
**Interaktionen der
Protein-*O*-Mannosyltransferasen
aus *Candida albicans***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Inga Schmidt aus Norden

Düsseldorf, 2007

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

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

Referent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Koreferent: Prof. Dr. M. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinglykosylierungen	1
1.2	O-Glykosylierung	2
1.3	Protein-O-Mannosyltransferasen	4
1.4	Protein-O-Mannosyltransferasen in <i>C. albicans</i>	8
1.5	Einfluss der Protein-O-Mannosyltransferasen auf die Virulenz von <i>C. albicans</i>	10
1.6	Interaktionen von Pmt-Proteinen	12
1.7	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Chemikalien und Enzyme	14
2.2	Stämme und Medien	14
2.2.1	<i>E. coli</i> -Stämme	14
2.2.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	15
2.2.3	<i>C. albicans</i> -Stämme	15
2.2.4	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	16
2.2.5	Medien zur Anzucht von Hefen	16
2.2.6	Hypheninduktion von <i>C. albicans</i> auf festem Medium	17
2.3	Primer und Plasmide	17
2.3.1	Verwendete Primer	17
2.3.2	Verwendete Plasmide	21
2.3.3	Plasmidkonstruktionen	25
2.4	Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren	27
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.4.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen	27
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	27
2.4.4	DNA-Restriktion	28
2.4.5	Entfernen von 3'-überhängenden Enden	28
2.4.6	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	28

2.4.7	Dephosphorylierung von DNA	28
2.4.8	Ligation	28
2.4.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.4.10	Molekulargewichts- und Größenstandards.....	29
2.4.11	Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren	29
2.4.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.4.13	Gezielter Basenaustausch ("Site-directed Mutagenesis")	30
2.4.14	Klonierung von Plasmiden durch <i>in vivo</i> -Rekombination	30
2.5	Transformation	30
2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	30
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.5.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.5.4	Transformation von <i>C. albicans</i>	31
2.6	Proteinbiochemische Methoden	32
2.6.1	Antikörper	32
2.6.2	Herstellung von Hefe-Rohextrakten.....	32
2.6.3	Präparation von Membranproteinen aus Hefen.....	33
2.6.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	33
2.6.5	Koimmunopräzipitation	33
2.6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.6.7	Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse	34
2.6.8	Wiederverwendung der Immunoblot-Membran.....	35
2.6.9	Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität („X-Gal Overlay“)	35
2.6.10	Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (LacZ-Assay)	35
2.7	Zellbiologische Methoden	36
2.7.1	Fixieren von Zellen	36
2.7.2	Immunfluoreszenz.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Pmt-Interaktionen in <i>Candida albicans</i>	38
3.1.1	Das Split-Ubiquitin System.....	38

3.1.1.1	Verwendung des Split-Ubiquitin Systems.....	39
3.1.1.2	C-terminale PmtNubG-Fusionen.....	42
3.1.1.3	N-terminale NubGPmt-Fusionen.....	46
3.1.1.4	Homodimer-Bildung von Pmt6p nach einer Mutagenese	51
3.1.2	Biochemische Überprüfung der Pmt-Interaktionen	54
3.1.2.1	Markierung der Pmt-Proteine mit dem HA-Epitop (<i>URA3</i> -Marker).....	54
3.1.2.2	Markierung der Pmt-Proteine mit dem HA-Epitop (<i>SAT1</i> -Marker).....	56
3.1.2.3	Markierung mit dem Flag-Epitop.....	57
3.1.2.4	Markierung mit dem V5-Epitop	59
3.1.2.5	Funktionalität des Epitop-markierten Pmt1p bzw. Pmt2p.....	62
3.1.2.6	Lokalisation von Pmt1 ^{HA} und Pmt2 ^{HA}	65
3.1.2.7	Doppelt markierte Stämme.....	65
3.1.2.8	Koimmunopräzipitationen von Pmt1p und Pmt2p	67
3.2	Suche nach neuen Interaktionspartnern von Pmt6p von <i>C. albicans</i>	69
3.2.1	Vorversuche für die Pmt6p-Interaktionspartner-Suche mit dem klassischen Two-Hybrid System.....	69
3.2.2	Konstruktion einer genomischen Split-Ubiquitin Bank	72
3.2.3	Suche nach Interaktionspartnern von Pmt6p mit Hilfe der Split-Ubiquitin Bank ...	75
3.2.3.1	Biochemische Überprüfung der Interaktion von Pmt2p und Alg9p.....	81
3.2.3.2	Untersuchungen zu Fusionen von Nr. 18 und Nr. 23	83
4	Diskussion	87
4.1	Interaktionen der Pmt-Proteine untereinander.....	87
4.1.1	Homodimere aus Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p	88
4.1.2	Homodimere auch für Pmt1p?	89
4.1.3	Dimer-Bildung von Pmt5p?	90
4.1.4	Komplexbildung aus Pmt1p und Pmt2p.....	90
4.1.5	Bedeutung der C-terminalen Region von Pmt1p	91
4.2	Verwendung einer genomischen Split-Ubiquitin Bank.....	92
4.2.1	Interaktion zwischen Pmt6p und einem künstlichen Protein	93
4.2.2	Verbindung zwischen <i>O</i> - und <i>N</i> -Glykosylierung.....	94
4.2.3	Arbeiten die Mannosyltransferasen zusammen?.....	96

5	Zusammenfassung	98
6	Summary	99
7	Literaturverzeichnis	100
8	Abkürzungsverzeichnis	109
9	Anhang	110
9.1	Rohdaten der LacZ-Flüssigtests	110
9.1.1	C-terminale PmtNub-Fusionen	110
9.1.2	N-terminale NubPmt-Fusionen	113
9.1.3	Mutierte Pm6-Proteine	119
9.1.4	Bank-Messungen.....	120
9.2	Sequenzen der Bank-Vektoren.....	121

1 Einleitung

Die meisten Proteine werden ko- bzw. posttranslational modifiziert. Dadurch werden ihre biochemischen Eigenschaften verändert und Aktivität, Stabilität und Transport können beeinflusst werden. Proteinmodifikationen sind sowohl in Archaea und Eubakterien als auch in Eukaryoten zu finden. Dazu gehören unter anderem Phosphorylierungen (Cozzzone, 1998; Manning *et al.*, 2002), Acetylierungen (Glozak *et al.*, 2005; Fukuda *et al.*, 2006), Ubiquitinierungen (Hochstrasser, 1996), Sumoylierungen (Verger *et al.*, 2003) und Glykosylierungen (Spiro, 2002). Von allen Modifikationen ist es vor allem die Glykosylierung von Membran- und Zellwandproteinen, die einen direkten Einfluss auf die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung ausübt.

1.1 Proteinglykosylierungen

Proteinglykosylierungen sind sehr häufig und umfangreich. Zum einen lassen Abschätzungen anhand der SwissProt-Datenbank vermuten, dass über die Hälfte aller Proteine glykosyliert wird (Apweiler *et al.*, 1999). Zum anderen kann durch die Kombination von relativ wenig Monosacchariden eine Vielzahl komplexer Zuckerstrukturen gebildet werden (Spiro, 2002). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kettenlänge, den Verzweigungspunkten, den Positionen glykosidischer Bindungen und der Konfiguration. Proteine, die kovalent mit Zuckermolekülen verknüpft sind, werden als Glykoproteine bezeichnet. Bei Eukaryoten erfolgen die Glykosylierungsschritte zum einen kotranslational, im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER), zum anderen posttranslational während der Passage durch den Golgi-Apparat. Dementsprechend handelt es sich bei Glykoproteinen in der Regel um Membranproteine, extrazelluläre und sekretorische Proteine. Eine Ausnahme bildet eine Gruppe von Proteinen im Zellkern und Cytoplasma, die ausschließlich mit *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc)-Monosacchariden modifiziert werden (Hart *et al.*, 1989; O'Donnell, 2002). Aufgrund der Bindungsart von Mono- bzw. Oligosacchariden an die betreffenden Proteine unterscheidet man fünf Glykosylierungstypen (Spiro, 2002).

(i) Zum einen besitzen Eukaryoten zahlreiche Zelloberflächen-Proteine, die über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Cytoplasma-Membran verankert sind. Dieser GPI-Anker ist über Phosphoethanolamin an die terminale Carboxylgruppe bestimmter Proteine gekoppelt. Da Phosphoethanolamin Mannosylreste trägt, zählt diese Art der Modifikation zu den Glykosylierungen (Kinoshita *et al.*, 1997).

(ii) Zum anderen gibt es die so genannte *C*-Glykosylierung (Hofsteenge *et al.*, 1994). Hierbei wird eine Mannose auf das Indol-C2 Atom einer Tryptophan-Seitenkette übertragen. Als Konsensussequenz dient Trp-X-X-Trp, wobei die Bindung an das erste Tryptophan erfolgt. Bisher

wurde dieser Glykosylierungstyp nur für einige humane Proteine nachgewiesen (Hartmann und Hofsteenge, 2000; de Beer *et al.*, 1995).

(iii) Einen weiteren ganz speziellen Glykosylierungstyp stellt die Phosphoglykosylierung dar. Hierbei werden Zuckermoleküle über eine Phosphodiesterbindung an Serin-Reste gebunden. Bisher wurde diese Form der Glykosylierung nur für Schleimpilze und einzellige Parasiten beschrieben (Metha *et al.*, 1996; Haynes, 1998). Im Gegensatz zu diesen drei sehr speziellen Glykosylierungsformen sind die (iv) *N*- und die (v) *O*-Glykosylierungen weit verbreitet.

(iv) Bei der *N*-Glykosylierung in Eukaryoten wird ein „core“-Oligosaccharid auf die Amidgruppe einer Asparagin-Seitenkette übertragen. Dieses „core“-Oligosaccharid besteht aus zwei GlcNAc-Resten, neun Mannosen (Man) und drei Glukosen (Glc) (GlcNAc₂Man₉Glc₃). Diese Struktur wird von spezifischen Mannosyltransferasen (Alg-Familie) an Dolichol-Phosphat synthetisiert, das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzt. Dort ist auch der Oligosaccharyltransferase-Komplex lokalisiert, der den Transfer der Zuckerstruktur von Dolichol-Phosphat auf die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X= jede beliebige Aminosäure, außer Prolin) des Zielproteins katalysiert. Dieser Transfer erfolgt kotranslational im Lumen des ER. Die weitere Prozessierung der *N*-Glykane erfolgt im Golgi-Apparat und verläuft, im Gegensatz zur Anheftung der Grundstruktur, in Säugern und Hefen unterschiedlich (Tanner und Lehle, 1987; Weerapana und Imperiali, 2006). Das Bakterium *Campylobacter jejuni* betreibt eine *N*-Glykosylierung, die der der Eukaryoten sehr ähnlich ist. Sogar die Zielsequenz stimmt weitgehend überein, wobei aber der Vorgang an der Cytoplasma-Membran und im Periplasma lokalisiert ist (Szymanski *et al.*, 1999; Wacker *et al.*, 2002; Kowarik *et al.*, 2006).

(v) Bei der *O*-Glykosylierung werden Monosaccharide auf die Hydroxylgruppe von Serin- oder Threonin-Resten des Zielproteins übertragen (Gemmill und Trimble, 1999; Spiro, 2002). Zusätzlich können sowohl Hydroxyprolin (Strahm *et al.*, 1981; Kieliszewski *et al.*, 1995), Hydroxylysin (Spiro, 1969; Colley und Baenziger, 1987) als auch Tyrosin (Smythe und Cohen, 1991) *O*-glykosidisch mit Zuckerresten modifiziert werden. Anders als bei der *N*-Glykosylierung konnte bisher keine allgemeingültige Konsensussequenz für die *O*-Glykosylierung identifiziert werden.

1.2 *O*-Glykosylierung

Die *O*-Glykosylierung ist komplizierter und variantenreicher im Vergleich zu den anderen Glykosylierungsformen. Vor allem die *O*-glykosylierten Proteine von Säugetieren und Pflanzen enthalten die unterschiedlichsten Zucker, wie z. B. Glukose, Galaktose, Mannose, GlcNAc, GalNAc oder auch Fucose (Spiro, 2002).

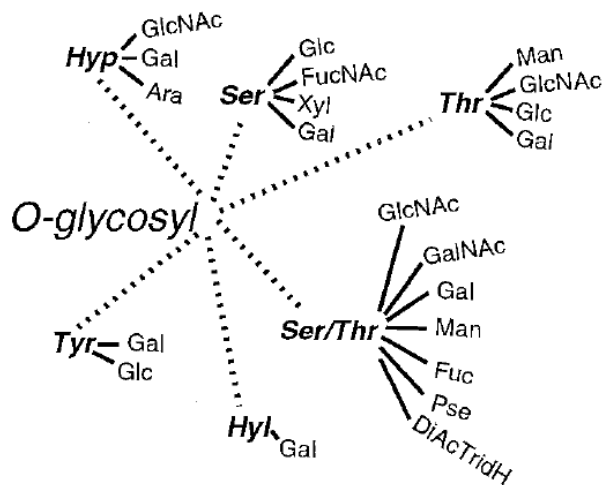


Abb. 1.1: Übersicht über die unterschiedlichen Formen der O-Glykosylierung

Dargestellt werden die möglichen Kombinationen aus Aminosäure und angehängten Zucker-Resten bei der O-Glykosylierung. Die Abbildung ist (Spiró, 2002) entnommen worden.

So weitreichend, wie ihr Auftreten (siehe Abb. 1.1) sind auch die Funktionen der O-glykosylierten Proteine. Zum Beispiel werden von den Schleimhautzellen des Menschen große Mengen des stark O-glykosylierten Proteins Mucin sekretiert. Aufgrund ihrer hohen negativ geladenen Zuckeranteile bilden diese Proteine große Komplexe

untereinander, die einen Wasser-Einschluss aufweisen. Diese Komplexe bilden eine Schutzschicht, die sowohl antibakteriell als auch antiproteolytisch wirkt (Lagow et al., 1999; Corfield und Shukla, 2004). Eine weitere wichtige Funktion der O-Zuckerketten besteht in der Vermittlung von Protein-Protein-Erkennung. Glykan-Strukturen werden von bestimmten Zuckerbindenden Proteinen, den Lectinen erkannt. Diese Erkennung ist in der Zelle weit verbreitet und beeinflusst Prozesse wie z. B. Zell-Wachstum, Apoptose, Endocytose und Zell-Zell-Interaktionen und ist unter anderem essentiell für die Immunantwort des Menschen (Reuter und Gabius, 1999; Ohtsubo und Mart, 2006).

Aber auch bei Prokaryoten ist die O-glykosidische Bindung von Zucker-Resten weit verbreitet. Neben den „S-Layern“ von Archaea (Schäffer und Messner, 2001) sind O-glykosidische Zuckerketten vor allem in Flagellen und Pili von pathogenen Bakterien gefunden worden. Besonders gut untersucht wurden die in *C. jejuni* stark glykosylierten Flagellen, deren Glukane hauptsächlich aus Pseudaminsäure-Resten bestehen (Thibault et al., 2001). Ohne diese Glykosylierung wird *C. jejuni* in seiner Motilität und der Auto-Aggregation eingeschränkt, die beide essentiell für die Adhäsion, die Invasion und die Biofilm-Bildung sind (Golden und Acheson, 2002; Guerry et al., 2006). Bei vielen anderen pathogenen Bakterien wurde diese O-glykosidische Dekorierung der Flagellen ebenfalls beschrieben. Unter diesen sind z. B. *Helicobacter pylori* und *Treponema pallidum*, aber auch einige Clostridien- und Caulobacter-Arten zu finden (Szymanski und Wren, 2005). O-Glykosylierung von Proteinen in den Pili-Strukturen fanden sich ebenfalls bei einigen wichtigen pathogenen Bakterien, wie z. B. bei *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoea* (Schmidt et al., 2003).

Die Zellwände von Pilzen bestehen zu einem großen Teil aus N- und O-glykosylierten Mannoproteinen (Kapteyn et al., 1999; Klis et al., 2001). Sie bilden eine äußere Schicht, die die Zugänglichkeit zu inneren Zellwandschichten und der Plasmamembran limitiert und so beispielsweise vor fremden, die Zellwand degradierenden, Enzymen schützt (Klis et al., 2002). Bei pathogenen Pilzen führt der erste Kontakt mit der potentiellen Wirtszelle meist über diese

Mannoproteine. Dementsprechend weisen auch einige *O*-Glykosylierungsmutanten von *C. albicans* und *Cryptococcus neoformans* Defekte in der Virulenz auf (Prill et al., 2005; Olsen et al., 2007; Willger, 2007).

Lange wurde allgemein postuliert, dass die *O*-Glykosylierung in Pilzen immer aus linearen, an Serin- oder Threonin-Resten gebundenen Mannoseketten besteht, die (α 1-2)- bzw. (α 1-3)-glykosydisch verbunden sind. Inzwischen ist bekannt, dass es auch hier eine größere Bandbreite gibt, z. B. aufgrund von Anhängen weiterer Zucker-Reste, wie Glucose und Galaktose, aber auch durch weitere Verzweigungen wie (α 1-6) und (β 1-2). Diese Alternativen sind z. B. für *Schizosaccharomyces pombe* sowie für *Aspergillus*-Arten beschrieben worden (Goto, 2007).

Aber der erste Schritt der *O*-Glykosylierung in Pilzen, die Verknüpfung eines Mannose-Restes (α 1-2) mit der Hydroxygruppe von Serin oder Threonin des Zielproteins läuft in allen Organismen gleich ab.

1.3 Protein-*O*-Mannosyltransferasen

Dol-P- β -D-Man:Protein-*O*- α -D-Mannosyltransferasen (Pmt) katalysieren den ersten Schritt der *O*-Glykosylierung bei Pilzen, der im ER-Lumen erfolgt (Marriot und Tanner, 1979; Haselbeck und Tanner, 1983). Dabei wird zunächst auf der cytoplasmatischen Seite des ERs ein Mannosylrest von GDP-Man auf das Polyisoprenoid Dolicholphosphat (Dol-P) übertragen. Katalysiert wird diese Reaktion von dem essentiellen Enzym Dol-P-Man-Synthase (Dpm1) (Orlean, 1990). Mit Hilfe einer Flippase, wahrscheinlich Rft1p in *S. cerevisiae*, erfolgt die Translokation von Dol-P-Man über die ER-Membran auf die lumenale Seite (Helenius et al., 2002). Dann wird die Mannose von dem Donor Dol-P- β -D-Man unter Inversion der Konfiguration auf eine Hydroxylgruppe der Serin- oder Threonin-Seitenkette übertragen. Es entsteht eine α -D-glykosidische Bindung (Abb. 1.2; Bause und Lehle, 1979). Wahrscheinlich findet dieser Prozess während der Translokation des Zielproteins durch die Sec61-Pore statt. Diese Translokation erfolgt meist kotranslational, bei Hefen aber auch posttranslational (Harty et al., 2001).

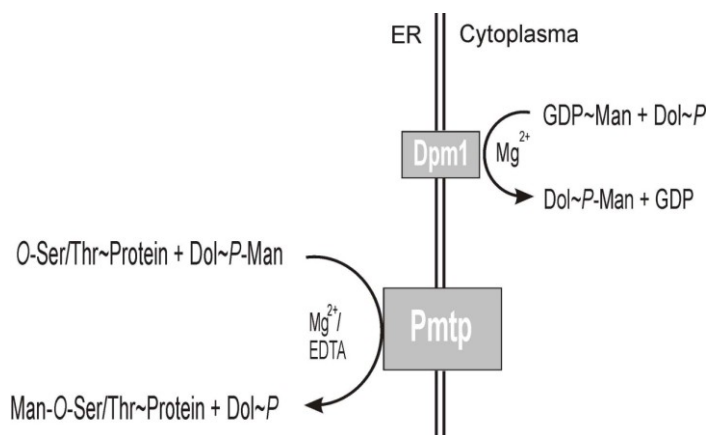


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des ersten Schrittes der *O*-Mannosylierung

Gezeigt sind die Bildung von Dolichol-P-Mannose und die Initialreaktion der Protein-*O*-Mannosylierung. Mannosyltransferase-Aktivität von Membranfraktionen in *C. albicans* wurde durch Zugabe von EDTA stimuliert (Arroyo-Florres et al., 2004) in *S. cerevisiae* dagegen von Mg^{2+} (Sharma et al., 1991).

Die Abbildung ist Prill (2004) entnommen worden.

Nachdem die erste Mannose von den Pmt-Proteinen an das Zielprotein gehängt worden ist, gelangen die mannosylierten Proteine über den Sekretionsweg in den Golgi-Apparat, wo die Kettenverlängerung stattfindet. Dort katalysieren weitere Mannosyltransferasen die Ketten-Elongation (Abb. 1.3 und Lussier *et al.*, 1999). Der Zuckerdonor dafür ist wieder die GDP-Mannose (Abeijon *et al.*, 1993). Dabei werden in *S. cerevisiae* bis zu fünf Mannose-Reste angehängt, während die Mannose-Ketten in *C. albicans* bis zu sieben Mannosen lang werden können. Meistens bestehen O-Ketten in beiden Hefearten aber nur aus ein oder zwei Zuckerresten (Buurman *et al.*, 1998; Goins und Cuttler, 2000).

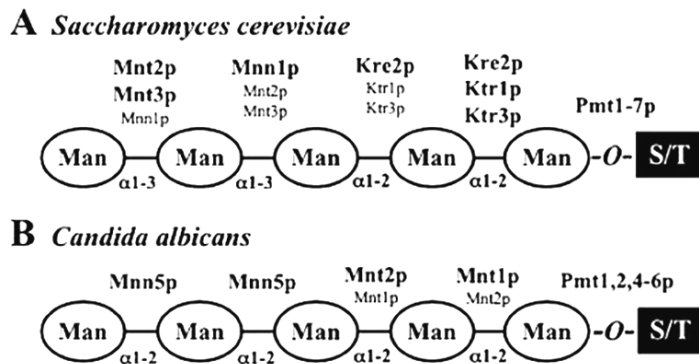


Abb. 1.3: Die Kettenverlängerung findet im Golgi-Apparat statt

Aus *S. cerevisiae* sowie aus *C. albicans* sind einige Mannosyltransferasen bekannt, die für die Verlängerung der Mannose-Ketten zuständig sind. Diese Ketten bestehen meist aus zwei Mannosen, können bei *S. cerevisiae* aber auch bis zu fünf Mannose-Reste beinhalten und bei *C. albicans* bis zu sieben. Die Monomere werden in *S. cerevisiae* (α 1-2) und (α 1-3), in *C. albicans* nur (α 1-2) verknüpft. Die Abbildung wurde (Goto *et al.*, 2007) entnommen.

