AP4-Zellen. Emissionsspektren von Rohextrakten (400 µg) der *S. cerevisiae* THY.AP4-Stämme mit den Plasmiden p426GAL1 (Kontrolle), pIE3 (CaFbFP), pOXY1 (CaYFP) und pOXY2 (CaYFP-CaFbFP). Anzucht der Zellen unter normoxischen Bedingungen bei 30 °C in Uracil-freiem SGR-Medium bis zum exponentiellen Wachstum. Anschließend wurden Rohextrakte der Zellen hergestellt und zur Analyse mittels Fluorometer (λ_{Anr}= 380 nm) verwendet. Alle Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung (technische Replikate), wobei die Werte des Kontrollstamms subtrahiert wurden.

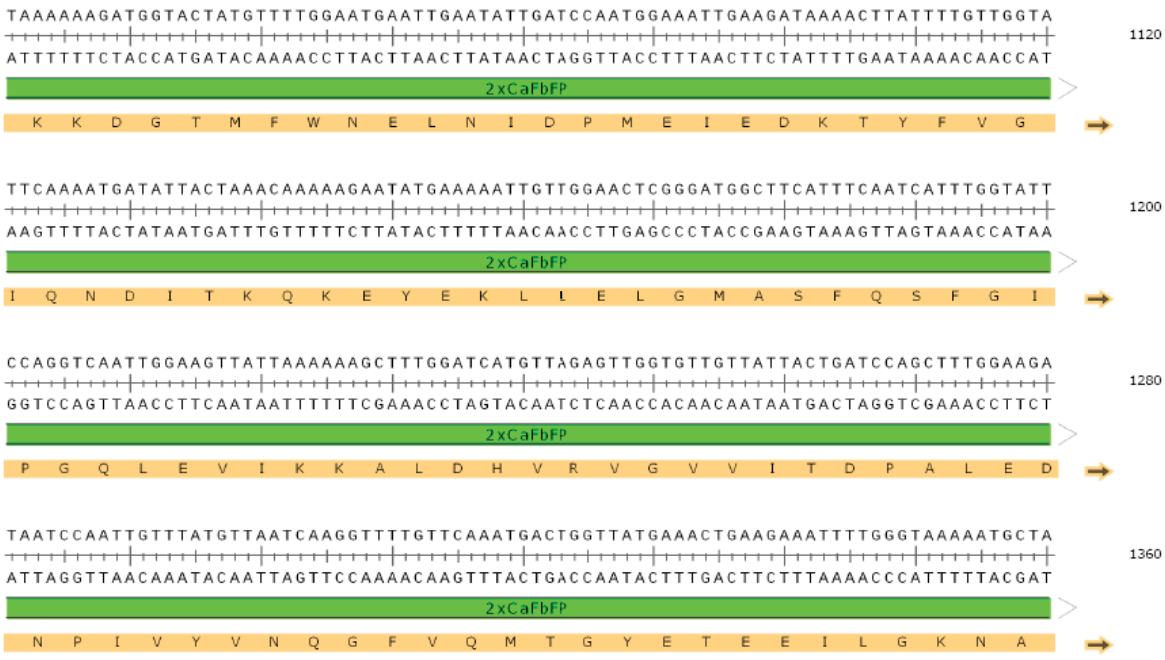
9.1 YFOS (CaYFP-CaFbFP) -Sequenz

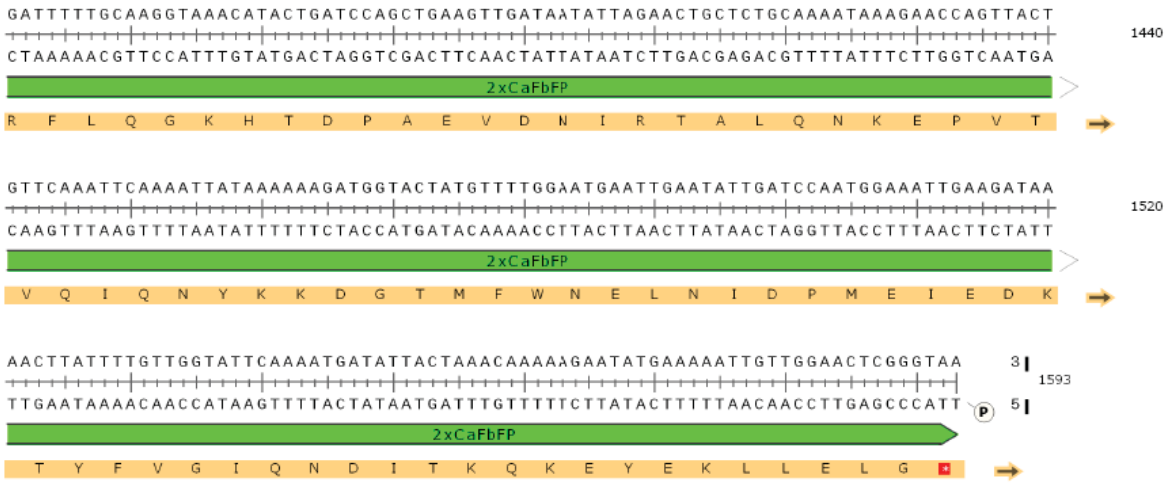




9.2 YFOS-2 (CaYFP-2xCaFbFP) -Sequenz

Der Anfang der Sequenz (Basen 1 bis 1.167) entspricht der Sequenz von YFOS. Daher ist die Sequenz von YFOS-2 hier ab Base 1.041 gezeigt.




GATTTTTGCAAGGTAAACATACTGATCCAGCTGAAGTTGATAATATTAGAACTGCTCTGCAAAATAAAGAACCAGTTACT
1440
CTAAAAACGTTCCATTTGTATGACTAGGTCGACTTCAACTATTATAATCTTGACGAGACGTTTTATTTCTTGGTCAATGA
2xCaFbFP
R F L Q G K H T D P A E V D N I R T A L Q N K E P V T
GTTCAAATTCAAAATTATAAAAAAGATGGTACTATGTTTTGGAATGAATTGAATATTGATCCAATGGAAATTGAAGATAA
1520
CAAGTTTAAGTTTTAATATTTTTTCTACCATGATACAAAACCTTACTTAACTTATAACTAGGTTACCTTTAACTTCTATT
2xCaFbFP
V Q I Q N Y K K D G T M F W N E L N I D P M E I E D K
AACTTATTTTGTTGGTATTCAAAATGATATTACTAAACAAAAAGAATATGAAAAATTGTTGGAACTCGGGTAA
3
1593
TTGAATAAAACAACCATAAGTTTTACTATAATGATTTGTTTTTCTTATACTTTTTAACAACCTTGAGCCCATT
P
5
2xCaFbFP
T Y F V G I Q N D I T K Q K E Y E K L L E L G

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Joachim F. Ernst für die Überlassung des interessanten, farbenfrohen Themas und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit.

Herrn Professor Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats sowie die Zweitbetreuung meiner Arbeit.