Während die ersten O-glykosylierten Proteine in der Bäckerhefe schon 1969 beschrieben wurden, konnte das erste Pmt diesem Prozess erst viel später zugeordnet werden (Sentandreu und Northcote, 1969; Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991). Inzwischen ist eine ganze Pmt-Familie mit sieben Pmt-Isoformen aus *S. cerevisiae* bekannt (Pmt1-7, Strahl-Bolsinger *et al.*, 1993 und 1999; Immervoll *et al.*, 1995; Lussier *et al.*, 1995). Diese Isoformen besitzen eine Sequenz-Identität von 50-60 % und konnten drei Unterfamilien zugeordnet werden, der Pmt1-Familie (Pmt1p, Pmt5p, Pmt7p), der Pmt2-Familie (Pmt2p, Pmt3p, Pmt6p) und der Pmt4-Familie (Abb. 1.4; Girrbaach *et al.*, 2000). In den meisten anderen untersuchten Pilzen wurden jeweils drei Pmt-Isoformen beschrieben, von jeder Unterfamilie eine Isoform. Zum Beispiel wurden in *S. pombe* Oma bzw. Ogm1, 2 und 4 untersucht (Willer *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005), in *C. neoformans* Pmt1, 2 und 4 (Willger S., 2007) und in *Aspergillus nidulans* PmtA, B und C (Oka *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu diesen Pilzen konnten im Genom von *C. albicans* fünf Pmt-Isoformen bestimmt werden, die aufgrund ihrer Homologie zu den Pmt-Proteinen aus *S. cerevisiae* benannt wurden: Pmt1, 2, 4, 5 und 6 (Abb. 1.4; Prill *et al.*, 2005).

Lange wurde postuliert, dass die Pmt-Familie pilzspezifisch sei, bis auch in höheren Organismen und Bakterien Pmt-Proteine charakterisiert wurden. Vor kurzem wurde zum Beispiel in den beiden Actinobakterien *Corynebacterium sepeidonicum* und *Mycobacterium tuberculosis* jeweils ein Pmt-Protein nachgewiesen (Mahne *et al.*, 2006; VanderVen *et al.*, 2005). Dabei werden von *M. tuberculosis* lineare Zuckerketten aus Mannosylresten produziert, die O-glykosydisch an Threonin gebunden sind, was der O-Glykosylierung von Hefen entspricht.

Demgegenüber wird in Säugetieren vor allem die Zuckerkette Sia-(α 2-3)-Gal-(β 1-4)-GlcNAc-(β 1-2)-Man-(α 1)- an Serin oder Threonin synthetisiert, deren erste Mannose von den Pmt-homologen Pomt1 und Pomt2 an das Zielprotein angehängt werden (Endo, 1999; Akasaka-Manya *et al.*, 2006). Dabei ist Pomt1 homolog zur Pmt4-Familie und Pomt2 zur Pmt2-Familie (Jurado *et al.*, 1999; Willer *et al.*, 2002). Ein Zielprotein von Pomt1 und Pomt2 ist das stark O-glykosylierte α -Dystroglykan, dessen Unter-Glykosylierung beim Menschen zum Walker-Warburg-Syndrom führt (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002; Van Reeuwijk *et al.*, 2005). Bei Walker-Warburg-Patienten verursachen bestimmte Mutationen im *POMT1*- und/ oder im *POMT2*-Gen einen Hirnschaden und Augenprobleme, sowie Muskeldystrophien (Van Reeuwijk *et al.*, 2004).

Auch Insekten kodieren Pmt-homologe Proteine, wie z. B. RT (Pomt1-Homolog) und TW (Pomt2-Homolog) von *Drosophila melanogaster* (Martín-Blanco *et al.*, 1996; Lyalin *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnten keine Sequenzübereinstimmungen mit Proteinen bei Pflanzen, Algen, Protozoen oder *C. elegans* gefunden werden (Willer *et al.*, 2003).

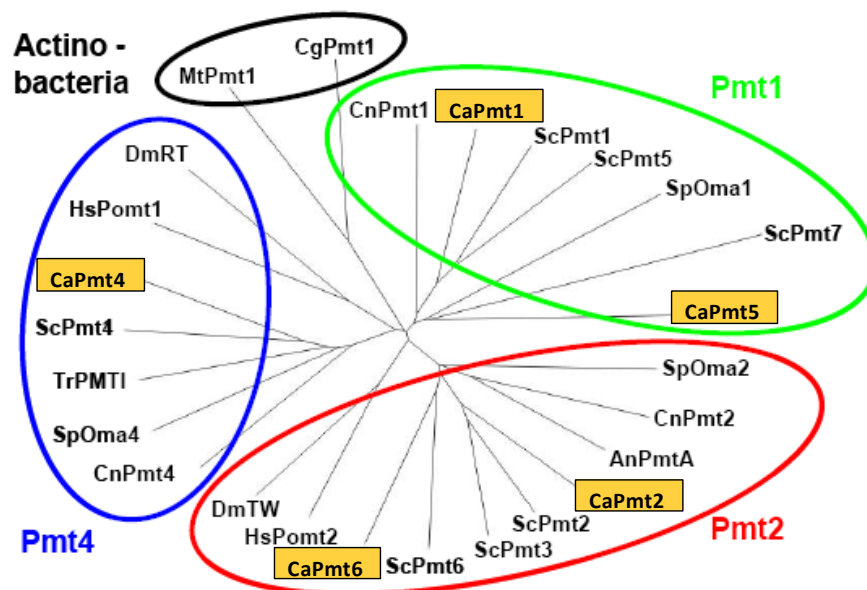


Abb. 1.4: Phylogenetischer Baum der Pmt-Unterfamilien

Die Aminosäuresequenzen veröffentlichter Pmt-homologer Proteine unterschiedlicher Organismen sind in einem Verwandtschaftsbaum dargestellt, wobei die Pmt-Proteine aus *C. albicans* orange unterlegt sind. An, *Aspergillus nidulans*; Ca, *Candida albicans*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Cn, *Cryptococcus neoformans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Tr, *Trichoderma reesei*. Die Graphik wurde (Lengeler *et al.*, 2007) entnommen und modifiziert.

Die einzelnen Pmt-Isoformen sind nicht einfach redundant im Genom enthalten, sondern scheinen spezifische Zielproteine zu erkennen und zu mannosylieren. Zum Beispiel werden in

S. cerevisiae die Proteine Pir2p, Kre1p und Kre9p hauptsächlich in *pmt1*- und *pmt2*-Mutanten unterglykosyliert, während Kex2p, Gas1p und Fus1p in *pmt4*-Mutanten betroffen sind (Gentzsch und Tanner, 1997; Proszynski *et al.*, 2004). Diese Substratspezifität ist sicher ein Grund, dass es keine allgemeine Konsensussequenz für die *O*-Glykosylierung zu geben scheint. Es wurde aber beobachtet, dass meist Serin/ Threonin-reiche Regionen glykosyliert werden, während in *C. albicans* Threonin gegenüber Serin bevorzugt wird (Westen *et al.*, 1993). Auch ein Prolin an Position -1 oder +3 scheint die *O*-Glykosylierung zu begünstigen (Wilson *et al.*, 1991). In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass eine Transmembrandomäne bzw. ein GPI (Glycosyl-Phosphatidylinositol)-Anker benachbart zu einer Serin/Threonin-reichen Sequenz die Glykosylierung letzterer durch Pmt4p zu fördern scheint. Das gleiche Protein ohne diese Domänen wurde durch Pmt1p und Pmt2p glykosyliert (Hutzler *et al.*, 2007). Auch scheinen *O*- und *N*-Glykosylierung manchmal miteinander zu konkurrieren, wobei entweder das Arginin der Konsensus-Sequenz (Asn-X-Ser/Thr) *N*-glykosyliert wird oder das Serin bzw. Threonin *O*-glykosyliert (Ecker *et al.*, 2003).

Die Struktur von Pmt1p aus *S. cerevisiae* wurde experimentell untersucht (Abb. 1.5; Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Aufgrund der evolutionär konservierten Sequenz wird angenommen, dass diese für alle eukaryotischen Pmt-Proteine gilt. Obwohl aufgrund der Hydrophathie für Pmt-Proteine allgemein elf Transmembrandomänen vorhergesagt werden, konnten für Pmt1p in *S. cerevisiae* experimentell nur sieben nachgewiesen werden, wobei der Amino-Terminus im Cytoplasma und der Carboxy-Terminus im ER-Lumen lokalisiert ist. Zwei hydrophile Schleifen zwischen den Transmembrandomänen eins und zwei (loop1) sowie fünf und sechs (loop5) sind ebenfalls dem ER-Lumen zugewandt. Diese Domänen sind essentiell für die Enzymaktivität von Pmt1p in *S. cerevisiae*. Pmt1p ist *N*-glykosyliert, wobei der Glykosylierungsstatus für die Enzymaktivität nicht essentiell ist (Strahl-Bolsinger und Scheinost, 1999). Eine Reihe invarianter Aminosäuren in den Pmt-Proteinfamilien erwiesen sich aber als essentiell für die Enzymaktivität von Pmt1p, wie z. B. ein konserviertes Arginin an Position 138 (Girrbach *et al.*, 2000).

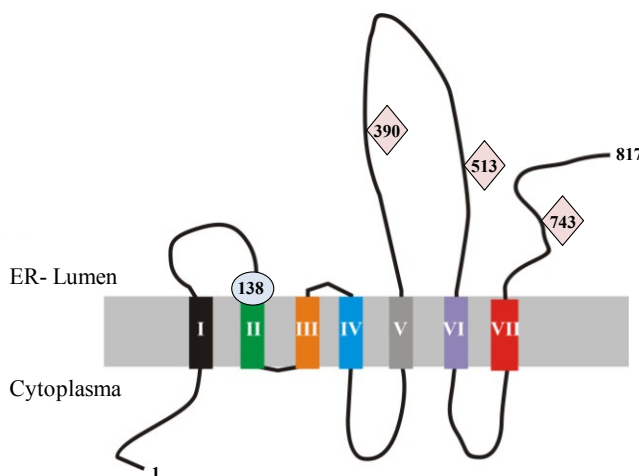


Abb. 1.5: Struktur von Pmt1p aus *S. cerevisiae*

Der N- Terminus ist im Cytoplasma lokalisiert und der C-Terminus im ER- Lumen. Der Kreis kennzeichnet ein für die Enzymaktivität essentielles Arginin, während die Rauten N-Glykosylierungsstellen bezeichnen. Dabei entsprechen die Zahlen der jeweiligen Position Aminosäure. Die Abbildung wurde nach (Strahl-Bolsinger und Scheinobst, 1999) erstellt.

Demgegenüber scheinen die Pmt-homologen Proteine von Bakterien eine leicht modifizierte Struktur aufzuweisen. Für Pmt1 aus *C. sepedonicum* wurden zwar ebenfalls 11 Transmembrandomänen vorhergesagt, aber in dem Hydropathie-Profil fehlte die große hydrophile Schleife. Im Gegensatz dazu zeigte es zwei kleinere Schleifen zwischen den Transmembrandomänen I und II sowie zwischen VII und VIII (Mahne *et al.*, 2006).

1.4 Protein-O-Mannosyltransferasen in *C. albicans*

C. albicans ist der wichtigste humanpathogene Pilz und verursacht eine Reihe von Infektionen, die besonders für immunsupprimierte Patienten sehr gefährlich werden können. Er wurde in 50 bis 70 % der Fälle als Haupterreger systemischer Infektionen isoliert (Pfaller, 1996) und ist für dreiviertel der im Krankenhaus erworbenen Pilzinfektionen verantwortlich (Jarvis, 1995). Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, besitzt *C. albicans* fünf Pmt-Isoformen (Ernst und Prill, 2001). Dabei wurden Pmt1p und Pmt5p in die Unterfamilie Pmt1p eingeordnet, während Pmt2p und Pmt6p Mitglieder der Pmt2-Unterfamilie sind und Pmt4p allein die in ebenso benannte Gruppe gehört (Abb. 1.4; Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005).

Da *C. albicans* diploid ist, wurden homozygote Deletionsmutanten von den beiden jeweiligen *PMT*-Allelen konstruiert. Diese waren lebensfähig, bis auf die *pmt2*-Mutante, bei der schon der Verlust eines einzigen *PMT2*-Allels zu starken Wachstumsdefekten führt (Prill *et al.*, 2005). Interessanterweise ist die *pmt2*-Deletionsmutante in *S. cerevisiae* lebensfähig (Gentzsch und Tanner, 1996), aber in *S. pombe* (Willer *et al.*, 2005) und in *C. neoformans* (Willger S., 2007) scheint *PMT2* ebenfalls essentiell zu sein. In *C. albicans* sind die homozygoten Doppelmutanten *pmt1/ pmt6* und *pmt4/ pmt6* lebensfähig, während Mutanten ohne *PMT1* und *PMT4* nicht überleben können (Prill *et al.*, 2005). Die meisten *pmt*-Mutanten wachsen bei 30 °C ganz normal, nur die *pmt1*-Mutante ist langsamer und wächst bei 42 °C gar nicht mehr, wie auch die *pmt4/ pmt6* Doppelmutante und der heterozygote Stamm *pmt2/ PMT2*. Die beiden letztgenannten Stämme wiesen zusätzlich eine erhöhte Sensitivität auf hohen Salzkonzentrationen auf (Prill *et al.*, 2005). Mikroskopische Untersuchungen der *pmt*-Mutanten ergaben, dass die homozygoten *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten Defekte in der Zellteilung haben. Zusätzlich wiesen sie eine erhöhte Aggregatbildung der einzelnen Zellen auf, eine verstärkte Hydrophibizität, sowie eine auffällig veränderte Zusammensetzung der Zellwand (Timpel *et al.*, 1998; Kapteyn *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Hier ging der Anteil der Mannoproteine stark zurück, während verstärkt (β1-3)-Glukan eingelagert wurde (siehe Tab. 1.1). Währenddessen zeigten die anderen *pmt*-Mutanten keine besonders modifizierte Zusammensetzung ihrer Zellwände.

Tab. 1.1: Zellwandzusammensetzung von *C. albicans*-Stämmen

Makromolekül	Jeweiliges Trockengewicht		
	Wildtyp	pmt1/ pmt1	pmt4/ pmt4
(β 1-3)-Glukan	47,5 %	69,1 %	70,2 %
(β 1-6)-Glukan	25,1 %	26 %	24,7 %
Mannoproteine	26,4 %	3,4 %	4 %
Chitin	1 %	1,5 %	1,1 %

Die Tabelle wurde (Prill *et al.*, 2005) entnommen und modifiziert.

Die *pmt1*-Mutante, aber auch der *pmt2/ PMT2*-Stamm, wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Hygromycin, G418 und verschiedenen Azolen auf, sowie gegenüber Zellwand destabilisierenden Substanzen, wie Calcofluor white und Congo red. Die *pmt4*-Mutante zeigte dabei eine Empfindlichkeit gegen Hygromycin und G418 (Prill *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Pmt1p, Pmt2p und Pmt4p für einen Großteil der Protein *O*-Glykosylierung in *C. albicans* verantwortlich sind, während Pmt5p und Pmt6p wahrscheinlich ein engeres Spektrum von Zielproteinen modulieren.

Einige spezifische Zielproteine von Pmt-Isoformen sind bisher in *C. albicans* beschrieben worden. Die Zellwandproteine Kre9p, Pir1p und Als1p werden von Pmt1p glykosyliert (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005), Während Axl2p, das für die Auswahl der Knospungsseite verantwortlich ist, von Pmt4p glykosyliert wird. Dieses schützte Axl2p teilweise vor dem proteolytischen Abbau (Prill *et al.*, 2005). Interessanterweise fiel Sec20p als Zielprotein sowohl von Pmt1p als auch von Pmt4p auf. Sec20p ist ein essentielles Protein der ER-Membran in Hefen, das als t-SNARE Komponente im retrograden Vesikel-Transport arbeitet. Ohne die *O*-Mannosylierung wird Sec20p in der Zelle schnell abgebaut (Weber *et al.*, 2004). Gleichzeitig führte eine reduzierte Expression von *SEC20* zu Sensitivitätsphänotypen, die von den *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten bekannt waren. Aufgrund dessen wird angenommen, dass zumindest ein Teil dieser *pmt*-Phänotypen auf das abgebaute Sec20p zurückgeführt werden kann.

Transkriptom-Analysen der *pmt*-Mutanten haben gezeigt, dass bei ihnen sowohl die Glykolyse als auch die Glycerol-Produktion erniedrigt wird, während die Expression von Genen für die Biosynthese von aktivierten Zuckern steigt. Wahrscheinlich verringert die Zelle so den osmotischen Druck auf die geschwächte Zellwand, den das Glycerol erzeugt, und steigert gleichzeitig Kompensationsreaktionen durch Glykosylierungen (Cantero *et al.*, 2007). Zusätzlich scheinen die einzelnen *pmt*-Mutationen die Expression der anderen *PMT*-Gene zu beeinflussen. Zum Beispiel steigt der Transkriptlevel von *PMT2* in der *pmt1*-Mutante spezifisch an, sowie die Transkription von *PMT4* im heterozygoten *pmt2/PMT2*-Stamm. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass einige Pmt-Isoformen die Funktion anderer kompensieren, wenn diese ausfallen. Überraschenderweise konnte zusätzlich eine deutlich negative Regulierung des *PMT6*-

Transkriptes in dem *pmt2/PMT2*-Stamm gezeigt werden, wie auch die Transkription von *PMT1* in der *pmt6*-Mutante stark abnahm (Cantero *et al.*, 2007).

1.5 Einfluss der Protein-O-Mannosyltransferasen auf die Virulenz von *C. albicans*

Ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* ist der Dimorphismus, d. h. dass *C. albicans* in der Lage ist, zwischen einer knospenden Hefeform und einer echten Hyphenform umzuschalten (Ernst, 2000). Alle homozygoten *pmt*-Mutanten, außer der *pmt5*-Mutante, zeigten Defekte bei der Hyphenbildung auf einigen festen, hypheninduzierenden Medien. Auch die heterozygoten *pmt1/PMT1*-, *pmt2/PMT2*- und *pmt6/PMT6*-Stämme zeigten teilweise schon erhebliche Defekte bei der Ausbildung von Filamenten (Abb. 1.6; Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005).

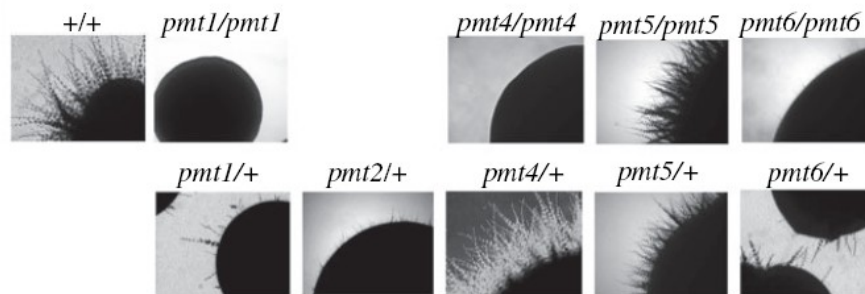


Abb. 1.6: Hyphenbildung der *pmt*-Deletionsmutanten auf festem Hypheninduktionsmedium

In der oberen Reihe sind Kolonieränder der homozygoten *pmt*-Mutanten, sowie des Wildtyps zu sehen. In der unteren Reihe werden Kolonien der heterozygoten Stämme gezeigt. Die Abbildung wurde (Prill *et al.*, 2005) entnommen.

Interessanterweise führte die Deletion eines einzigen *PMT1*- bzw. *PMT6*-Allels schon zu erheblichen Defekten bei der Filamentation, während die Deletion eines einzelnen *PMT4*-Allels keinen Einfluß hatte. Der Kontakt zu einer festen Oberfläche bei dem von den Pmt-Proteinen abhängigen Dimorphismus scheint wichtig zu sein, da in flüssigem Induktionsmedium alle *pmt*-Mutanten noch in der Lage waren Hyphen auszubilden. Vielleicht erkennen bestimmte O-mannosylierte Proteine den Kontakt zur festen Oberfläche und lösen so die Morphogenese aus. Zwei der bisher untersuchten Zielproteine von Pmt-Proteinen scheinen diesem Hyphenphänotyp zu entsprechen. Homozygote *kre9*- und *als1*-Mutanten weisen ebenfalls einen Defekt bei der Hyphenbildung auf (Lussier *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2002).

Überraschenderweise zeigten sich Unterschiede bei der Untersuchung der *pmt*-Mutanten unter hypoxischen Bedingungen. Zwar wiesen die *pmt1*- und *pmt1/pmt6*-Mutanten auch bei Hypoxie noch den gleichen Defekt der Hyphenbildung auf wie unter normoxischen Standardbedingungen, aber alle anderen Mutanten filamentierten ähnlich wie der Wildtyp. Der heterozygote *pmt2/PMT2*-Stamm, sowie die homozygoten *pmt4*- und *pmt4/pmt6*-Stämme waren sogar hyperfilamentös (Prill *et al.*, 2005). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich bei

der Ursache der Filamentationsdefekte der *pmt*-Mutanten nicht um Strukturproteine handelt, die unterglykosyliert waren, sondern möglicherweise werden Signal-Wege in den *pmt*-Mutanten beeinflusst, die an der Weiterleitung von hypheninduzierenden Faktoren beteiligt sind. Unterstützend für diese These war die Suppression des *pmt6*-Phänotyps unter normoxischen Bedingungen durch Überexpression bestimmter Gene, die an der Hypheninduktion beteiligt sind.

Die Hypheninduktion von *C. albicans* läuft über zwei Hauptsignalwege. Zum einen wird die Hypheninduktion über einen MAP-Kinase Weg aktiviert, der unter anderem die Kinase Cek1p sowie den Transkriptionsfaktor Cek1p beinhaltet, zum anderen über einen cAMP-abhängigen Signalweg, bei dem die Kinase Tpk2p und der Transkriptionsfaktor Efg1p beteiligt sind (Ernst, 2000).

Durch Überexpression von *EFG1*, *TPK2*, *CEK1* sowie von *CPHI* war es der *pmt6*-Mutante wieder möglich, auf induzierendem, festem Medium Hyphen auszubilden (Timpel *et al.*, 2000). Wahrscheinlich wird ein Sensor spezifisch von Pmt6p O-glykosyliert, der oberhalb des bekannten PKA/ Efg1/ MAPK Signal-Wegs wirkt (Ernst, 2000).

Die Virulenz der *pmt*-Mutanten ist an unterschiedlichen Maus- und Hautmodellen untersucht worden. Zum Beispiel war in dem Mausmodell der systemischen Infektion die *pmt1*-Mutante bei beiden Mauslinien vollkommen avirulent und *pmt6*-Mutanten zeigten eine leicht abgeschwächte Virulenz. Demgegenüber war die *pmt4*-Mutante in einer Maus (BALBc) avirulent und zeigte in der anderen (CD2F1) nur eine abgeschwächte Virulenz. Die *pmt5*-Mutante zeigte ebenfalls eine abgeschwächte Virulenz in den CD2F1-Mäusen, obwohl *in vitro* bisher kein Phänotyp dieser Deletionsmutante aufgefallen war (Prill *et al.*, 2005; Rouabhia *et al.*, 2005). Auch verschiedene Hautmodelle wiesen unterschiedlich stark ausgeprägte Virulenzen der einzelnen *pmt*-Mutanten auf. Zum Beispiel konnten die *pmt1*- und die *pmt5*-Mutante dem Epithel der Mundschleimhaut keinen ersichtlichen Schaden zufügen, im Kontrast zur *pmt4*- und *pmt6*-Mutante. Alle *pmt*-Mutanten, außer die *pmt5*-Mutante, zeigten eine abgeschwächte Virulenz gegenüber einem rekonstituierten Hautmodell (RHM) (Rouabhia *et al.*, 2005). In einem dritten Modell, in dem humane Epithelzellen aus der Nabelschnur verwendet werden, konnte die reduzierte Virulenz der *pmt1*- und der *pmt6*-Mutante bestätigt werden; außerdem wurde eine Verkürzung der Hyphen in diesem System gezeigt (Sanchez *et al.*, 2004).

Interessanterweise konnte in den Infektionsmodellen keine eindeutige Korrelation zwischen Hyphenbildung und Virulenz der einzelnen *pmt*-Mutanten nachgewiesen werden. So konnten aus den infizierten Mäusen Hyphen aller *pmt*-Mutanten isoliert werden, wie auch aus dem RHE-Modellsystem, egal ob sie in ihrer Virulenz eingeschränkt waren oder nicht. Demgegenüber bildeten die in ihrer Virulenz gegenüber dem künstlichen Hautmodell stark eingeschränkten *pmt1*- und *pmt5*-Mutanten in diesem System kaum Filamente aus (Rouabhia *et al.*, 2005). Anscheinend hat die Morphologie oft einen Einfluss auf die Virulenz von *C. albicans*, aber nicht immer. Die Pathogenität wird durch ein komplexes Zusammenspiel vieler Virulenzfaktoren verursacht und die Pmt-Proteine haben einen großen Anteil daran. Ein weiteres Beispiel dafür ist,

dass *pmt1*- und *pmt6*-Mutanten starke Defekte bei der Adhäsion an Endothel- und Epithel-Zellen zeigten (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000).

1.6 Interaktionen von Pmt-Proteinen

In *S. cerevisiae* sind Dimer-Bildungen von Pmt-Proteinen nachgewiesen worden (Gentzsch *et al.*, 1995; Girrbach und Strahl, 2003). Dabei bildeten Pmt1p und Pmt2p, sowie Pmt3p und Pmt5p jeweils ein Heterodimer und Pmt4p ein Homodimer. Etwas schwächere Komplexe werden von Pmt1p mit Pmt3p sowie von Pmt2p mit Pmt5p ausgebildet. Dabei zeichnet sich durchgängig das Bild ab, dass Heterodimere jeweils aus einem Mitglied der Pmt1-Familie und aus einem Mitglied der Pmt2-Familie bestehen. Für die Dimerbildung zwischen Pmt1p und Pmt2p konnte festgestellt werden, dass die katalytische Domäne (loop5) von Pmt1p nicht essentiell für diese Komplexbildung ist (Girrbach *et al.*, 2000), während der Austausch des hoch konservierten Arginins an Position 138 zu Alanin die Interaktion mit Pmt2p verhinderte. Beide Mutationen führten zu einem inaktiven Pmt1p. Diese Beobachtungen wurden auf die Homodimer-Bildung von Pmt4p übertragen. Auch hier war der sogenannte loop5, nicht erforderlich für eine Dimer-Bildung, aber für die Ausbildung eines funktionellen Pmt4p. Demgegenüber war das konservierte Arginin, das bei Pmt4p an Position 142 liegt, essentiell für die Homodimer-Bildung von Pmt4p, wie auch für dessen Funktion (Girrbach und Strahl, 2003). In *C. albicans* waren diese Beobachtungen für Pmt4p genau umgekehrt. Der Austausch des konservierten Arginin (Position 137) hatte hier keinen Einfluss auf die Homodimer-Bildung, während die Deletion von loop5 die Interaktion zwischen den Pmt4-Proteinen verhinderte.

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung von Pmt1p und Pmt2p notwendig war, um deren volle Mannosyltransferase-Aktivität zu erreichen (Gentzsch *et al.*, 1995). Auch für den Menschen wurde gezeigt, dass die Bildung eines Heterodimers zwischen Pomt1 und Pomt2 essentiell für deren Enzymaktivität ist (Akasaka-Manya *et al.*, 2006). Interessanterweise bilden hier Mitglieder der Pmt2- und der Pmt4-Familie Heterodimere, was bei *S. cerevisiae* nicht vorkommt.

1.7 Zielsetzung

C. albicans ist der einzige pathogene Pilz mit mehr als drei Pmt-Isoformen. Es wurde nachgewiesen, dass diese für die Pathogenität des Pilzes von essentieller Bedeutung sind. Die Pmt6-Isoform scheint eine besondere Rolle bei der Virulenz von *C. albicans* zu spielen, da der Deletionsphänotyp einer *pmt6*-Mutante (unterdrückte Hyphenbildung) sich durch Überproduktion von Mitgliedern des PKA/Efg1/MAPK Signal-Weges supprimieren lässt (Timpel *et al.*, 2000).

Bei *S. cerevisiae* wurden dimere Komplexe unter Pmt-Proteinen nachgewiesen, die teilweise essentiell für die Mannosyltransferase-Aktivität sind. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eventueller Homo- und Heterodimer-Bildungen unter den Pmt-Proteinen von *C. albicans*. In

diesem Zusammenhang sollte eine spezielle Form des „Two-Hybrid“-Systems, das „Split-Ubiquitin“-System etabliert werden. Dieses System sollte anschließend für eine Genbank-Suche verwendet werden, um neue Interaktionspartner oder Zielproteine von Pmt6p zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

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

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

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 *E. coli*-Stämme

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

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α F'	F' [Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15] Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17 rK- mK+ supE44 thi-1 gyrA</i>	Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB <i>lacIqZAM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene

2.2.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 2.2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme:

Stamm	Genotyp	Quelle
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
THY.AP4	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 MAL2-8c SUC2 MEL HIS3::lexA-HIS3 ADE2::lexA-ADE2 trp1Δ::lexA-lacZ</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
THY.AP5	<i>MATa leu2-3, 112 URA3 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2 MEL ade2Δ::loxP</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004

2.2.3 *C. albicans*-Stämme

Tab. 2.3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete bzw. hergestellte *C. albicans*-Stämme:

Stamm	Genotyp	Quelle
SC5314	prototroph	Fonzi und Irwin, 1993
CAI4	<i>Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Fonzi und Irwin, 1993
CAP1-3	wie CAI4, aber <i>PMT1/pmt1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
CAP1-31	wie CAI4, aber <i>PMT1/pmt1Δ::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
SPCa2	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/pmt1Δ::hisG, ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
P2-22	wie CAI4, aber <i>PMT2/pmt2Δ::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa4	wie CAI4, aber <i>PMT2/pmt2Δ::hisG, ura3Δ::imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa5	wie SPCa4	Prill <i>et al.</i> , 2005
CAP4-21	wie CAI4, aber <i>PMT4/pmt4Δ::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
P5-12	wie CAI4, aber <i>PMT5/pmt5Δ::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
CAP2-23	wie CAI4, aber <i>PMT6/pmt6Δ::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
CIS1	wie CAI4, aber <i>pmt1Δ::hisG/PMT1^{HA}::URA3</i>	diese Arbeit
CIS2	wie CIS2	diese Arbeit
CIS5	wie CAI4, aber <i>pmt2Δ::hisG/PMT2^{HA}::URA3</i>	diese Arbeit
CIS6	wie CIS5	diese Arbeit
CIS23	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{HA}::SAT1</i>	diese Arbeit
CIS24	wie CIS23	diese Arbeit
CIS25	wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{HA}::SAT1</i>	diese Arbeit
CIS26	wie CIS25	diese Arbeit
CIS27	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{V5}::URA3</i>	diese Arbeit
CIS28	wie CIS27	diese Arbeit
CIS29	wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{V5}::URA3</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
CIS30	wie CIS29	diese Arbeit
CIS31	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{V3}::URA3, PMT2/PMT2^{HA}::SAT1</i>	diese Arbeit
CIS32	wie CIS31	diese Arbeit
CIS33	wie CAI4, aber <i>PMT2^{V3}::URA3/PMT2^{HA}::SAT1</i>	diese Arbeit
CIS34	wie CIS33	diese Arbeit
CIS35	wie CAI4, aber <i>PMT1/PMT1^{HA}::SAT1, PMT2/PMT2^{V3}::URA3</i>	diese Arbeit
CIS36	wie CIS35	diese Arbeit
CIS37	wie CAI4, aber <i>PMT2/PMT2^{HA}::SAT1, ALG9/ALG9^{V5}::URA3</i>	diese Arbeit
CIS38	wie CIS37	diese Arbeit
CIS39	wie CAI4, aber pMET-PMT4k ^{V5} [pPmt4kurz-V5-URA (<i>AgeI</i>) in den <i>RPS10</i> -Locus integriert]	diese Arbeit
CIS40	wie CAI4, aber pMET-PMT6k ^{V5} [pPmt6kurz-V5-URA (<i>AgeI</i>) in den <i>RPS10</i> -Locus integriert]	diese Arbeit

2.2.4 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

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

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

2.2.5 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD-Medium (Vollmedium)

1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

Sensitivitätstests auf Hygromycin von *C. albicans* erfolgten nach Zugabe von 200 µg/ml. Die Selektion von *C. albicans* auf den *SAT1*-Marker erfolgte durch Zugabe von Nourseothricin auf eine Konzentration von 200 µg/ml.

SD-Medium (Minimalmedium)

0,67 % YNB (Yeast Nitrogen Base), 2 % Glukose, pH 7,0 mit NaOH eingestellt

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

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

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

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

2.2.6 Hypheninduktion von *C. albicans* auf festem Medium

Die Hyphenbildung wurde durch Wachstum auf Mangelmedium induziert.

Hierzu wurden so genannte "Spider-Platten" hergestellt. Die Stämme wurden für 4- 5 Tage bei 30 °C oder für 3 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.3 Primer und Plasmide

2.3.1 Verwendete Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH synthetisiert. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 100 pmol/ µl erreicht wurde.

Tab. 2.4: Oligonukleotide für das Split-Ubiquitin und das Two-Hybrid System

Name	Sequenz
p1-PMT1su	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCATGGCAAAGA AACCGGTCAC
p2-PMT1su	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGG AAATATTTAGAACGAGAAGTC
3'Pmt1+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGATTTATTTAGAA TAACGAGTATATTTAC
p1-PMT2su	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCATGTCTACTT CTGTTGAACC
p2-PMT2su	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGCAG CACTGGAGAAGCATTAG
3'Pmt2+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGCTAGGTGTATTG ATCATCAGAAAC
p1-PMT4su	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACC ATGTCACAGACTTTAAAAAAGAG
p2-PMT4su	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGCT TGCCATTTGGTCTAGCTG
3'Pmt4+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGTTATTTACCATA ATGCAACTTG
p1-PMT5su	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCAC CATGACAAAGGAATTGCCATC

Name	Sequenz
p2-PMT5su	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGGT TTTTAGCGACACGATAATTC
3'Pmt5+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGTTAACCTGTATA TGTCATACAATC
p1-PMT6su	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCATGGCAACCG GTTATTTCGAC
p2-PMT6su	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGCT GAAATTTATTGTTATGATATGA
3'Pmt6+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGAAGCTTCGGGTG TTATAATTAG
3'pGAD+linker	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGGATCTCTGCAGG TCGACATCG
3'pGAD+linkerB	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCAGCTGGAGCAGGTCAGTATCTACG ATTCATAGATC
5'pGAD-C1+linker	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATTCCCCG GGGATCCATCG
5'pGAD-C2+linker	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATTCCCCG GGATCCATCG
5'pGAD-C3+linker	ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATTCCCCG GGGATCCATCG
Split-Ubi_Seq	ATGGCCGCTCCAGCACCTG
Inv-Ubi-Seq	CGAAAATCTGCATAGCTGC
5'CaPmt6 -EcoRI	GAATTCGTGTTGAATCATACTGGTCCT
3'CaPmt6 -BglII	AGATCTCACCCCAACTATTCATTCTG

Tab. 2.5: Oligonukleotide für Epitop-Markierungen von Proteinen

Name	Sequenz
5'V5 BamHI	TCCTCGGTCTCGATTCTACGCATGCGAGTGAAATTCTGGAAATCAAAGGATC CGGTAAGCCTATCCCTAACCCTC
3'V5 EcoRI	CAATTAATTCAAGGAATTCCTTAG
CaPMT1del-for	GAAAAGCAACAACAAGAACAACAACAAGAACAAGAACAGGTTGAAGATGA ATCAGTGCATCAAGTTCAACAAGGTGGTGGTCCGATCCCCGGGTTAATTAA
CaPMT1del-rev	CAAATATGTA AAAATGTGATGTGTAATATATGTTTCATATTTCTCTTTCTGCAAA AGATAATTTCTTCTACTAAGTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
CaPMT2del-for	GAAGGACCAAAAAGAAGATTGGAACATTTGAAATTATTGGAATCTTGGAGA GTTTCTGATGATCAATACACCGGTGGTGGTCCGATCCCCGGGTTAATTAA
CaPMT2del-rev	GTAAACTAAAATATAATAACCTTTTGAAACTATTTCAAATAAATGTATCCAA AAAAGTGTAATGTCTTCTTAATCTAGAAGGACCACCTTTGATTG

Name	Sequenz
CaPMT4del-for	GTGATGTTTACTTGACTCCTGAGGAAGTTAAAGCTAGACAATGGTTAGACAT CAAGTTGCATTATGGTAAAGTGGTGGTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
CaPMT4del-rev	CTTTACATATACAAAGAAAACAAATGCAAATACAGGCTATAAAACAAAAACA GTGATAGTCAATATAGTTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
CaPMT5del-for	CATGGACATTAGATCAATGTAATTCTCATAAATGGTTTCCAAATTGGGACAT TGATTGTATGACATATACAGGTGGTGGTGGTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
CaPMT5del-rev	GAGGTAGTTAATGGTATAACCGAAACAAGAATATGATAAAAAAAGAAATAC TTTCAGCTTCTATTGTTCTCTCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
CaPMT6del-forB	TGCATAAGTTTTTGGTACTTTAAAGATCTCTCTTCGGTATGGAGGGGTCATCG GTTGATTATCGACACTTGCGACTTTGGTGGTGGTTCGGATCCCCGGGTTAATT AA
CaPMT6del-rev	CTGCATATATGTATAACCTACCAATAATCTTTTTAAGCTTCGGGTGTTATAAT TAGTATCCCTAAACACTGATCCTATCTAGAAGGACCACCTTTGATTG
5'Pmt1-V5	GAAAAGCAACAACAAGAACAACAACAAGAACAAGAACAGGTTGAAGATGA ATCAGTGCATCAAGTTCAACAAGGTGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC
5'Pmt2-V5	GAAGGACCAAAAGAAGATTGGAAACATTTGAAATTATTGGAATCTTGGAGA GTTTCTGATGATCAATACACCGGTGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC
5'Pmt4-V5	GTGATGTTTACTTGACTCCTGAGGAAGTTAAAGCTAGACAATGGTTAGACAT CAAGTTGCATTATGGTAAAGTGGTGGT <i>AAGCCTATCCCTAACCCCTC</i>
5'Pmt5-V5	CATGGACATTAGATCAATGTAATTCTCATAAATGGTTTCCAAATTGGGACAT TGATTGTATGACATATACAGGTGGTGGTGGT <i>AAGCCTATCCCTAACCCCTC</i>
5'Pmt6-V5	TGCATAAGTTTTTGGTACTTTAAAGATCTCTCTTCGGTATGGAGGGGTCATCG GTTGATTATCGACACTTGCGACTTTGGTGGTGGT <i>AAGCCTATCCCTAACCCCTC</i>
5'V5 BamHI	TCCTCGGTCTCGATTCTACGCATGCGAGTGAAATTCTGGAAATCAAAGGATC CGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC
3'V5 EcoRI	CAATTAATTCAAGGAATTCCTTAG
5'BamHI-Pmt4	GTACGGATCCATGTCACAGACTTTAAAAAAGAGAG
3'Pmt4-V5-SpHI	ACTGCATGCCTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTT ACCACCACCTTTACCATAATGCAACTTGATGTC
5'BamHI-Pmt6	GTACGGATCCATGGCAACCGGTTATTCGAC
3'Pmt6-V5-SpHI	ACTGCATGCCTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTT ACCACCACCAAAGTCGCAAGTGTCGATAATCAACC
3'Pmt4-HA-SAT1	CGATGCATGCTTAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATATCCTGCATAGTC CGGGACGTCATAGGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAACC <i>ACCACC ATTATGGTAAA</i>
3'Pmt6-HA-SAT1	CGATGCATGCTTAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATATCCTGCATAGTC CGGGACGTCATAGGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAACC <i>ACCACC AAAAGTCGCAAG</i>

Name	Sequenz
3'Pmt4kurz-V5-SpHI	ACTGCATGCCTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTT ACCACCACCAGGCTTGCCATTTGGTCTAG
3'Pmt6kurz-V5-SpHI	ACTGCATGCCTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTT ACCACCACCCTGAAATTTATTGTTATGATATG
3'Pmt4kurz-HA-SAT1	GATGCATGCTTAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATATCCTGCATAGTCC GGGACGTCATAGGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAACCA CCACCAGGCTTGCCATT
3'Pmt6kurz-HA-SAT1	GATGCATGCTTAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATATCCTGCATAGTCC GGGACGTCATAGGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAACCA CCACCCTGAAATTTAT
5'Alg9-V5	GAGGGATAATCCGTATGATGTTGGGTATATGGAGTTTTGTCTTTTAAAAA ACAAGACATAGAAGATACAGTGGGTGGTGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC
3'Alg9-V5	CTAATGCTTGATATGGTATTACCACTATTAACCTAGTTAACCCCTAGCAC ATATGGGTGTGCTTTGTTAGAGGAGTTAGGCGTCATCCTG

Tab. 2.6: Oligonukleotide für Kolonie-PCRs

Name	Sequenz
3'Test V5	GGAATGAATGGGATGAATC
3'Test HA-tag	CATCGTATGGGTAAAAGATG
5'Test Pmt1-HA	ATCTATGGTACTCCCTGGAC
5'Test Pmt2-HA	TTGGACTTCTACTGTTGGTG
5'Test Pmt4-HA	TTTCCTTCTACAACGACAAC
5'Test Pmt5-HA	TCAATCGATGAAGAATCAAG
5'Test Pmt6-HA	CCATTGATTACTTGGATGTC
5'TestAlg9	GTCGTTGTGTCCAGTTTAAG
5'Test RP10	ATGTCCACATCAGAAAAGTC
3'Test RP10	GTGGTTTATCCATACCATTTC

Tab. 2.7: Oligonukleotide für den gezielten Basenaustausch

Name	Sequenz
5'Pmt6 Delta loop5	CCTGATGATGGTACTTTGCTTTTTGGGTAATCCATTG
3'Pmt6 Delta loop5	CAATGGATTACCCAAAAGCAAAGTACCATCATCAGG
5'Pmt6 R179E	CGTATTTATGGAAATCTTCAATTG
3'Pmt6 R179E	CAATTGAAGATTTCCATAAATACG
5'23aS20-R	CCGAATTCCCCGGGGGACGTATCGAATTGTACTGGATC
3'23aS20-R	GATCCAGTACAATTCGATAGCTCCCCGGGGAATTCGG
5'23aS32-R	GATATTCCTCTCCGTGATGTCTTTAGAG

Name	Sequenz
3'23aS32-R	CTCTAAAGACATCAGCGAAGAGGAATATC
5'23aTT13-Rb	CAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCCGTCGTGAATTCCTCCGGGGGATCCAT CGAATTGTAC
3'23aTT13-Rb	GTACAATTCGATGGATCCCCGGGGAATTCATTATTGGCTGGAGCAGCCAAG GCAGGTGCTG
5'23aT13-Rc	CAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCCGTACCGAATTCCTCCGGGGGATCCAT CGAATTGTAC
3'23aT13-Rc	GTACAATTCGATGGATCCCCGGGGAATTCGGTACGGGCTGGAGCAGCCAA GGCAGGTGCTG