Dem CLIB-Graduate Cluster danke ich für mein Promotionsstipendium und damit verbundene Weiterbildungsmöglichkeiten sowie die finanzielle Unterstützung des Projekts. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Jessica Hilbig und Sonja Meyer zu Berstenhorst für die tolle Koordination bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte AG-Ernst. Hiermit sind sowohl ehemalige als auch aktuelle Kollegen der AG gemeint. Die Arbeitsatmosphäre war außergewöhnlich gut, und jeder Einzelne hat für mich auf die eine oder andere Art (wissenschaftlich oder unwissenschaftlich) Positives zu meiner Zeit im Labor beigetragen. Ob Raum 37 oder 78 – die Zeit mit euch hat mir viel Spaß gemacht! Vielen Dank an Marc für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Der AG Feldbrügge danke ich sehr für die lustigen Weihnachts- und Doktorfeiern, außerdem für die Bereitstellung von Fluoreszenzmikroskop und Fluorometer. Hier möchte ich mich besonders bei Thomas bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Vielen lieben Dank besonders an euch, Moni und Claudi, für das Korrekturlesen meiner Arbeit und vor allem dafür, dass ihr mich immer aufgebaut habt, wenn es mir nicht gut ging und immer an mich geglaubt habt. Ihr seid toll! Ein liebes Dankeschön an dieser Stelle an Felix, jetzt bist du ja doch vor mir fertig geworden. Ganz vielen Dank auch an Mieke und Hans für eure große Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit. Katja, Miri und Patrick, vielen Dank für die vielseitige Ablenkung und die lustige Zeit mit euch!

Erklärung

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

Düsseldorf, den 03.02.2014

_____

(Isabel Eichhof)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K. E. & Ernst, J. F. (2009). Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**, 913-915.