2.3.2 Verwendete Plasmide

Tab. 2.8: Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Plasmide

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pFGY1p- kanMXCubPLV	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> , <i>kanMX</i> / <i>ScARS</i>	Klonierungsvektor für die C-terminale Fusion von CubPLV mit dem <i>FGY1</i> - Promotor, <i>kanMX</i> -Kassette flankiert von Linker-Sequenzen	T. Hamacher, 2004
pNubWt	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> / <i>2μ</i>	Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression des NubWt-Proteins, <i>ADH1</i> - Promotor und -Terminator	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
pADH1p- NubGkanMX	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> , <i>kanMX</i> / <i>2μ</i>	Klonierungsvektor für die N-terminale Fusion von Proteinen mit Nub, <i>ADH1</i> - Promotor und Terminator, <i>kanMX</i> - Kassette flankiert von Linker- Sequenzen	T. Hamacher, 2004
pADH1p- kanMXNubG	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> , <i>kanMX</i> / <i>2μ</i>	Klonierungsvektor für die C-terminale Fusion von Proteinen mit Nub, <i>ADH1</i> - Promotor und Terminator, <i>kanMX</i> - Kassette flankiert von Linker- Sequenzen	T. Hamacher, 2004
pPmt1-Cub	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>ScCEN</i> , <i>ScARS</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX- CubPLV	Diese Arbeit
pPmt2-Cub	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>ScCEN</i> , <i>ScARS</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX- CubPLV	Diese Arbeit
pPmt4-Cub	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>ScCEN</i> , <i>ScARS</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT4</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX- CubPLV	Diese Arbeit

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pPmt5-Cub	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2/ScCEN</i> , <i>ScARS</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT5</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV	Diese Arbeit
pPmt6-Cub	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2/ScCEN</i> , <i>ScARS</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT5</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV	Diese Arbeit
pNubG-Pmt1k	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt2k	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt4k	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT4</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt5k	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT5</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt6k	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT6</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt1l	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des <i>CaPMT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt2l	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des <i>CaPMT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt4l	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des <i>CaPMT4</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt5l	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des <i>CaPMT5</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pNubG-Pmt6l	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des <i>CaPMT6</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubGkanMX	Diese Arbeit
pPmt1k-NubG	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMXNubG	Diese Arbeit
pPmt2k-NubG	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMXNubG	Diese Arbeit
pPmt4k-NubG	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT4</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMXNubG	Diese Arbeit
pPmt5k-NubG	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT5</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMXNubG	Diese Arbeit

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pPmt6k-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	Austausch des verkürzten <i>CaPMT6</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMXNubG	Diese Arbeit
pPmt6_R179E-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	wie pPmt6su-NubG, aber das Arginin an Position 179 im Pmt6 ist ausgetauscht mit einem Glutamat	Diese Arbeit
pPmt6_R179E-Cub	<i>Amp^R, ScLEU2/ ScCEN, ScARS</i>	wie pPmt6-CubPLV, aber das Arginin an Position 179 im Pmt6 ist ausgetauscht mit einem Glutamat	Diese Arbeit
pPmt6_Δloop5-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	wie pPmt6k-NubG, aber die Aminosäuren von Position 367 bis 660 sind deletiert	Diese Arbeit
pPmt6_Δloop5-Cub	<i>Amp^R, ScLEU2/ ScCEN, ScARS</i>	wie pPmt6-CubPLV, aber die Aminosäuren von Position 367 bis 660 sind deletiert	Diese Arbeit
p3HA-URA3	<i>Amp^R, CaURA3</i>	3xHA zur C-terminalen Fusion durch PCR	Prill <i>et al.</i> , 2005
pFC1	<i>Amp^R, CaSAT1</i>	<i>SAT1</i> -Marker zur Klonierung	Fabien Cottier, pers. Mitteilung
pSAT1-3HA	<i>Amp^R, SAT1</i>	3xHA zur C-terminalen Fusion durch PCR	Diese Arbeit
pV5-URA3	<i>Amp^R, CaURA3</i>	V5 zur C-terminalen Fusion durch PCR	Diese Arbeit
pFlag-ACT1	<i>Amp^R, CaURA3</i>	Vektor zur Fusion des Flag-Epitop zwischen <i>ACT1</i> -Promotor und Terminator	Umeyama <i>et al.</i> , 2002
pFlag-SAT1	<i>Amp^R, SAT1</i>	wie pFlag-ACT1, aber <i>SAT1</i> -Marker statt <i>CaURA3</i> -Marker	Diese Arbeit
pSK2	<i>Amp^R, CaURA3/ CaCEN, CaARS</i>	Expressionsplasmid mit C-terminaler Fusion des Flag-Epitops von <i>CaDOM34</i> unter Kontrolle des <i>CaMET3</i> -Promotors	Kluge S., 2006
pSK2-SAT1	<i>Amp^R, SAT1/ CaCEN, CaARS</i>	Wie pSK2, aber Austausch des <i>CaURA3</i> -Markers mit dem <i>SAT1</i> -Marker	Diese Arbeit
pPMT4-V5-URA	<i>Amp^R, CaURA3/ CaCEN, CaARS</i>	Wie pSK2, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit <i>CaPMT4</i> mit einer C-terminalen V5-Fusion	Diese Arbeit
pPMT4kurz-V5-URA	<i>Amp^R, CaURA3/ CaCEN, CaARS</i>	Wie pSK2, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit dem verkürzten <i>CaPMT4</i> mit einer C-terminalen V5-Fusion	Diese Arbeit

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pPMT4su-HA-SAT	<i>Amp^R</i> , <i>SAT1</i> / <i>CaCEN</i> , <i>CaARS</i>	Wie pSK2-SAT1, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit dem verkürzten <i>CaPMT4</i> mit einer C-terminalen HA-Fusion	Diese Arbeit
pPMT6-V5-URA	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> / <i>CaCEN</i> , <i>CaARS</i>	Wie pSK2, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit <i>CaPMT6</i> mit einer C-terminalen V5-Fusion	Diese Arbeit
pPMT6kurz-V5-URA	<i>Amp^R</i> , <i>CaURA3</i> / <i>CaCEN</i> , <i>CaARS</i>	Wie pSK2, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit dem verkürzten <i>CaPMT6</i> mit einer C-terminalen V5-Fusion	Diese Arbeit
pPMT6su-HA-SAT	<i>Amp^R</i> , <i>SAT1</i> / <i>CaCEN</i> , <i>CaARS</i>	Wie pSK2-SAT1, aber Austausch des <i>CaDom34</i> und des Flag-Epitops mit dem verkürzten <i>CaPMT6</i> mit einer C-terminalen HA-Fusion	Diese Arbeit
pDYC-C1	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>2μ</i>	Genomische Two-Hybrid Gen-Bank aus dem <i>C. albicans</i> -Stamm <i>CAI4</i> . Genomische DNA mit <i>TaqI</i> , <i>MaeII</i> , <i>HinfI</i> , <i>AciI</i> und <i>MspI</i> in Fragmente zwischen 0,5 und 3 kB geschnitten und an die Aktivierungsdomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator.	Timpel, C. und Weber, Y, unveröffentl. Daten Vergleiche James <i>et al.</i> , 1996
pDYC-C2	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>2μ</i>	Wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von einer Base.	Timpel, C. und Weber, Y, unveröffentl. Daten Vergleiche James <i>et al.</i> , 1996
pDYC-C3	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>2μ</i>	Wie pDYC-C1, aber mit einem Frameshift von zwei Basen.	Timpel, C. und Weber, Y, unveröffentl. Daten Vergleiche James <i>et al.</i> , 1996
pGBD-C2	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> / <i>2μ</i>	Two-Hybrid Vektor, Bindedomäne von <i>GAL4</i> vor einer MCS, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator.	James <i>et al.</i> , 1996
pSE1111	<i>Amp^R</i> , <i>ScLEU2</i> / <i>2μ</i>	Two-Hybrid Vektor, <i>ScSNF4</i> an die Aktivierungsdomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator.	Dureff <i>et al.</i> , 1993
pSE1112	<i>Amp^R</i> , <i>ScTRP1</i> / <i>2μ</i>	Two-Hybrid Vektor, <i>ScSNF1</i> an die Bindedomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator	Dureff <i>et al.</i> , 1993

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pGBD-Pmt6lum	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	Two-Hybrid Vektor, Domäne von <i>CaPmt6</i> (Aminosäure 354 – 674) an die Bindedomäne von <i>GAL4</i> fusioniert, unter Kontrolle von <i>ADHI</i> -Promotor und Terminator	Diese Arbeit
p18-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an <i>NUBG</i> fusioniert	Diese Arbeit
p20-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an <i>NUBG</i> fusioniert	Diese Arbeit
p23-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an <i>NUBG</i> fusioniert	Diese Arbeit
p43-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an <i>NUBG</i> fusioniert	Diese Arbeit
p103-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	isolierter Bank-Vektor, genomisches Fragment aus <i>C. albicans</i> an <i>NUBG</i> fusioniert	Diese Arbeit
p23_S20N-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	wie p23-NubG, aber das Serin an Position 20 wurde mit einem Glutamin ausgetauscht	Diese Arbeit
p23_S32N-NubG	<i>Amp^R, ScTRP1/2μ</i>	wie p23-NubG, aber das Serin an Position 32 wurde mit einem Glutamin ausgetauscht	Diese Arbeit

2.3.3 Plasmidkonstruktionen

pSAT1-3HA

Aus dem Plasmid p3HA-URA3 (Prill *et al.*, 2005) wurde mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *BglIII* die *URA3*-Kassette entfernt. Die *SAT1*-Kassette wurde aus pFC1 mit *PstI* und *BamHI* herausgeschnitten und in den p3HA-Vektor ligiert.

pFlag-SAT1

Aus pFlag-ACT1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* ein Fragment mit der *FLAG*-Sequenz ausgeschnitten. Gleichzeitig wurde der Vektor pFC1 mit *NaeI* und *HindIII* linearisiert. Die beiden Fragmente wurden an der *HindIII*-Schnittstelle ligiert und anschließend mit Hilfe der T4-Polymerase überhängende Enden abgebaut. Eine weitere Ligation folgte zur Fertigstellung des Plasmids pFlag-SAT1.

pV5-Ura3

Mit Hilfe der Primer 5'V5-BamHI und 3'V5-EcoRI wurde ein kleines Fragment aus dem Plasmid pFlag-Act1 amplifiziert. Dabei beinhaltet der 5'V5-BamHI-Primer die gesamte Nukleotid-Sequenz des V5-Tags mit einem Adapter aus drei Glycin-Resten. Zusätzlich wurden auf diese Weise Schnittstellen für *EcoRI* und *BamHI* an das PCR-Produkt fusioniert. Anschließend wurde der Vektor pFlag-Act1 mit *BamHI* und *EcoRI* geöffnet, sowie das PCR-Produkt mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten.

pPMT4-V5-URA

Der vollständige *ORF* von *PMT4* wurde mit Hilfe des Primer-Paares 5'BamHI-Pmt4 und 3'Pmt4-V5-SpHI amplifiziert. Dadurch wurde eine V5-Sequenz angehängt und das *PMT4*-Fragment zusätzlich mit den Schnittstellen für *BamHI* und *SpHI* versehen. Aus dem Plasmid pSK2 wurde mit *BamHI* und *SpHI* das *FLAG*-markierte *DOM34* herausgeschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen Amplifikat von *PMT4* ligiert.

pPMT6-V5-URA

Der vollständige *ORF* von *PMT6* wurde mit Hilfe des Primer- Paares 5'BamHI-Pmt6 und 3'Pmt6-V5-SpHI amplifiziert. Dadurch wurde eine V5-Sequenz angehängt und das *PMT6*-Fragment zusätzlich mit den Schnittstellen für *BamHI* und *SpHI* versehen. Aus dem Plasmid pSK2 wurde mit *BamHI* und *SpHI* das *FLAG*-markierte *DOM34* herausgeschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen Amplifikat von *PMT6* ligiert.

pPMT4k-V5-URA

Der verkürzte *ORF* von *PMT4* wurde mit Hilfe des Primer- Paares 5'BamHI-Pmt4 und 3'Pmt4kurz-V5-SpHI amplifiziert. Dadurch wurde eine V5-Sequenz angehängt und das *PMT4*-Fragment zusätzlich mit den Schnittstellen für *BamHI* und *SpHI* versehen. Aus dem Plasmid pSK2 wurde mit *BamHI* und *SpHI* das *FLAG*-markierte *DOM34* herausgeschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen Amplifikat von *PMT4* ligiert.

pPMT6k-V5-URA

Der verkürzte *ORF* von *PMT6* wurde mit Hilfe des Primer- Paares 5'BamHI-Pmt6 und 3'Pmt6kurz-V5-SpHI amplifiziert. Dadurch wurde eine V5-Sequenz angehängt und das *PMT6*-Fragment zusätzlich mit den Schnittstellen für *BamHI* und *SpHI* versehen. Aus dem Plasmid pSK2 wurde mit *BamHI* und *SpHI* das *FLAG*-markierte *DOM34* herausgeschnitten und mit dem ebenfalls geschnittenen Amplifikat von *PMT6* ligiert.

pSK-SAT1

Der *SAT1*-Marker wurde mit *HindIII* und *KpnI* aus pFC1 heraus geschnitten, mit einer T4-Polymerase behandelt und anschließend dephosphoryliert. Aus pSK2 wurde der *URA3*-Marker mit *HindIII* entfernt und der lineare Vektor ebenfalls mit T4-Polymerase behandelt. Die beiden Fragmente wurden ligiert.

pGBD-Pmt6lum

Mit dem Primer-Paar 5'Pmt-EcoRI und 3'Pmt6-BglII wurde ein Fragment aus der genomischen DNA von SC5314 amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit Hilfe von diesen Primer mit Schnittstellen für *BglII* und *EcoRI* versehen. Es wurden sowohl das Fragment als auch der Vektor pGBD-C2 mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend ligiert.

2.4 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

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

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

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

2.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefen

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

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Hefezellen aus einer 5 ml Übernachtskultur wurden geerntet, mit destilliertem Wasser gewaschen und das Pellet wurde anschließend in 1 ml P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) mit

RNase resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von $\frac{2}{3}$ Volumen Glasperlen unter Schütteln bei 4 °C mittels eines Vibrax (IKA®). Der Überstand wurde mit 0,5 ml P3 (3 M KOAc, pH 5,5) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl destillierten Wasser aufgenommen und die DNA wurde im Anschluss für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.4.4 DNA-Restriktion

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

2.4.5 Entfernen von 3'-überhängenden Enden

Die zu behandelnden Fragmente wurden mit 2,5 U T4-Polymerase (Roche), je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in Anwesenheit des entsprechenden Puffers für 20 min bei 16 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und isoliert.

2.4.6 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

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

2.4.7 Dephosphorylierung von DNA

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

2.4.8 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl Ansatz bestehend aus Vektor-DNA, einem 3-5fachem molaren Überschuss an Fragment-DNA und 1 U T4-Ligase für 12 h bei 16 °C.

2.4.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der "QIAquick DNA Gel Extraction"-Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift der Hersteller Firma Qiagen verwendet.

2.4.10 Molekulargewichts- und Größenstandards

DNA-Standard

λ -DNA (MBI Fermentas), welche mit *EcoRI/HindIII* oder mit *HindIII* geschnitten wurde.

Protein-Standard

PageRuler (prestained, von Fermentas) mit 11, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 und 170 kDa.
SeeBlue® Plus2 (prestained, von Invitrogen) mit 4, 6, 16, 22, 36, 50, 64, 98, 148 und 250 kDa.

2.4.11 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

Photometrisch

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

Die Extinktion $E_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 33 $\mu\text{g/ ml}$ Einzelstrang-DNA (Müller *et al.*, 1993)

Abschätzung im Agarosegel

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

2.4.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) diente zur Amplifikation von DNA und zur Verifikation von Transformanten. Sie wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Zur Klonierung bestimmte PCR-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR-Purification“-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Zur Verifikation von Transformanten wurde die PCR auf ganzen Zellen einzelner Kolonien durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Kolonie in 40 μl 0,02 M NaOH Lösung resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt. Zur PCR wurden 2 μl der Suspension in einem Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Als Polymerase diente die „Taq-Polymerase“ von NEB. In jedem Ansatz waren außerdem 200 μM dNTP und je 20 pM des 3'- und des 5'-Oligonukleotids enthalten. Als Puffer wurde einfach konzentrierter Puffer von NEB mit MgCl_2 verwendet. Nach einer Denaturierung des PCR-Ansatzes für 10 Minuten bei 95 °C wurde die DNA über 20 Zyklen für Klonierungen und 35 Zyklen für Verifikationen amplifiziert. Danach folgte ein zehnminütiger Schritt (72 °C) zur Amplifikation nicht vollendeter DNA-Ketten. Die PCR zur Amplifikation von DNA wurden auf chromosomaler DNA des Wildtypstammes SC5314 durchgeführt. Die Konzentrationen an dNTP, Puffer und Oligonukleotide entsprachen denen der Verifikations-PCR. Als Puffer diente einfach konzentrierter Puffer von Roche und als Polymerase die „High Fidelity Polymerase“ von Roche.

2.4.13 Gezielter Basenaustausch ("Site-directed Mutagenesis")

Der gezielte Austausch einzelner Basen sowie die Deletion größerer DNA-Fragmente erfolgten mit dem "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene). Die dafür verwendeten Oligonukleotide wurden nach Angaben der Hersteller ausgewählt und die Mutagenese-Reaktionen entsprechend durchgeführt.

2.4.14 Klonierung von Plasmiden durch *in vivo*-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst die zu klonierende DNA-Sequenz in einer PCR amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide enthielten im 3'-Bereich mindestens 20 bp, die homolog zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz waren und besaßen zusätzlich spezifische 5'-terminale Anhänge von mindestens 40 bp, die homolog zu dem gewählten Integrationsbereich der Zielvektoren waren. Der Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert, gereinigt und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert. Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem für die Selektion auf den Auxotrophie-Marker des Vektors die entsprechende Aminosäure fehlte. Somit konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden isoliert, im *E. coli*-Stamm XL1-blue amplifiziert und durch eine anschließende Restriktionsanalyse und teilweise durch Sequenzierung überprüft.

2.5 Transformation

2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente Zellen

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Methode von Hanahan (1983) hergestellt, Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Elektroporationskompetente Zellen

E. coli Zellen wurden ÜN in 10 ml LB-Medium bei 37 °C inkubiert, morgens in 1 l frisches, auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium überführt und solange inkubiert, bis eine Zelldichte von maximal 0,5-1 OD₆₀₀ erreicht war. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgeerntet, 4x mit sterilem, eiskaltem Wasser und 1x mit 10 % Glycerin gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 2 bis 3 ml 10 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation wurde wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt.

Elektroporation

Pro Transformationsansatz wurden ca. 10^9 Zellen und 10-200 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit 1 mm Durchmesser. Für die Transformation wurde an der Gene-Pulser-Apparatur (BioRad) eine Kapazität von 25 μF , ein Widerstand von 200 Ω und eine Spannung von 1,3 kV eingestellt. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort in 900 μl LB-Medium resuspendiert, 1 h bei 37 °C geschüttelt und auf LB-Amp-Platten ausplattiert.

2.5.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Li-Acetat Methode (Ito *et al.*, 1983). Es wurden 50 ml einer Kultur mit einer OD_{600} von 0,6 bis 1 abzentrifugiert, die Zellen einmal in dH_2O gewaschen und in 400 μl 0,1 M LiOAc resuspendiert und in 50 μl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden abzentrifugiert und zu dem Pellet wurde folgender Mix hinzugegeben: 240 μl 50 % PEG 3350, 36 μl 1 M LiOAc, 25 μl Heringssperma-DNA (2 mg/ ml), 10 μl Plasmid- DNA und 44 μl dH_2O . Der Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nun folgte ein Hitzeschock über 30 min bei 42 °C. Die Zellen wurden schließlich abzentrifugiert, in 100 μl dH_2O aufgenommen, ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

2.5.4 Transformation von *C. albicans*

Um Plasmide zu transformieren wurde eine schnelle, aber nicht effiziente Methode verwendet. Dafür wurden 0,2 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (4 min bei 5000 rpm). Das Pellet wurde in 0,1 ml frischem OSB (0,2 ml 1 M LiAc, 0,8 ml 50 % PEG 8000, 15 mg DTT) resuspendiert und 25 μl Heringssperma-DNA (2 mg/ ml) sowie 4-6 μg der zu transformierenden DNA hinzugefügt. Die DNA-Zell-Suspension wurde kurz geschüttelt und 30-45 min bei 43,5 °C inkubiert.

Zur Integration von DNA-Fragmenten wurde die Methode nach Mitchell (Wilson *et al.*, 2000) verwendet. 50 ml einer Kultur mit einer OD_{600} von 0,5-0,8 wurden abzentrifugiert (5 min bei 3500 Upm) und das Pellet mit 5 ml LATE-Puffer [0,1 M LiAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA] gewaschen und anschließend in 0,5 ml LATE-Puffer resuspendiert. Pro Transformation wurden 0,1 ml Zellen mit 25 μl Heringssperma-DNA (2 mg/ ml) sowie maximal 80 μl PCR-Produkt bzw. 2-10 μg DNA versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 0,7 ml PLATE-Puffer (40 % PEG 3350 in LATE-Puffer) hinzugefügt und die Probe nach kurzem Schütteln (2 sec) über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 3500 Upm), in 5 ml YPD resuspendiert und bei 30 °C und 110 Upm mindestens 4 h regeneriert. Nach der Regeneration wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 3500 Upm), das Pellet in 100 μl dH_2O resuspendiert und auf Selektionsmedien ausplattiert.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Antikörper

Tab. 2.9: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-HA mit Peroxidase gekoppelt (1-17)	Monoklonal, Maus	1:2000	Roche
Anti-HA (1-33)	Monoklonal, Maus	1:2000	Sigma
Anti-HA (1-35)	Polyklonal, Kaninchen	1:2000	Sigma
Anti-HA (1-7)	Monoklonal, Ratte	1:500	Roche
Anti-V5 (1-31)	Monoklonal, Maus	1:1000	Invitrogen
Anti-V5 (1-34), (1-36)	Monoklonal, Maus	1:2000	AbD, Serotec

Tab. 2.10: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Name	Herstellung	Verdünnung	Quelle
Anti-Maus, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:20000	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.
Anti-Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:20000	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.
Anti-Ratte, Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:20000	Pierce
Anti-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Ziege	1:2500	Sigma
Anti-Kaninchen, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Ziege	1:2500	Pierce
Anti-Ratte, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Ziege	1:2500	Pierce
Anti-Ratte, konjugiert mit FITC	Ziege	1:100	Jackson Immunologie Research Lab. Inc.

2.6.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. 5 ml einer über Nacht gewachsenen Hefekultur wurde gerntet (5 min bei 3500 Upm), einmal mit 5 ml Wasser gewaschen und das Pellet min. 2 h bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde es in 200 µl Lysis-Puffer [50 mM HEPES (pH 7,5 mit KOH), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton x 100] mit Proteinase-Inhibitoren resuspendiert und 2/3 Volumen Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluß folgte bei 4 °C auf dem Vibrax (IKA) für zweimal 10 min bei 2200 Upm mit einer 10minütigen Pause auf Eis. Nach 2minütiger Zentrifugation bei 2000 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und restliche Zelltrümmer und Glasperlen durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm) abgetrennt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Rohextrakt entweder sofort auf einem SDS-Proteingel aufgetragen, in die Koimmunopräzipitation eingesetzt oder bei -70 °C eingefroren.

2.6.3 Präparation von Membranproteinen aus Hefen

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. 50 OD₆₀₀ einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurde geerntet (5 min bei 3500 Upm), einmal mit 5 ml Wasser gewaschen und das Pellet min. 2 h bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde es in 500 µl Lysis-Puffer (2.6.2) mit Proteinase-Inhibitoren resuspendiert und 2/ 3 Volumen Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluß folgte bei 4 °C auf dem Vibrax (IKA) für zweimal 10 min bei 2200 Upm mit einer 10minütigen Pause auf Eis. Nach 2minütiger Zentrifugation bei 2000 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und restliche Zelltrümmer und Glasperlen durch Zentrifugation (3 min, 3500 Upm) abgetrennt. Die Membranen wurden mind. 30 min bei 48.000 g und 4 °C (TLR45-Rotor) abzentrifugiert. Um die Membranproteine zu solubilisieren wurde das Membranpellet in 500 µl Membranpuffer [50 mM Tris/ HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,3 mM MgCl₂, 1 % Triton x-100, 0,5 % NP-40, 10 % Glycerin] resuspendiert und 30 min bei 4 °C und 2200 Upm auf dem Vibrax (IKA) geschüttelt. Anschließend wurden grobe Membran-Reste 30 min bei 13000 Upm abgetrennt. Der klare Überstand wurde entweder sofort auf einem SDS-Proteingel aufgetrennt, in die Koimmunopräzipitation eingesetzt oder bei -70 °C eingefroren.

2.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Es wurden 1-15 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit dH₂O verdünnt und mit 0,2 ml „BioRad Protein Assay Dye Reagent“ (BioRad) versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei RT inkubiert und die Messung erfolgte in einem Photometer bei 595 nm. Als Standard wurde eine Eichkurve mit 1-15 µg BSA erstellt.

2.6.5 Koimmunopräzipitation

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Für die Koimmunopräzipitation wurden entweder 250 µl Hefe-Rohextrakte (2.6.2) oder 500 µl solubilisierte Membranproteine (2.6.3) eingesetzt. Diese Protein-Lösungen wurden mit je 7 µg primären Antikörpern (Tab. 2.9) mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C auf einem Kippschüttler inkubiert. Parallel wurde Protein A-Sepharose dreimal mit Lysis-Puffer (2.6.2) gewaschen (1 min, 13000 Upm) und nach dem letzten Waschschrift ebenfalls mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C in Lysis-Puffer auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose in letztes mal gewaschen und 1 Vol. Lysis-Puffer zugegeben. Diese 50 %igen Sepharose-Lösung wurde zu je 80 µl aliquotiert, 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Protein-Antikörper-Lösung wurde ebenfalls für 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und auf das Sepharose-Pellet gegeben. Diese Mischung wurde wieder mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate dreimal mit Lysis-Puffer und einmal mit PBS [140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)]

gewaschen (1 min, 13000 Upm). Die Flüssigkeit wurde nach dem letzten Waschschrift mit einer Kanüle abgenommen und mit 60 µl 3x SDS-Probenpuffer [30 % Glycerin, 6 % SDS, 188 mM Tris/ HCl (pH 6,8) 15 % β-Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblau; Laemmli, 1970] und 100 mM DTT versetzt. Da es sich um Membranproteine handelte, wurden die Präzipitate zur Denaturierung 20 min auf 70 °C erhitzt. Nach kurzem Abzentrifugieren (15 sec, 13000 Upm) wurden von jeder Probe 25 µl auf zwei verschiedene SDS-Gele aufgetragen, damit sowohl das präzipitierte als auch das eventuell gefischte Protein per Immunoblot sichtbar gemacht werden konnte.

2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Hierzu wurden denaturierende SDS- Gele verwendet, deren Polyacrylamid-Konzentration zwischen 8 und 12 % variierte. Zunächst wurde das untere Trenngel [0,375 M Tris (pH 8,8); 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED; 8-12 % Acrylamid] gegossen, welches sofort nach dem Gießen mit Wasser Isopropanol überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 1 h) wurde das Isopropanol herausgegossen und eventuelle Reste mit einem Papiertuch herausgesaugt. Das Sammelgel [0,125 M Tris (pH 6,7), 0,1 % SDS, 0,8 % APS, 0,1 % TEMED, 5 % Acrylamid] über das Trenngel gegossen. Zum Gießen der Gele wurde eine Apparatur von Hoefer Scientific verwendet. Alternativ wurde die XCell SureLock™ Mini-Cell Gelapparatur der Firma Invitrogen mit 8-10 %igen SDS-Gelen der Firma Invitrogen bzw. Pierce verwendet. Für die selbstgegossenen, sowie für die Gele der Firma Invitrogen wurde der klassische Lämmli-Laufpuffer verwendet [200 mM Glycin; 25 mM Tris/ HCl; 0,1 % SDS (w/v)], für die Gele der Firma Pierce ein HEPES-Laufpuffer [100 mM Tris; 100 mM HEPES; 1 % SDS (w/v)]. Die Proben wurden mit ½ Vol. 3 x Lämmli-Probenpuffer (2.6.5) versetzt und 10 min bei 95 °C, bzw. 20 min bei 70 °C inkubiert. Es wurden 40 µg Protein-Rohextrakte eingesetzt, bzw. 25 µl der Koimmunopräzipitation (2.6.5).

2.6.7 Nachweis spezifischer Proteine durch Immunoblot-Analyse

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran von Millipore) erfolgte im Tankblot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde mit Methanol vorbehandelt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte im Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) über Nacht bei 150 mA. Alternativ erfolgte der Proteintransfer mit dem „XCell Blot Module“ über Nacht bei 10 Volt, bzw. 3 h bei 30 Volt.

Potentielle unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran wurden für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 2 % „Blocking“-Lösung (Roche), bzw. in 5 % Magermilchpulver blockiert. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit dem ersten Antikörper inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurden die Membranen viermal mit TBST-Puffer [50 mM Tris/HCl (pH 7,5);

150 mM NaCl; 0,1 % (w/w) Tween-20] bei RT jeweils 10 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation (1 h) mit dem entsprechenden Zweitantikörper in TBST. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran wiederum viermal in TBST-Puffer für 10 min gewaschen. Die Detektion der Peroxidase erfolgte durch die Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates „SuperSignal[®] West Dura“ (Pierce) entsprechend der Anweisung des Herstellers und Röntgenfilmen (Fuji), bzw. am LAS1000. Für die Detektion der alkalischen Phosphatase wurden die Membranen noch zweimal mit Substrat-Puffer [100 mM Tris/HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂] gewaschen und anschließend in AP-Färbelösung [10 ml Substrat-Puffer mit 45 µl NBT (75 mg/ml p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid in 70 % Dimethylformamid) und 35 µl BCIP (5 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat Dinatriumsalz in H₂O)] bis zur Blaufärbung inkubiert.

2.6.8 Wiederverwendung der Immunoblot-Membran

Um von einer schon verwendeten Membran sämtliche gebundenen Antikörper zu waschen, die Proteine aber dort zu lassen, kann sie „gestrippt“ werden. Zum einen wurde eine sanfte Methode verwendet. Sie bestand aus 3 min mit der Strip-Lösung (0,5 M NaCl; 0,5 M Glycin) waschen, 5 min in 1 M Tris/HCl (pH 7,0) inkubieren und nach zweimaligem kurzen Waschen in H₂O konnte der Immunoblot blockiert werden (2.6.7). Bei einer alternativen Methode wurde die Membran in Stripping-Puffer [50 mM Tris/ HCl (pH 6,8); 100 mM β-Mercaptoethanol; 2 % SDS] eingeschweißt und 15- 30 min im 50 °C heißen Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurde sie dreimal mit TBST (2.6.7) gewaschen und blockiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran jeweils wie in 2.6.7 weiterbehandelt.

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

Mit dem „X-Gal Overlay“-Assay (Suckow und Hollenberg, 1998) lässt sich die β-Galaktosidase-Aktivität vom *lacZ*-Reportergen in Hefezellen grob abschätzen. Dazu wurden jeweils 5 µl einer Übernachtskultur auf Platten getropft und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. 0,1 g Agarose wurde mit 10 ml H₂O aufgekocht und mit 10 ml 1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) versetzt und gemischt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden dem Gemisch 400 µl SDS-Lösung (10 %) und 200 µl x-Gal-Lösung (4 mg/ml in DMF gelöst) zugesetzt. Jede Platte wurde mit 10 ml dieser Lösung überschichtet und nach dem Erkalten für 2-8 h bei 37 °C inkubiert.

2.6.10 Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität (LacZ-Assay)

Zur quantitativen Aktivitätsbestimmung der β-Galaktosidase wurde die Methode von James *et al.* (1996) verwendet. Zunächst wurde die OD₆₀₀ der zu messenden Übernachtskulturen bestimmt und jeweils 1 ml Zellkultur bei 13.000 Upm für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer [0,1 M Tris/ HCl (pH 7,5); 0,05 % Triton X-100] resuspendiert und für mind. 2 h bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei 30 °C aufgetaut und mit 750 µl Z-Puffer mit frischem ONPG [60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 1 mg/ml O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (pH 7,0)] versetzt und bis zu einer Gelbfärbung bei 30 °C

im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M NaCO₃ gestoppt und die Inkubationszeit (t) bestimmt. Nach einer kurzen Zentrifugation (13000 Upm, 30 sec.) wurde die Extinktion bei 420 nm ermittelt. Die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel nach Miller *et al.* (1994) bestimmt:

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

Es wurden immer Doppelbestimmungen gemacht.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Fixieren von Zellen

5 ml einer exponentiellen Kultur (OD₆₀₀ ca. 0,5-0,8) wurde etwa 4 h mit 4 % Formaldehyd bei 30 °C auf dem Schüttler fixiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (5 min, 3500 rpm), einmal in 5 ml S-Puffer (50 mM HEPES; 1,2 M Sorbitol; pH 7,5) gewaschen (5 min, 3500 rpm) und in 1 ml S-Puffer resuspendiert. So konnten die Zellen bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

2.7.2 Immunfluoreszenz

Die vorher fixierten Zellen (2.7.1) wurden sphäroplastiert. Dafür wurden zu der 1 ml Zellsuspension 10 mM DTT (10 µl einer 1 molaren Lösung), 30 µl Glucoronidase und 40 µl Zymolyase (2,5 mg/ml) gegeben, gemischt und bei 37 °C etwa 45 min inkubiert. Von nun an musste man mit den Zellen sehr vorsichtig umgehen.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (1 min, 5000 rpm) und vorsichtig in 1 ml S-Puffer resuspendiert. Es wurden 0,1 % Triton X-100 (5 µl aus einer 20 %igen Stammlösung) zugegeben und die Mischung 5 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm) und in 200 µl S-Puffer resuspendiert.

Auf einen 10-Loch-Objektträger wurden 15 µl 0,1 %iges Poly-Lysin in jedes Loch gegeben. Das Poly-Lysin wurde 2 min inkubiert und anschließend abgesaugt. Nach dem Trocknen, wurde die Poly-Lysin-Schicht dreimal mit bidest. H₂O gewaschen. 20 µl der Zellsuspension wurden aufgetropft und 5 min inkubiert. Die Zellen sollten nun am Poly-Lysin kleben und durften nicht mehr austrocknen. Sie wurden vier Mal mit PBS gewaschen, wobei je ein Tropfen PBS auf die Zellen gegeben wurde und der Objektträger anschließend gekippt wurde, damit die Flüssigkeit ablaufen konnte. Dann wurde mit 2 %igem Magermilchpulver (in PBS) 15 min lang blockiert. Die Blockierungslösung wurde abgesaugt und der primäre Antikörper (1:25 Anti-HA aus der Ratte) verdünnt in der gleichen Blockierungslösung aufgetropft. Das Ganze wurde nun für 90 min bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurde wieder vier Mal mit PBS gewaschen und 20 µl des sekundären Antikörpers (Anti-Ratte, FITC; 1:100 in 0,2 %igem Magermilchpulver in PBS) aufgetropft. Der Objektträger wurde wieder in einer feuchten Kammer 90 min lang inkubiert, diesmal aber im Dunkeln. Nach

viermaligem Waschen mit PBS wurden 20 µl einer DAPI-Lösung (1 mg/ml wurde nochmal 1:1000 in PBS verdünnt) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Wieder musste vier Mal mit PBS gewaschen werden. Die letzte Flüssigkeit wurde abgesaugt und Anti-Fade auf die Zellen gegeben. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt und die Probe möglichst im Dunkeln aufbewahrt.

PBS: 7,9 mM Na₂HPO₄
14,5 mM KH₂PO₄
137 mM NaCl
0,5 mM MgCl₂
2,7 mM KCl
in ddH₂O

Anti-Fade: 50 mg p-Phenylendiamin in 5 ml PBS
auf pH-Wert 9 einstellen
+ 45 ml Glycerin
im Dunkeln bei -70 °C lagern

3 Ergebnisse

3.1 Pmt-Interaktionen in *Candida albicans*

Die Arbeit von Gentzsch *et al.* (1995) konnte zeigen, dass in *S. cerevisiae* Pmt1p und Pmt2p *in vivo* interagieren. Die Komplexbildung der beiden Pmt-Proteine ist essentiell für eine effiziente *in vitro* Aktivität des Mannosyl-Transfers (Girrbach und Strahl, 2003). Zusätzlich wiesen die Autoren einen Homodimer-Komplex von Pmt4p nach, sowie einen weiteren Komplex zwischen Pmt3p und Pmt5p. Eine recht schwache Komplexbildung konnte zwischen Pmt1p und Pmt3p, als auch zwischen Pmt2p und Pmt3p gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Komplexbildungen von Pmt-Proteinen auch in dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* zu finden sind. Dieses wurde zum einen durch das Split-Ubiquitin System und zum anderen durch einen biochemischen Ansatz untersucht.

3.1.1 Das Split-Ubiquitin System

Das Split-Ubiquitin System (Johnsson und Varshavsky, 1994a; 1994b; Varshavsky, 1997; Stagljar *et al.*, 1998) wird verwendet, um Interaktionen von Membranproteinen bzw. von einem Membranprotein und einem löslichen Protein nachzuweisen. Im Gegensatz zum klassischen Two-Hybrid System wird bei dieser Methode der Nachweis einer Interaktion nicht über Proteindomänen sondern mit vollständigen Proteinen durchgeführt, die sich zudem noch an ihrem Wirkort in der Hefezelle befinden können. Das Ubiquitin-Protein ist ein konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, das in der Zelle meistens als Abbausignal an Proteine fusioniert wird. Ubiquitinierte Proteine werden bei korrekter Konformation des Ubiquitin-Proteins von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs) erkannt und hinter der C-terminalen Aminosäure des Ubiquitins an der Ubiquitin-Polypeptid-Verbindung gespalten. Bei dem Split-Ubiquitin System wird ein zu untersuchendes Protein an den N- oder den C-Terminus der **N**-terminalen Hälfte des **Ubiquitin**-Proteins (AS 1-37), genannt **Nub**, fusioniert, und das zweite zu untersuchende Protein fusioniert man an den N-Terminus der **C**-terminalen Hälfte des **Ubiquitin**-Proteins, genannt **Cub** (AS 35-76). An den C-Terminus des Cub-Proteins ist zusätzlich ein Reporterprotein fusioniert, das sich aus dem **ProteinA**, der DNA-Bindedomäne **LexA** und dem Transkriptionsaktivator **VP16** zusammen setzt (**PLV**). Bei einer Koexpression zweier Fusionsproteine reassoziieren Nub und CubPLV und es erfolgt eine Abspaltung des Reporters PLV durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Abb. 3.1). Das PLV gelangt in den Zellkern und kann dort z. B. *lacZ*-, *HIS3*- oder *ADE2*-Reportergene aktivieren. Die Interaktion kann mit Hilfe von Messungen der β -Galaktosidase- Aktivität oder durch Wachstumstests auf Medium ohne Histidin und Adenin nachgewiesen werden. Die Effizienz der Reassoziation der beiden Ubiquitin-Hälften Nub und Cub kann herabgesetzt werden, wenn anstelle des nativen Nub eine mutierte Version eingesetzt wird. Eine mögliche Mutation ist der Aminosäureaustausch Ile₁₃→Gly₁₃ (NubWt→NubG). Fusioniert man nun zwei Proteine, die miteinander interagieren, an Cub und an NubG, so erhöht

sich die lokale Konzentration der Cub- und NubG-Fusionsproteine, die Reassoziierung zu einem vollständigen Ubiquitin-Protein wird gefördert, der PLV-Reporter wird abgespalten und aktiviert im Kern vorhandene Reportergene (Abb. 3.1).

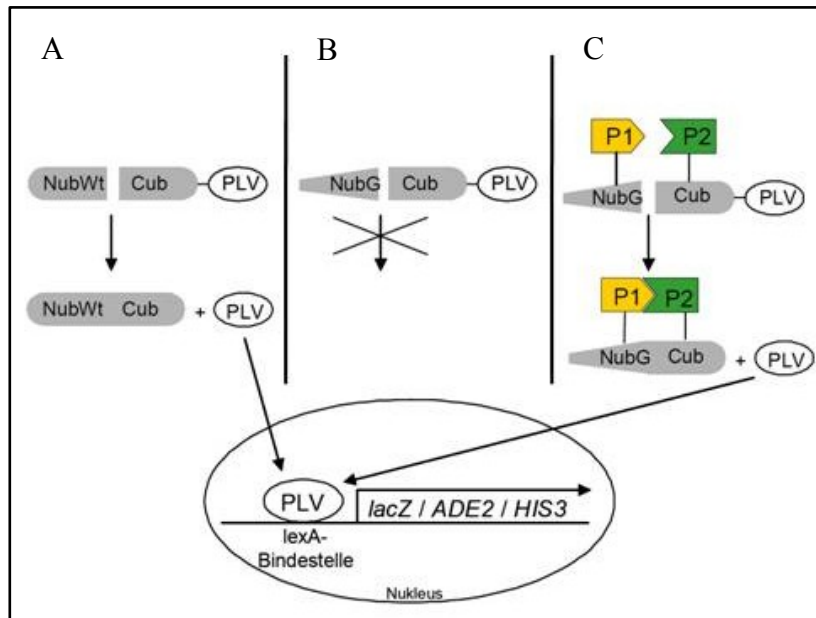


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Split-Ubiquitin Systems

(A) Bei einer Koexpression von NubWt und CubPLV reassoziieren die beiden Hälften und bilden ein vollständiges Ubiquitin. Das Reporterprotein PLV wird durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen abgespalten und gelangt in den Nukleus. (B) Die Reassoziierung der beiden Ubiquitinhälften kann durch eine Mutation des Nub an Position 13 (Ile13→Gly13) (NubG) verhindert werden, so dass die beiden Hälften nicht reassoziieren und das Reporterprotein PLV nicht abgetrennt wird. (C) Bei einer Fusion eines Proteins P1 an NubG und eines Proteins P2 an CubPLV reassoziieren die beiden Ubiquitinhälften wenn P1 und P2 miteinander interagieren. Das

Reporterprotein PLV wird abgespalten, gelangt in den Nukleus und bindet an die *lexA*-Bindestellen im Promotor. Dies führt zur Aktivierung der Transkription der *lacZ*-, *ADE2*- und *HIS3*-Reportergene.

3.1.1.1 Verwendung des Split-Ubiquitin Systems

In dieser Arbeit wurden Plasmide für das Split-Ubiquitin System durch *in vivo*-Rekombination hergestellt, d. h. alle Pmt-Proteine wurden mit NubG und Cub fusioniert. Zuerst wurde die jeweilige *PMT*-Sequenz amplifiziert und auf diese Weise mit bestimmten Linkersequenzen fusioniert. Diese Linkersequenzen flankieren in den Split-Ubiquitin-Vektoren jeweils eine Kanamycin-Kassette. Mit einer *Cl*I-Restriktion wurden die Vektoren in dieser Kassette linearisiert und jeweils ein Vektor mit einem spezifischen PCR-Produkt zusammen in *S. cerevisiae* transformiert. Nach diesen sogenannten Ko-Transformationen konnten die Zellen mit den Cub-Vektoren auf SD-Medium ohne Leucin selektiert werden und die Hefezellen mit den NubG-Vektoren auf SD-Medium ohne Tryptophan. In der Hefezelle fand die homologe Rekombination statt, deren Erfolg über Restriktionsansätze kontrolliert wurde. Dabei wurden die Pmt-Proteine C-terminal mit Cub bzw. NubG fusioniert sowie zusätzlich N-terminal mit NubG (Abb.3.2).

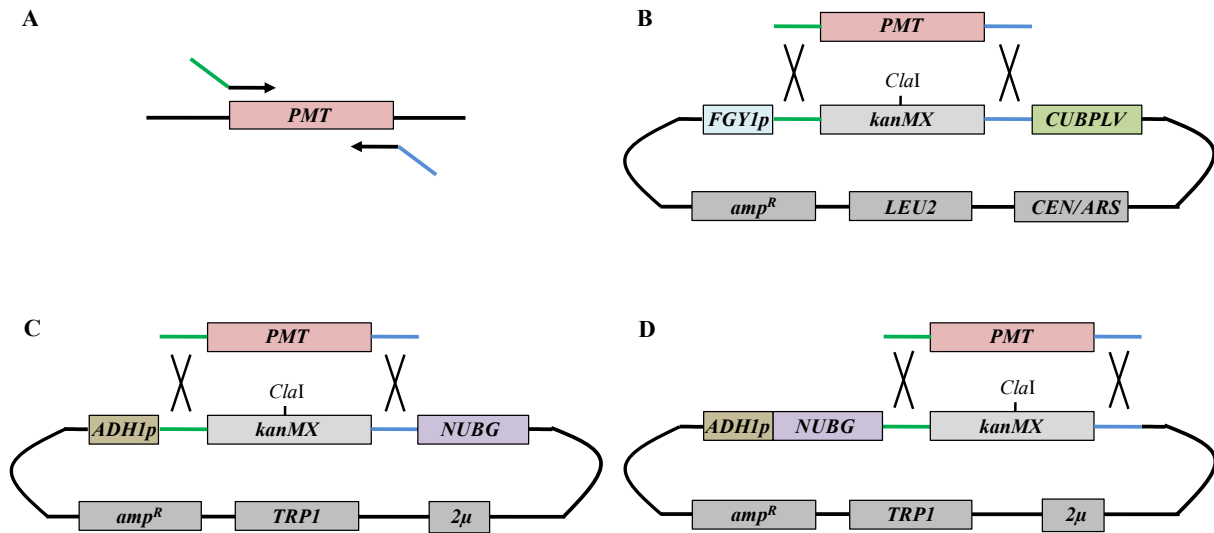


Abb. 3.2: Schema für die *in vivo*-Klonierung der Vektoren für das Split-Ubiquitin System

(A) Mit Hilfe von PCR-Reaktionen wurden spezifische Linkersequenzen an die *PMT* fusioniert. (B) Das Plasmid pFGY1p-kanMXCubPLV wurde mit *Cla*I linearisiert und durch homologe Rekombination über die spezifischen Linkersequenzen wurde die Kanamycin-Kassette mit dem jeweiligen *PMT* ausgetauscht. Auf diese Weise wurde CubPLV an den C-Terminus der Pmt-Proteine fusioniert. (C) Das Plasmid pADH1p-kanMXNubG wurde mit *Cla*I linearisiert und durch homologe Rekombination über die spezifischen Linkersequenzen wurde die Kanamycin-Kassette mit dem jeweiligen *PMT* ausgetauscht. Auf diese Weise wurde NubG an den C-Terminus der Pmt-Proteine fusioniert. (D) Das Plasmid pADH1p-NubG-kanMX wurde mit *Cla*I linearisiert und durch homologe Rekombination über die spezifischen Linkersequenzen wurde die Kanamycin-Kassette mit dem jeweiligen *PMT* ausgetauscht. Auf diese Weise wurde NubG an den N-Terminus der Pmt-Proteine fusioniert.

Aufgrund der vorhergesagten Struktur der Pmt-Proteine, bei der das C-terminale Ende in das ER-Lumen ragt, wurden für die C-terminalen Fusionen verkürzte Pmt-Proteine konstruiert. Bei dieser verkürzten Form fehlt jeweils die siebte Transmembran-Domäne, was dazu führt, dass auch das C-terminale Ende, wie das N-terminale im Cytoplasma lokalisiert. Damit konnten für die N-terminalen NubG-Fusionen sowohl die verkürzte Pmt-Version, wie an die vollständigen Pmt-Proteine konstruiert werden (Abb. 3.3).

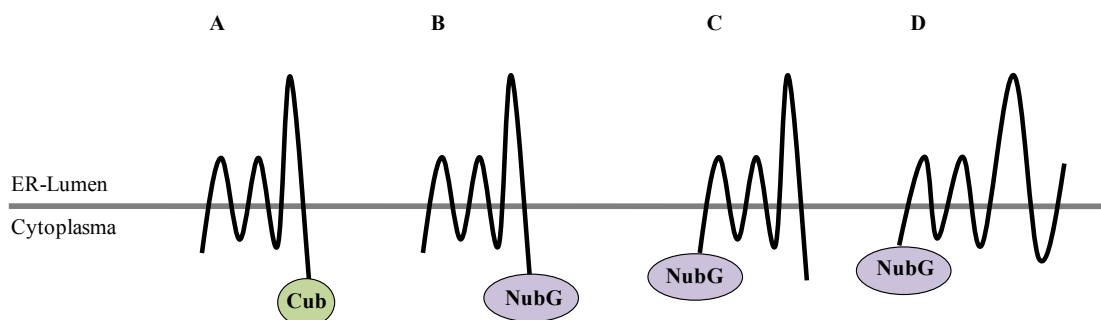


Abb. 3.3: Pmt-Fusionen mit Cub und NubG

(A) Alle verkürzten Pmt-Proteine wurden C-terminal mit Cub fusioniert, damit das Zusammentreffen von NubG und Cub im Cytoplasma ermöglicht wurde. Diese verkürzten Formen der Pmt-Proteine wurden zusätzlich sowohl C-terminal (B) als auch N-terminal (C) mit NubG fusioniert. (D) Die vollständigen Pmts wurden ebenfalls N-terminal mit NubG fusioniert.

Alle Fusionsplasmide mit Cub wurden in einen *S. cerevisiae* *MATa*-Stamm (THY.AP4) transformiert, der drei Reporter-Gene besitzt, sowie alle NubG-Vektoren in einen *MAT α* -Stamm (THY.AP5). Auf diese Weise konnten die unterschiedlichen Kombinationen der Cub- und NubG-Fusionen durch Paarung der einzelnen Stämme erzeugt werden (Abb. 3.4). Zusätzlich zu den NubG-Vektoren, die ein fusioniertes *PMT* trugen, wurde ein Plasmid in den *MAT α* -Stamm transformiert, das ein natives *NUB*-Fragment exprimiert. Dieses NubWt-Protein trägt nicht die Punktmutation von NubG, sondern an Position 13 das normale Isoleucin. Dementsprechend wird die Interaktion von Cub und NubWt nicht inhibiert und Cub und Nub brauchen in diesem Fall keine interagierenden Fusionsproteine, um zu reassoziieren. Auf diese Weise kann nach der Paarung mit einem *MATa*-Stamm, der eines der Cub-Plasmide trägt, überprüft werden, ob *CUB* im richtigen Leserahmen exprimiert wurde. Zum anderen ist diese Paarung ebenfalls eine positive Kontrolle für die Aktivierung der Reportergene. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pADH1p-NubG-kanMX, der ein unfusioniertes *NUBG* exprimiert, ebenfalls in den *MAT α* -Stamm transformiert. Nach der Paarung mit den einzelnen PmtCub-Stämmen sollte sowohl eine Selbstaktivierung der Reporter-Gene durch die unterschiedlichen Cub-Fusionen als auch eine Reassoziierung von Cub und dem freien NubG ausgeschlossen werden können.

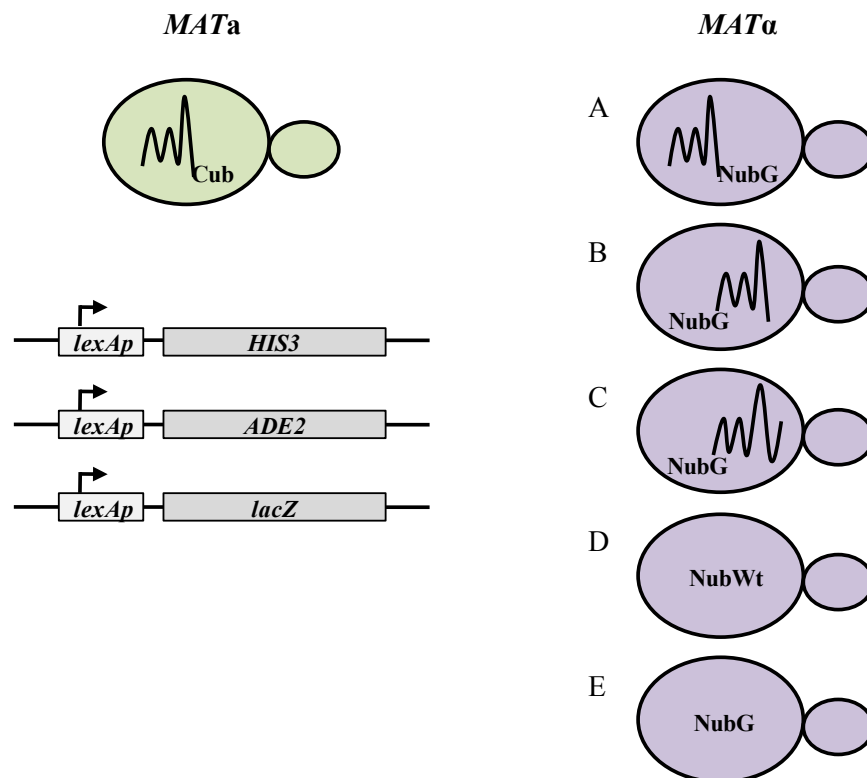


Abb. 3.4: Schema der transformierten *MATa*- und *MAT α* -Stämme

Der *MATa*-Stamm THY.AP4 trägt die Reportergene unter Kontrolle eines *lexA*-Bindestellen enthaltenen Promotors. Dieser Stamm wurde mit allen PmtCub-Fusionen transformiert. Zusätzlich wurden fünf unterschiedliche Plasmid-Gruppen in den *MAT α* -Stamm THY.AP5 transformiert. (A) NubG C-terminal die verkürzten Pmt-Proteine fusioniert

(B) NubG N-terminal an die verkürzten Pmt-Proteine fusioniert (C) NubG N-terminal an die vollständigen Pmt-Proteine fusioniert (D) NubWt, ein natives Nub-Protein als Positivkontrolle (E) NubG ohne Pmt-Fusion als Negativkontrolle

3.1.1.2 C-terminale PmtNubG-Fusionen

Es war bekannt, dass die C-terminal fusionierten NubG-Fusionen allgemein eine schwächere Interaktion mit ihren Cub-fusionierten Partnern zeigen. Zum Beispiel ließen Obrdlik *et al.* (2004) die Hefen mit den C-terminal fusionierten Proteinen neun Tage auf Selektionsmedium für die Reporter wachsen. Im Vergleich dazu zeigten die N-terminal mit NubG fusionierten Proteine schon nach drei Tagen eine Interaktion.

Es wurden alle verkürzten Pmt-Proteine aus *C. albicans* C-terminal mit Cub und mit NubG über homologe Rekombination fusioniert. Für die Amplifikationen der verkürzten *PMT*-Gene wurde genomische DNA des *C. albicans*-Stammes SC5314 als Template eingesetzt und folgende Primer wurden verwendet (siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Primer zum Amplifizieren der verkürzten *PMT*-Gene

Amplifiziertes Gen	Verwendete Primer	Länge der verkürzten <i>PMT</i> -Gene	Länge der vollständigen <i>PMT</i> -Gene
PMT1	p1-PMT1su und p2-PMT1su	2100 bp	2634 bp
PMT2	p1-PMT2su und p2-PMT2su	2148 bp	2310 bp
PMT4	p1-PMT4su und p2-PMT4su	2097 bp	2268 bp
PMT5	p1-PMT5su und p2-PMT5su	2013 bp	2178 bp
PMT6	p1-PMT6su und p2-PMT6su	2355 bp	2481 bp

Jeweils drei unabhängig konstruierte Plasmide wurden in den jeweiligen Hefe-Stamm transformiert. Davon wurden je fünf unabhängige Klone weiter verwendet. Alle *MAT α* -Stämme mit den unterschiedlichen Pmt-Fusionen sowie den beiden Kontrollplasmiden wurden mit den *MAT α* -Stämmen gepaart, die die PmtCub-Plasmide trugen. Selektiert wurde eine erfolgreiche Paarung auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan. Die einzelnen Paarungen der unabhängigen gleichen Plasmide wurden vereinigt und in Flüssigmedium über Nacht angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und zum einen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin getropft, um die Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *ADE2* zu überprüfen. Zum anderen wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan getropft, um die Anwesenheit der beiden Plasmide zu überprüfen und einen sogenannten X-Gal-Overlay-Test durchzuführen (Kapitel 2.6.9). Dieser diente als Nachweis auf die Expression des Reportergens *lacZ*.

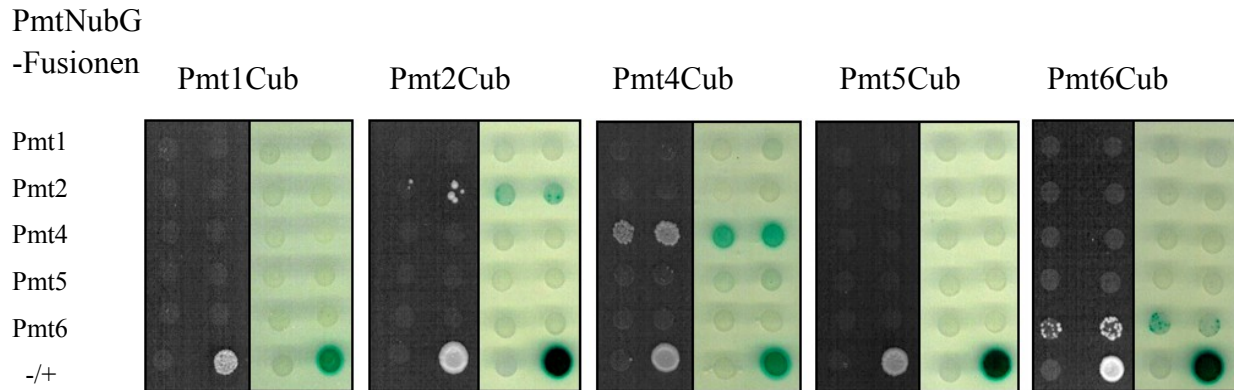
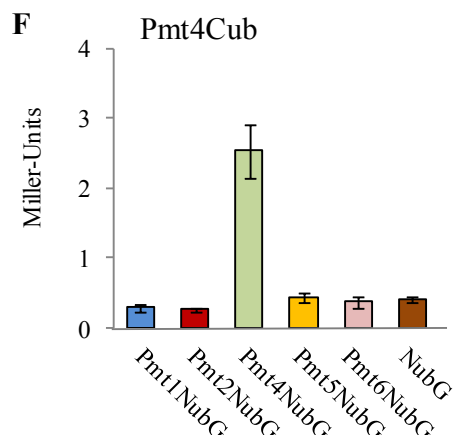
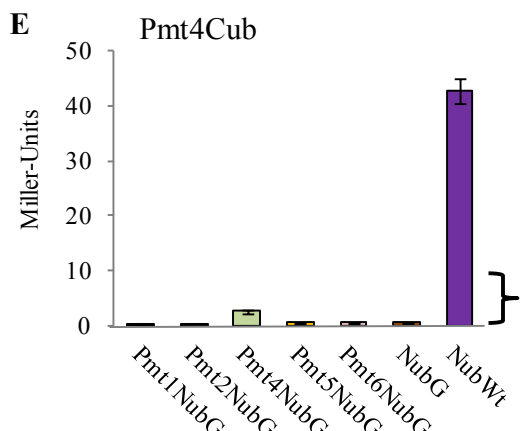
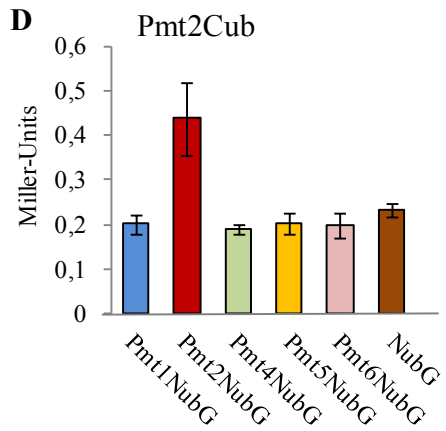
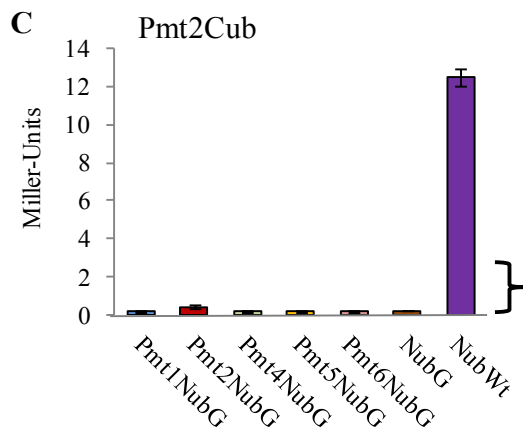
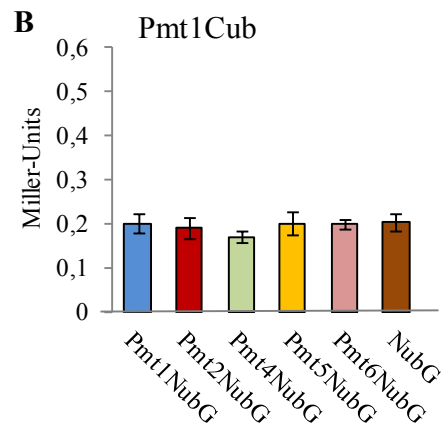
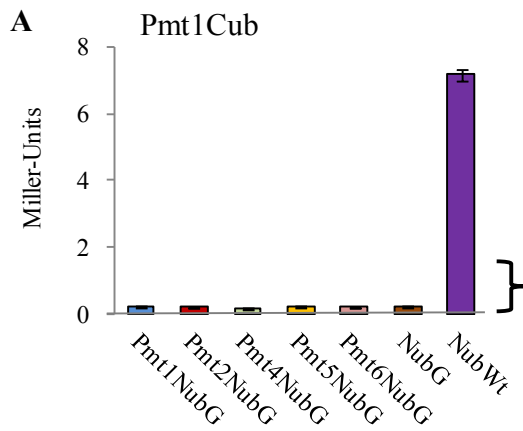


Abb. 3.5: Interaktionen der einzelnen verkürzten Pmt-Proteine C-terminal mit Cub und NubG fusioniert

Diploide Hefen, die jeweils ein Cub-Plasmid und ein NubG-Plasmid enthielten, wurden über Nacht angezogen, auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und davon jeweils 5 μ l auf Nährmedium getropft. Links ist jeweils das Wachstum bei Selektion auf die Reportergene *HIS3* und *ADE2* zu sehen (5 Tage, 30 °C). Rechts ist zum einen das Wachstum auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan nach 2 Tagen bei 30 °C zu erkennen, d. h. Selektion auf die beiden Plasmide (Cub und NubG). Zum anderen wurde ein X-Gal-Overlay durchgeführt, um die Kolonien auf die Expression des dritten Reporters *lacZ* zu testen. Alle Kolonien einer Platte enthielten jeweils einen bestimmten PmtCub-Vektor und die getropfte Reihe von oben nach unten jeweils einen unterschiedlichen PmtNubG-Vektor. (-) bedeutet, dass diese Hefen den Leervektor pADH1p-NubGkanMX als Negativkontrolle enthalten. Dementsprechend bedeutet (+), dass diese Zellen das Plasmid NubWt als Positivkontrolle enthalten.

Wie in Abb. 3.5 zu erkennen ist, sahen die Kontrollen aus wie erwartet, d. h. anhand der Positivkontrolle (NubWt) lässt sich sagen, dass alle PmtCub-Fusionen exprimiert wurden und mit NubWt interagierten. Zusätzlich kann die Aussage getroffen werden, dass alle Reportergene angeschaltet wurden, da die Positivkontrollen sowohl auf dem Selektionsmedium wuchsen, als auch eine Blaufärbung nach dem X-Gal-Overlay zeigten. Währenddessen konnten die Negativkontrollen weder auf dem Selektionsmedium wachsen, noch konnte eine Blaufärbung beobachtet werden. Aufgrund dessen konnte geschlossen werden, dass der Aminosäureaustausch Ile₁₃→Gly₁₃ (NubWt→NubG) tatsächlich eine Interaktion mit Cub vollständig verhinderte. Die Abspaltung des artifiziellen Transkriptionsfaktors PLV wurde erst nach der Interaktion von Nub und Cub möglich, wie anhand dieser Kontrollen zu sehen war. Weiter ließ sich beobachten, dass sowohl Pmt2Cub mit Pmt2NubG, als auch Pmt4Cub mit Pmt4NubG und Pmt6Cub mit Pmt6NubG interagierten. Diese Interaktionen waren deutlich schwächer als die der Positivkontrollen. Aber schon Obrdlik *et al.* (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass die C-terminalen NubG-Fusionen schwächer interagieren als die N-terminalen Fusionen. Demnach konnten in diesem Experiment sowohl Pmt2p als auch Pmt4p und Pmt6p mit sich selbst interagieren. Alle anderen Paarungen zeigten weder Wachstum auf dem Selektionsmedium, noch eine Blaufärbung nach der Übersichtung mit X-Gal. Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurden β -Galaktosidase-Messungen von Flüssigkulturen der gleichen diploiden Stämme durchgeführt (Abb. 3.6).



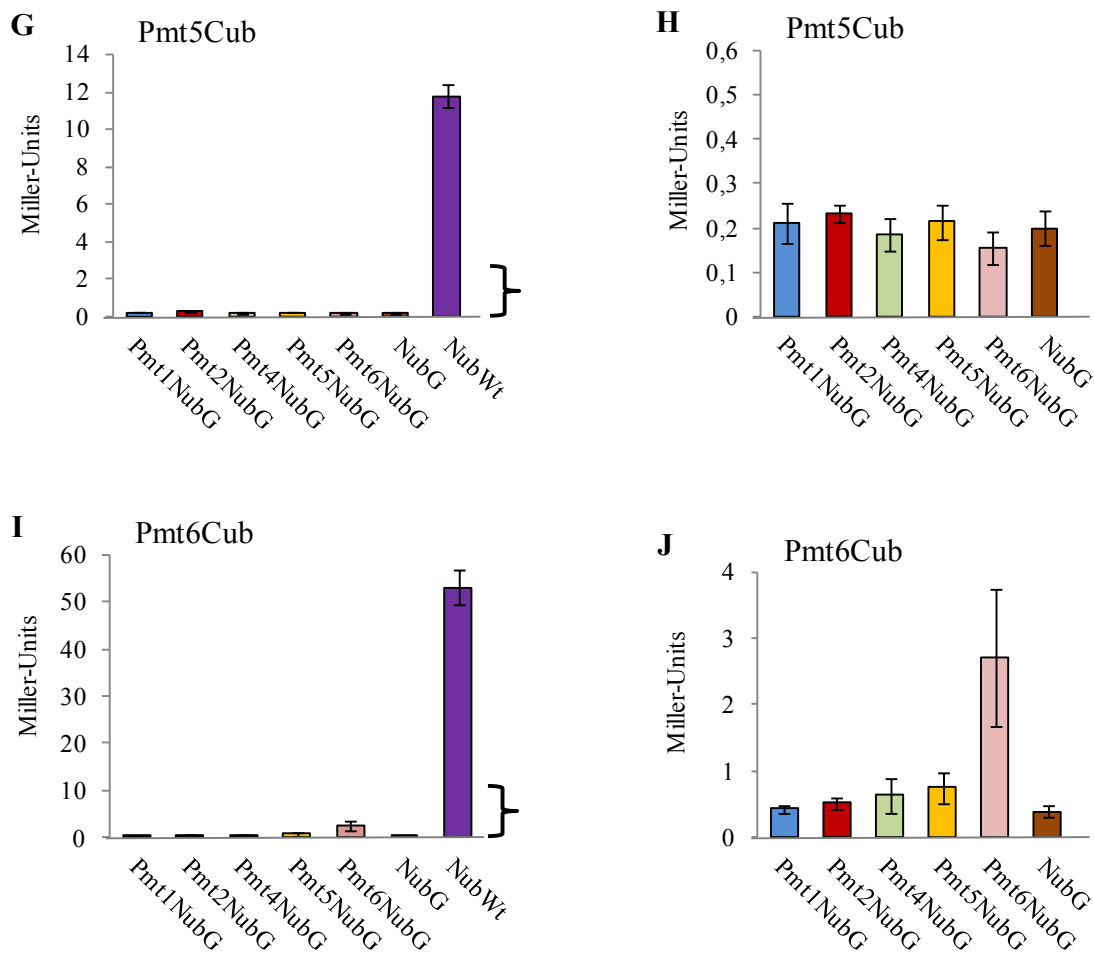


Abb. 3.6: β -Galaktosidase-Messung der C-terminalen Cub- und NubG-Fusionen mit den verkürzten einzelnen Pmt-Proteinen

Von jeder Paarung wurden drei unabhängige diploide Stämme über Nacht in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kultur wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser sechs Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. (B), (D), (F), (H) und (J) zeigen jeweils den Ausschnitt aus (A), (C), (E), (G) bzw. (I) ohne die Positivkontrolle, die in allen Messungen eine so hohe Aktivität zeigte, dass in der jeweiligen Graphik Unterschiede in den anderen Messungen kaum zu sehen waren. Die Positivkontrolle bestand auch hier aus dem diploiden Stamm, der sowohl das jeweilige PmtCub-Plasmid als auch das NubWt-Plasmid trug, während die Negativkontrolle die Paarung aus dem PmtCub-Plasmid und dem NubG-Plasmid darstellte.

Anhand von Abb. 3.6 lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse aus Abb. 3.5 bestätigt wurden. Die diploiden Stämme, die die jeweiligen C-terminalen NubG- und Cub-Fusionen von entweder Pmt2p, Pmt4p oder Pmt6p trugen, zeigten eine deutliche β -Galaktosidase-Aktivität (D, F und J), während alle anderen Paarungen auf dem Aktivitäts-Niveau der Negativkontrolle blieben. Für Pmt4p (F) und Pmt6p (J) betrug die gemessene Aktivität jeweils etwa 3 Miller-Units, während sie für Pmt2p (D) mit etwa 0,5 Miller-Units niedriger war. Bei den Positivkontrollen setzte sich dieser Trend fort. Pmt6Cub zeigte mit NubWt die mit 55 Miller-Units höchste Aktivität, Pmt4Cub folgte mit 45 Miller-Units, während Pmt2Cub nur 13 Miller-Units erreichte. Auch

Pmt5Cub (G) kam nur auf 12 Miller-Units und Pmt1Cub (A) sogar nur auf 7 Miller-Units. Diese Unterschiede konnten zum einen an verschiedenen Kopien-Zahlen liegen, in denen die Cub-Plasmide in der Zelle vorhanden waren. Das Cub-Plasmid ist zwar ein Centromer-Plasmid, aber auch hier gibt es Schwankungen in der Kopien-Zahl, auch wenn diese mit 1-5 Plasmiden pro Zelle eher gering ausfällt. Zum anderen könnte auch das fusionierte Cub-Fragment von dem verkürzten Pmt4p bzw. Pmt6p gut an die Oberfläche des jeweiligen Proteins präsentiert worden sein, während die anderen fusionierten Pmt-Proteine ihr verkürztes C-terminales Ende eher versteckt hielten. Vielleicht war auch die Präsentation gerade bei dem verkürzten Pmt1p so schwach, dass eine eventuelle Interaktion mit den NubG-fusionierten Pmt-Proteinen nicht als deutliche Aktivität zu sehen war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Pmt2p als auch Pmt4p und Pmt6p Homodimere bilden. Während die Dimer-Bildung von Pmt4p aus *S. cerevisiae* schon bekannt war, wurde die von Pmt2p und Pmt6p bisher nicht beobachtet.

3.1.1.3 N-terminale NubGPmt-Fusionen

Obrdlik *et al.* (2004) zeigten, dass generell die Interaktion zwischen Cub-Fusionen und N-terminal an Proteine fusioniertes NubG stärker war als die C-terminalen NubG-Fusionen. In Fall der Pmt-Proteine war es hier möglich, für die N-terminale Fusionen sowohl die verkürzten Versionen, als auch die vollständigen Pmt-Proteine einzusetzen, da das N-terminale Ende der Pmt-Proteine sowieso in das Cytoplasma ragen sollte.

Sowohl die verkürzten als auch die vollständigen Pmt-Proteine aus *C. albicans* wurden mit Hilfe der homologen Rekombination N-terminal mit NubG fusioniert. Für die Amplifikation der verkürzten *PMT*-Gene wurden die gleichen Primer verwendet, die schon für die C-terminalen Fusionen verwendet wurden (Tab. 3.1). Um die vollständigen Pmt-Proteine zu amplifizieren wurden folgende Oligonukleotide verwendet (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Primer zum Amplifizieren der vollständigen *PMT*-Gene

Amplifiziertes Gen	Verwendete Primer	Länge der vollständigen <i>PMT</i> -Gene
PMT1	p1-PMT1su und 3'PMT1I	2634 bp
PMT2	p1-PMT2su und 3'PMT2I	2310 bp
PMT4	p1-PMT4su und 3'PMT4I	2268 bp
PMT5	p1-PMT5su und 3'PMT5I	2178 bp
PMT6	p1-PMT6su und 3'PMT6I	2481 bp

Jeweils drei unabhängig voneinander konstruierte NubG-Plasmide wurden in den *MAT α* -Stamm transformiert. Je fünf unabhängige Klone wurden weiter verwendet. Alle *MAT α* -Stämme mit den unterschiedlichen Pmt-Fusionen sowie den beiden Kontrollplasmiden wurden mit den *MAT α* -Stämmen gepaart, die die PmtCub-Plasmide trugen. Selektiert wurde eine erfolgreiche Paarung

auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan. Die einzelnen Paarungen der unabhängigen gleichen Plasmide wurden vereinigt und in Flüssigmedium über Nacht angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und zum einen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin getropft, um die Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *ADE2* zu überprüfen. Zum anderen wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan getropft, um die Anwesenheit der beiden Plasmide zu überprüfen und einen sogenannten X-Gal-Overlay-Test durchzuführen (Kapitel 2.6.9). Dieser diente als Nachweis auf die Expression des Reportergens *lacZ*.

NubGPmt

-Fusionen

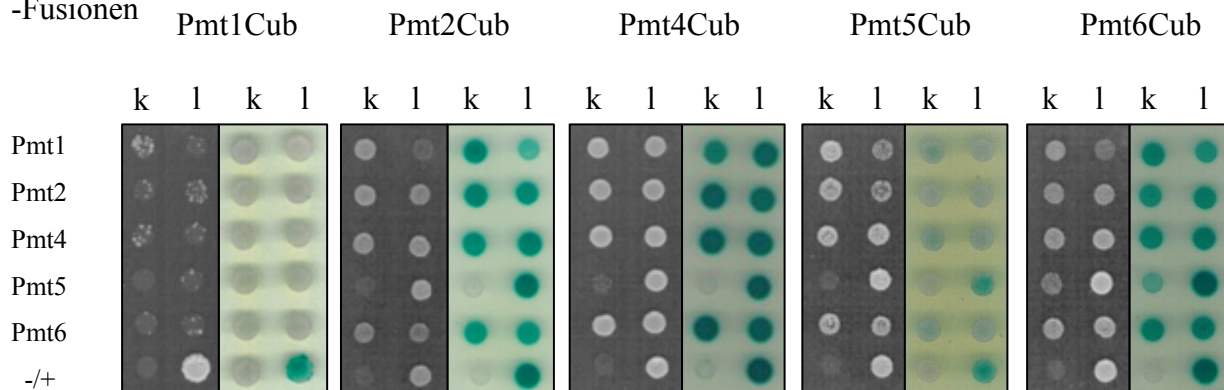


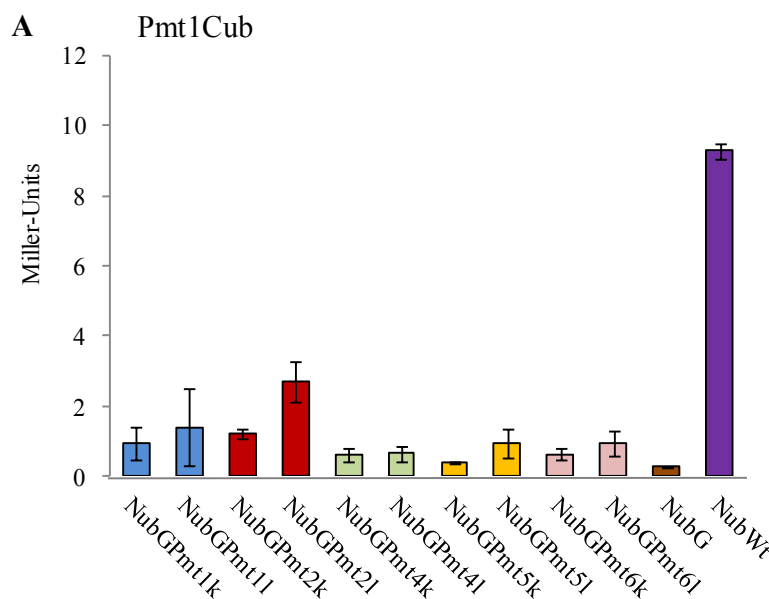
Abb. 3.7: Interaktionen der einzelnen verkürzten und vollständigen Pmt-Proteine N-terminal mit NubG fusioniert

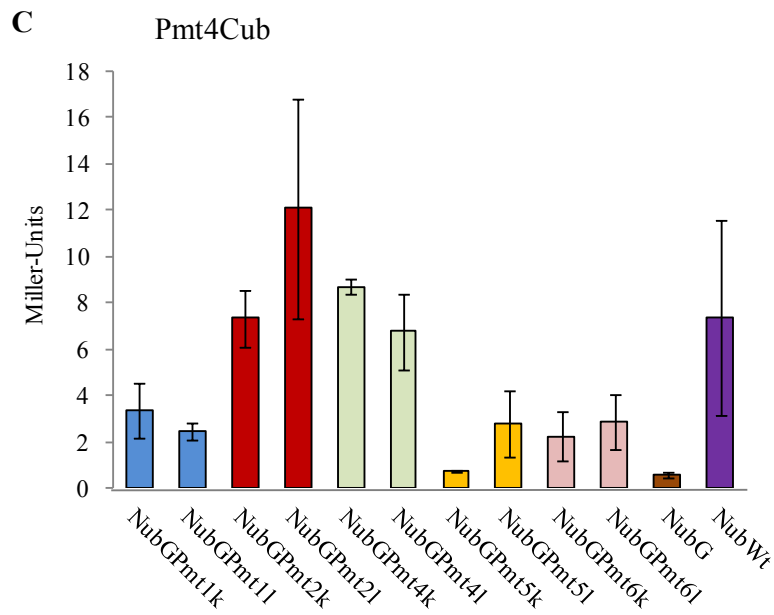
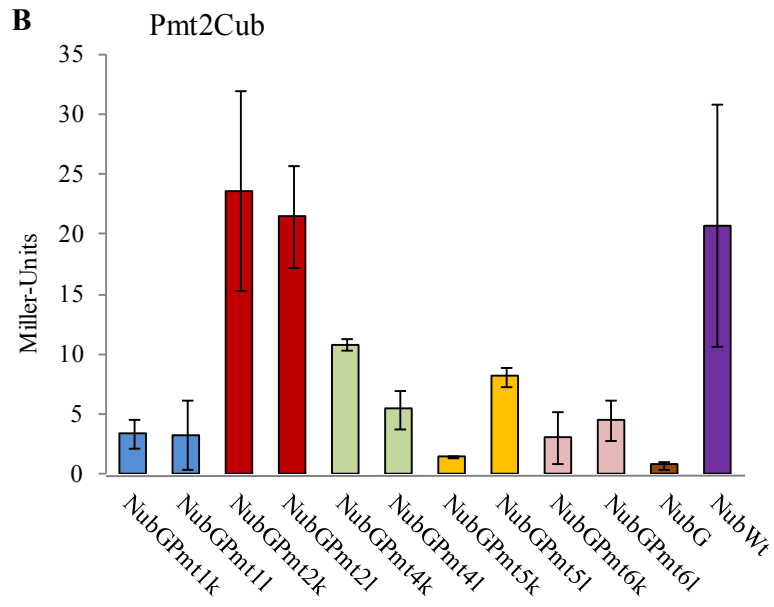
Diploide Hefen, die jeweils ein Cub-Plasmid und ein NubG-Plasmid enthielten, wurden über Nacht angezogen, auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und davon jeweils 5 μ l auf Nährmedium getropft. Links ist jeweils das Wachstum bei Selektion auf die Reportergene *HIS3* und *ADE2* nach fünf Tagen bei 30 °C zu sehen. Rechts ist zum einen das Wachstum auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan zu erkennen, d. h. Selektion auf die beiden Plasmide (Cub und NubG), zum anderen wurde ein X-Gal-Overlay durchgeführt, um die Expression des dritten Reporters *lacZ* zu testen. Alle Kolonien einer Platte enthielten jeweils einen bestimmten PmtCub-Vektor und die getropfte Reihe von oben nach unten jeweils einen unterschiedlichen NubPmt-Vektor. Dabei bedeutet die (k)-Reihe, dass es sich um das jeweilige verkürzte Pmt handelt und bei (l) dementsprechend um das vollständige. (-) heißt, dass diese Hefen den Leervektor pADH1p-NubGkanMX als Negativkontrolle enthielten. Dementsprechend bedeutet (+), dass diese Zellen das Plasmid pNubWt als Positivkontrolle enthielten.

Anhand von Abb. 3.7 lässt sich erkennen, dass es deutliche Unterschiede zu den C-terminal mit NubG fusionierten Pmt-Proteinen gibt (vgl. Abb. 3.5). Zwar funktionierten sowohl Negativ- als auch Positivkontrolle wie erwartet, d. h. die Negativkontrolle wuchs nicht auf dem Selektionsmedium ohne Histidin und Adenin und nahm auch keine Blaufärbung mit X-Gal an, während die Positivkontrolle auf dem Selektionsmedium wuchs und auch die Blaufärbung annahm. Aber fast alle anderen Diploiden der unterschiedlichen Paarungen zeigten ebenfalls Wachstum nach Selektion auf die Reporter Histidin und Adenin. Die Blaufärbungen waren mit Pmt2Cub, Pmt4Cub und Pmt6Cub ebenfalls sehr stark, während diese bei Pmt1Cub und Pmt5Cub kaum vorhanden war. Aber schon in Abb. 3.6 konnte anhand der Positivkontrollen beobachtet werden, dass Pmt1Cub und Pmt5Cub allgemein eine schwächere Interaktion als die

restlichen drei PmtCub-Fusionen eingingen. Nur das verkürzte NubGPmt5 zeigte außer mit Pmt6Cub mit keinem Cub-fusionierten Pmt eine Interaktion.

Demnach ließ sich eine hohe Grundaktivität der Reportergene beobachten, die aber bei den Negativkontrollen als auch den C-terminal mit NubG fusionierten Pmt-Proteinen nicht vorhanden war (Abb. 3.5 und Abb. 3.7). Aufgrund dieser Beobachtungen konnte ausgeschlossen werden, dass die Promotoren der Reportergene diese hohe Grundaktivität aufwiesen. Auch die Abspaltung des Transkriptionsfaktors PLV (Abb. 3.1) ohne das Zusammenfügen der beiden Ubiquitin-Hälften war daher relativ unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die NubG-fusionierten Pmt-Proteine in der Zelle in großer Anzahl vorkamen und so zufällig und relativ unspezifisch auf die Cub-Fusionen treffen konnten. Die NubG-Plasmide liegen als 2 μ -Vektoren in hoher Kopienzahl vor, wobei bei den Negativkontrollen diese hohe Expression der *NUBG*-Gene nicht ins Gewicht fiel, da diese als lösliche Proteine im Cytoplasma zu finden sein sollten. Demgegenüber sind die mit Pmt fusionierten NubGs, wie auch die fusionierten Cubs in der ER-Membran der Zelle lokalisiert. Um weitere Aussagen über die Interaktionen der N-terminal mit NubG fusionierten Pmt-Proteine treffen zu können, musste der hohe Grundumsatz berücksichtigt werden. In diesem Fall war es von Vorteil, dass die Cub- und NubG-Plasmide durch Paarungen in eine Zelle gebracht wurden, da es auf diese Weise möglich war, immer dieselben Hefe-Stämme zu kreuzen und mit großer Wahrscheinlichkeit eine ähnlich hohe Kopienzahl der Plasmide in den resultierenden diploiden Stämmen zu erreichen. Aufgrund dessen war es möglich die Reporteraktivitäten der einzelnen diploiden Stämme durch β -Galaktosidase-Messungen zu quantifizieren (Abb. 3.8).





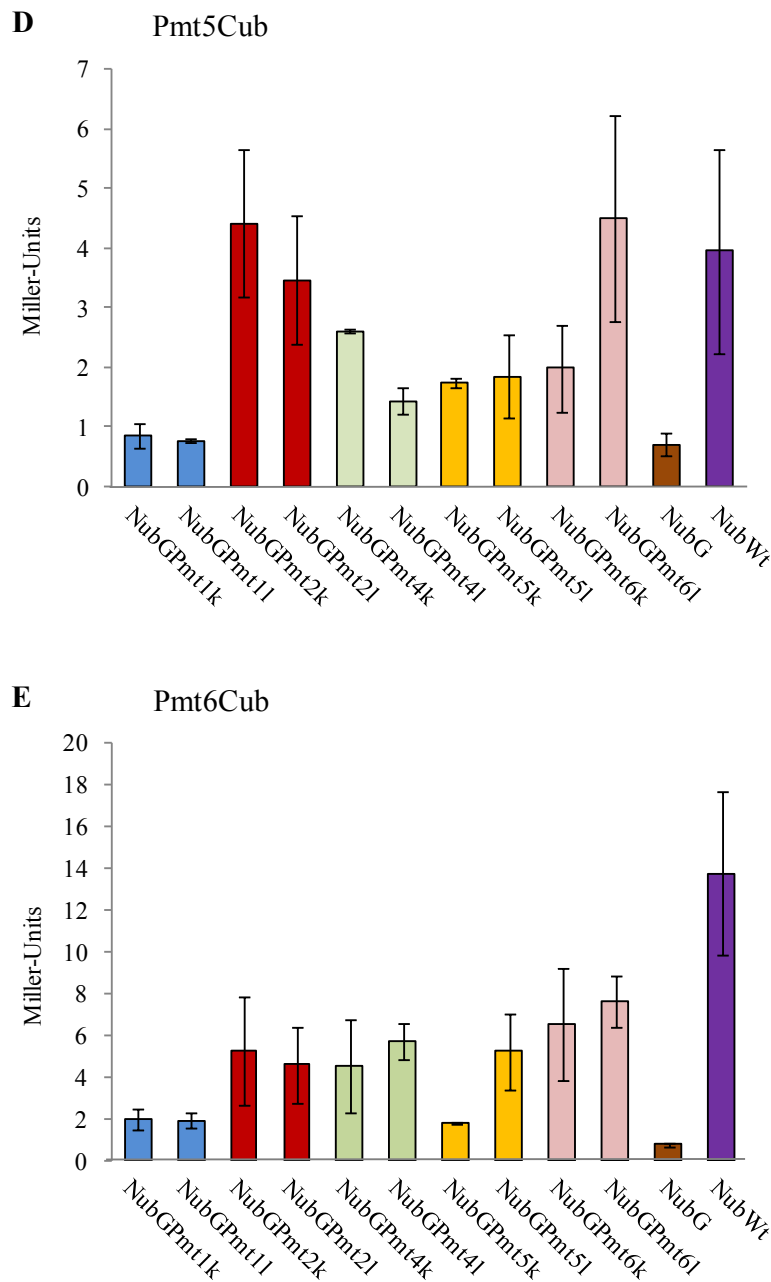


Abb. 3.8: β -Galaktosidase-Messungen der N-terminalen Fusionen von NubG an alle Pmt-Proteine

Von jeder Paarung wurden über Nacht je drei unabhängige diploide Stämme in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kulturen wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser sechs Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. Die Positivkontrolle besteht wiederum aus der Paarung des jeweiligen PmtCub-Stammes mit einem Hefestamm, der das Plasmid pNubWt trägt, während der negative Kontrollstamm den pNubG-Vektor trägt. (k) steht für die Kurzversion der Pmt-Proteine und (l) für die vollständige Version der Pmt-Proteine.

Im Vergleich mit Abb. 3.6 ließ sich in Abb. 3.8 auf den ersten Blick erkennen, dass wie erwartet eine hohe Grundaktivität des *lacZ*-Gens nachgewiesen wurde. Die Unterscheidung zwischen

Hintergrund-Aktivität und echter Aktivierung der Reportergene wurde dadurch erschwert. Für Pmt1Cub ließ sich erkennen, dass alle β -Galaktosidase-Aktivitäten im Vergleich zur Positivkontrolle eher gering ausfielen (Abb. 3.8 A), wobei die Interaktionen mit NubGPmt1 und NubGPmt2 etwas stärker zu sein schien als mit den restlichen NubGPmt-Proteinen. Pmt2Cub zeigte eine deutliche Interaktion mit NubGPmt2 (Abb. 3.8 B). Diese Beobachtung bestätigt das Fazit aus Abb. 3.6 D, wobei das C-terminal an das verkürzte Pmt2p fusionierte NubG mit Pmt2Cub eine deutliche Interaktion zeigte. Das N-terminal an Pmt2p fusionierte NubG zeigte aber auch mit Pmt4Cub und Pmt5Cub eine starke Aktivität (Abb. 3.8 C und D), da in allen Fällen die Aktivität der Positivkontrollen bestehend aus dem jeweiligen PmtCub und NubWt erreicht und sogar zum Teil überschritten wurde. Möglicherweise ging NubGPmt2 eine hohe Anzahl an zufälligen Interaktionen ein. Auch NubGPmt4 zeigte mit fast allen PmtCub-Fusionen eine starke Aktivität, aber nur die Paarung Pmt4Cub und NubGPmt4 erreichte die Aktivität der Positivkontrolle. Dieses Ergebnis bestätigt die Interaktion von Pmt4NubG mit Pmt4Cub (Abb. 3.6. E und F). Auch die Homodimer-Bildung von Pmt6p konnte tendenziell beobachtet werden, denn die β -Galaktosidase-Aktivität von Pmt6Cub zusammen mit NubGPmt6 war stärker als zusammen mit den anderen NubGPmt-Fusionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die N-terminalen NubG-Fusionen an die Pmt-Proteine eine allgemeine Grundaktivität aufweisen, die die Interpretation der Ergebnisse schwierig gestaltet. Trotzdem konnte tendenziell die Homodimer-Bildung von Pmt4p und Pmt6p bestätigt werden.

3.1.1.4 Homodimer-Bildung von Pmt6p nach einer Mutagenese

Aus *S. cerevisiae* war bekannt, dass die Homodimer-Bildung von Pmt4p durch den Austausch eines hoch konservierten Arginin an Position 142 mit einem Glutamat verhindert werden konnte. Demgegenüber hatte die Deletion der potentiellen katalytischen Domäne keinen Einfluss auf die Fähigkeiten von Pmt4p, Homodimere zu bilden (Girrbach und Strahl, 2003). Interessanterweise war die Beobachtung bei Pmt4p aus *C. albicans* genau umgekehrt. Der Austausch des konservierten Arginin an Position 137 mit einem Glutamat hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Homodimeren, während die große fünfte hydrophile Domäne essentiell für die Komplexbildung war (Misselwitz, 2007).

Dementsprechend sollte in Pmt6p aus *C. albicans* das konservierte Arginin zu Glutamat getauscht werden, das hier an Position 179 zu finden war. Auch die potentielle katalytische Domäne wurde deletiert (AS 367 bis AS 669), um die Auswirkungen auf die Homodimer-Bildung von Pmt6p zu untersuchen. Beide Mutationen wurden in die Plasmide pPmt6Cub und pPmt6NubG über einen gezielten Basen-Austausch eingeführt (Kapitel 2.4.13). So entstanden die Vektoren pPmt6_R179E-NubG, und pPmt6_R179E-Cub sowie pPmt6 Δ loop5-NubG und pPmt6 Δ loop5-Cub, die alle durch Sequenzierung überprüft wurden. Die NubG-Vektoren wurden in den *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP5 transformiert und die beiden Cub-Vektoren in den Stamm

THY.AP4. Anschließend wurden die Transformanten miteinander gepaart und die entstandenen Diploiden auf ihre Reporter-gen-Expression untersucht (Abb. 3.9 und Abb. 3.10).

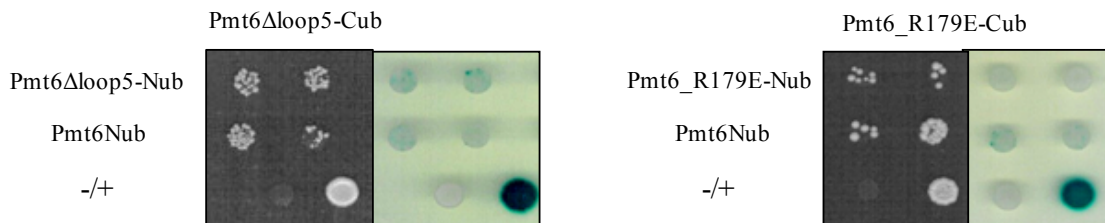


Abb. 3.9: Qualitative Messungen der Interaktionen der mutierten Pmt6-Fusionsproteine

Diploide Hefen, die jeweils ein Cub-Plasmid und ein NubG-Plasmid enthielten, wurden über Nacht angezogen, auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und davon jeweils 5 μ l auf Nährmedium getropft. Links ist jeweils das Wachstum bei Selektion auf die Reportergene *HIS3* und *ADE2* nach fünf Tagen bei 30 °C zu sehen. Rechts ist zum einen das Wachstum nach zwei Tagen bei 30 °C auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan zu erkennen, d. h. Selektion auf die beiden Plasmide (Cub und NubG). Zum anderen wurde ein X-Gal-Overlay durchgeführt, um die Kolonien auf die Expression des dritten Reporters *lacZ* zu testen. Alle Kolonien einer Platte enthalten jeweils einen bestimmten PmtCub-Vektor und die getropfte Reihe von oben nach unten jeweils einen unterschiedlichen NubG-Vektor. (-) heißt, dass diese Hefen den Leervektor pADH1p-NubGkanMX als Negativkontrolle enthielten. Dementsprechend bedeutet (+), dass diese Zellen das Plasmid pNubWt als Positivkontrolle enthielten.

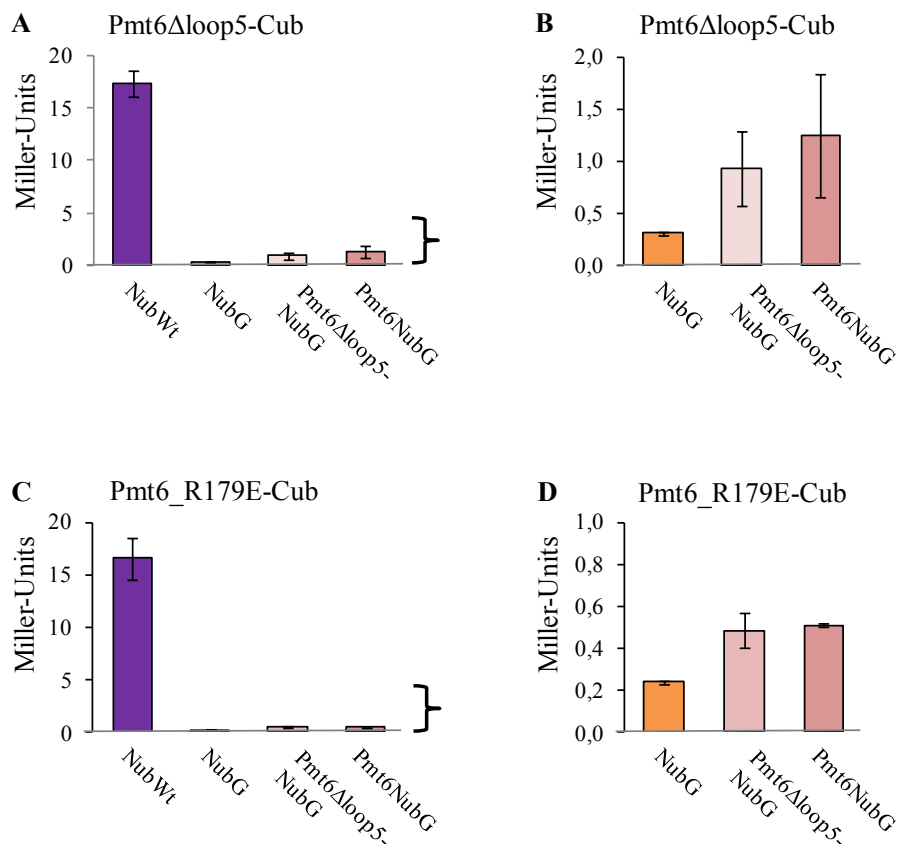
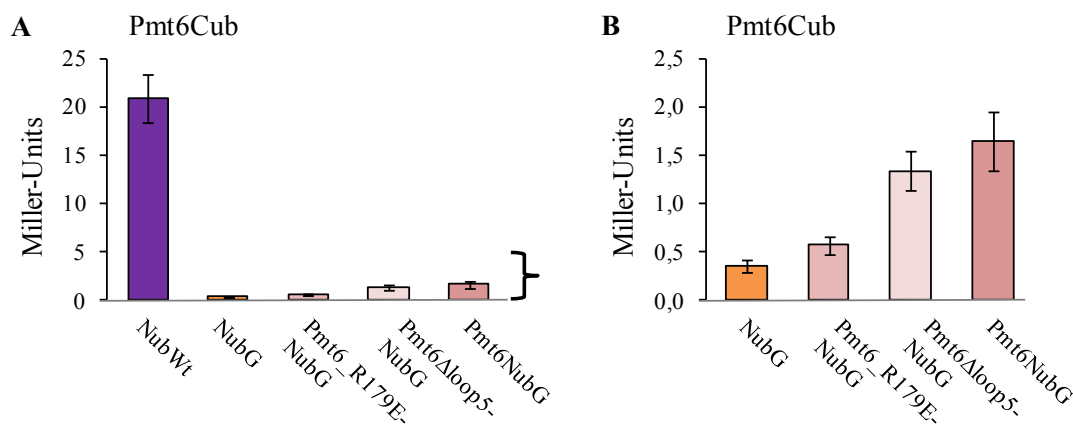


Abb. 3.10: β -Galaktosidase-Messungen der Interaktionen der mutierten *Pmt6NubG*- und *Pmt6Cub*-Proteine

Von jeder Paarung wurden drei unabhängige diploide Stämme über Nacht in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kultur wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser sechs Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. (B) und (D) zeigen jeweils den Ausschnitt aus (A) und (C) ohne die Positivkontrolle, die in allen Messungen eine so hohe Aktivität zeigte, dass in der jeweiligen Graphik Unterschiede in den anderen Messungen kaum zu sehen waren. Die Positivkontrolle bestand auch hier aus dem diploiden Stamm, der sowohl das jeweilige Cub-Plasmid als auch das NubWt-Plasmid trug, während die Negativkontrolle die Paarung aus dem Cub-Plasmid und dem NubG-Plasmid darstellte.

Anhand von Abb. 3.10 lässt sich erkennen, dass beide mutierte *Pmt6*-Versionen noch in geringem Maße Homodimere bilden. Die Interaktion zwischen *Pmt6 Δ loop5-Cub* und *Pmt6 Δ loop5-NubG* war aber deutlich stärker als zwischen *Pmt6_{R179E}-Cub* und *Pmt6_{R179E}-Nub*, obwohl die Interaktion mit NubWt als Positivkontrolle bei beiden Cub-Fusionen etwa gleich stark war. Demnach lag dieser Unterschied nicht an der Expression des Cub-Fusionsproteins oder der sterischen Präsentation des Cub im Protein. Daraufhin wurden die Interaktionen zwischen *Pmt6Cub* und den einzelnen mutierten *Pmt6NubG* untersucht (Abb. 3.11).

**Abb. 3.11: β -Galaktosidase-Messungen der Interaktionen der mutierten *Pmt6NubG*-Proteine mit *Pmt6Cub***

Von jeder Paarung wurden drei unabhängige diploide Stämme über Nacht in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kultur wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser sechs Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. Dabei zeigt (B) den Ausschnitt aus (A) ohne die Positivkontrolle, die in der Messung eine so hohe Aktivität zeigte, dass in der Graphik (A) Unterschiede der Messungen kaum zu sehen waren. Die Positivkontrolle bestand auch hier aus dem diploiden Stamm, der sowohl das jeweilige Cub-Plasmid als auch das NubWt-Plasmid trug, während die Negativkontrolle die Paarung aus dem Cub-Plasmid und dem NubG-Plasmid darstellte.

In Abb. 3.11 bestätigt sich die Beobachtung, dass die Interaktion zwischen *Pmt6 Δ loop5* und dem nicht-mutierten *Pmt6* ähnlich schwach war wie die zwischen zwei nicht-mutierten *Pmt6*-Proteinen, egal welches Protein an NubG und welches an Cub fusioniert war. Der R179E-Aminosäureaustausch setzte die Interaktion stark herab, schon wenn nur eines der beiden involvierten *Pmt6*-Proteine mutiert war.

Abschließend lässt sich sagen, dass diese Ergebnisse denen für Pmt4p ähneln. Auch hier setzte der Aminosäureaustausch die Dimer-Bildung deutlich herab, während die Deletion des loop5 keine Auswirkungen auf die Homodimer-Bildung hatte.

3.1.2 Biochemische Überprüfung der Pmt-Interaktionen

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin Systems waren deutliche Homodimere von Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p (Kapitel 3.1.1.2) nachgewiesen worden. Unter Verwendung der N-terminalen PmtNubG-Fusionen waren diese Homodimer-Bildungen wegen der hohen Hintergrundaktivität nicht so deutlich zu bestimmen, aber in der Tendenz auch erkennbar (Kapitel 3.1.1.3). Mit einer Koimmunopräzipitation sollten diese Pmt-Interaktionen verifiziert werden.

3.1.2.1 Markierung der Pmt-Proteine mit dem HA-Epitop (*URA3*-Marker)

Um die Pmt-Proteine präzipitieren zu können, sollten sie mit Epitopen fusioniert werden, gegen die es kommerziell erwerbbar Antikörper für die Detektion zur Verfügung standen. Die erste Wahl war ein dreifacher HA-Tag, da dessen Funktionalität für *C. albicans*-Proteine schon mehrfach nachgewiesen werden konnte (Prill *et al.*, 2005, Noffz, 2007). Die Pmt-Proteine sollten C-terminal mit dem dreifachen HA-Epitop fusioniert werden. Hierfür wurde das Epitop zusammen mit dem *URA3*-Gen als Selektionsmarker vom Plasmid p3HA-*URA3* amplifiziert. Aufgrund dieser PCR-Reaktionen wurden das dreifache *HA* und der Selektionsmarker mit homologen Sequenzen für die Integration ins Genom versehen. Diese Sequenzen waren jeweils etwa 70 Nukleotide lang und für das jeweilige Pmt spezifisch (Abb. 3.12).

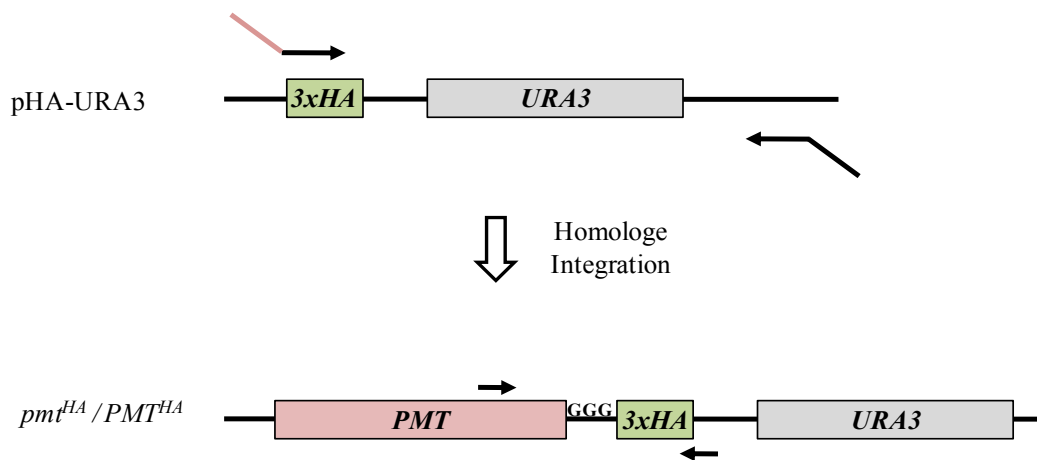


Abb. 3.12: Schema für die HA-Epitop-Markierung des *PMT*-Gens mit dem *URA3*-Selektionsmarker

Die großen Pfeile im oberen Bild stellen das Primerpaar für die Amplifikation des *3xHA-URA3* Fragmentes dar. Die kleinen Pfeile im unteren Bild geben die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR an.

Zusätzlich wurde auf diese Weise ein Adapter von drei Glycin-Resten zwischen den C-Terminus des jeweiligen Pmt und des HA-Epitops eingefügt. Die amplifizierten Sequenzen wurden in den für das jeweilige *PMT* heterozygoten *C. albicans*-Stamm transformiert und die Transformanten

wurden auf SD-Medium selektiert. Die gewachsenen Kolonien wurden vereinzelt und mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Integration überprüft. Der 3'-Primer erkannte eine Sequenz im integrierten Fragment und der 5'-Primer im jeweiligen genomischen *PMT* (Abb. 3.12). Demnach sollte nach einer erfolgreichen homologen Integration ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert werden können. Gleichzeitig sollte nach einer Integration an einen falschen Locus bzw. keiner Integration kein Fragment amplifiziert werden. Als Beispiel ist hier die Kolonie-PCR von Transformanten gezeigt, die jeweils mit dem *PMT4^{HA}*- bzw. mit dem *PMT5^{HA}*-Fragment transformiert worden waren (Abb. 3.13).

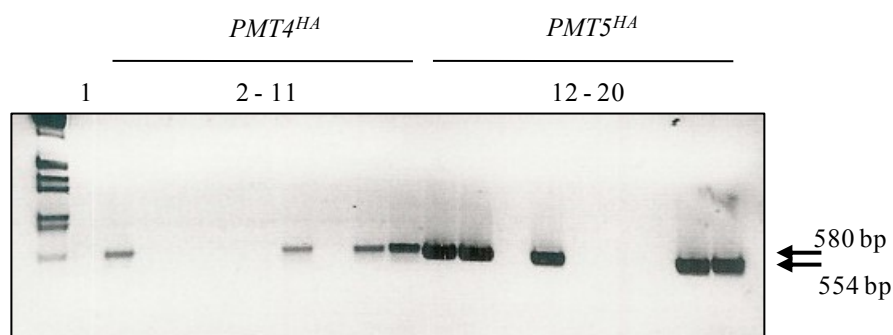


Abb. 3.13: Verifikations-PCR für das HA-Epitop

Gezeigt ist exemplarisch die Verifikations-PCR von Stämmen, die mit dem *PMT4^{HA}*-Fragment bzw. mit dem *PMT5^{HA}*-Fragment transformiert worden waren. In Spur 1 wurde als Negativkontrolle eine PCR-Reaktion des unmarkierten Stammes SC5314 aufgetragen.

Für alle *Pmt*-Isoformen konnten auf diese Weise Stämme identifiziert werden, die das *HA-URA3*-Fragment am richtigen Locus homolog integriert hatten. Dabei fiel auf, dass für alle *Pmt*-Isoformen eine Rekombinationshäufigkeit von etwa 50 % erreicht wurde, bei den Transformanten des *pmt1Δ/ PMT1*-Stammes aber nur etwa 20 %. Von den positiv getesteten Stämmen wurden Rohextrakte isoliert und mit einem Immunoblot die Expression der Epitop-markierten *Pmt*-Proteine überprüft (Abb. 3.14).

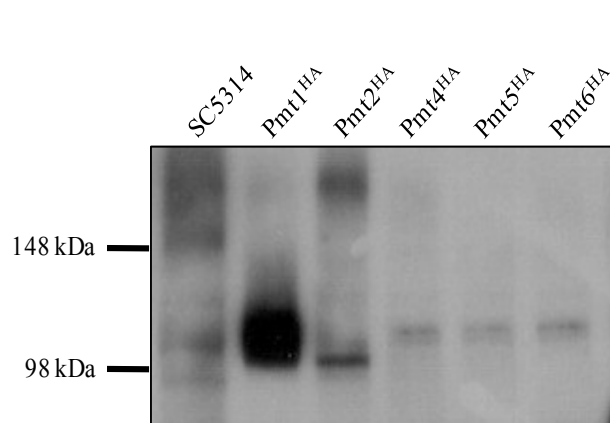


Abb. 3.14: Immunoblot-Analyse der Epitop-Markierung mit HA von Pmt1p und Pmt2p

SC5314 ist der unmarkierte Wildtyp als Negativkontrolle. *Pmt1^{HA}* wurde hier in dem Stamm CIS1 sowie *Pmt2^{HA}* in dem Stamm CIS5 nachgewiesen. Die Banden bei *Pmt4*, 5 und 6 waren unspezifisch und die Markierung mit HA konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurden jeweils 40 µg Protein der ganzen Rohextrakte, bzw. 4 µg von Stamm CIS1 auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:2000 verdünnten Anti-HA Antikörpern, die direkt mit Peroxidase gekoppelt waren (Kapitel 2.6.7).

Wie in Abb. 3.14 zu sehen, wurden *Pmt1p* und *Pmt2p* erfolgreich mit dem HA-Epitop markiert. Für die restlichen drei *Pmt*-Isoformen war die Markierung auf diese Art nicht erfolgreich, obwohl jeweils eine unspezifische Bande zu erkennen war. Aber diese Bande tauchte auch bei

aufgetrennten Rohextrakten des Wildtyp-Stammes auf und zudem war eine Präzipitation mit Anti-HA Antikörpern nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3.14 fiel auf, dass die Bande von Pmt1^{HA} sehr viel stärker war als die von Pmt2^{HA} , obwohl der Rohextrakt von Stamm CIS1 schon 1:10 verdünnt worden war. Für Pmt1p war eine theoretische molekulare Masse von 99,9 kDa erwartet worden, während Pmt2p 88,4 kDa groß sein sollte. Für Pmt1p stimmte die errechnete Größe mit dem Laufverhalten überein, auch wenn die Bande sehr breit war und dementsprechend nur ungenau abgeschätzt werden konnte. Dagegen war Pmt2p etwa 10 kDa größer als vorher errechnet, wies aber eine klar abgegrenzte Bande auf. Zusätzlich zeigte sich hier im hochmolekularen Bereich ein Protein-„Schmier“, der möglicherweise auf Glykosylierungen zurückzuführen ist.

3.1.2.2 Markierung der Pmt-Proteine mit dem HA-Epitop (*SATI*-Marker)

Um eine weitere Epitop-Markierung in die Stämme einführen zu können, musste ein zweiter Selektionsmarker neben dem *URA3*-Gen etabliert werden. Zudem sollten für die Untersuchung der Homodimere die Pmt-Proteine auch im Wildtyp markiert werden. Da für Pmt1p und Pmt2p schon nachgewiesen werden konnte, dass sie sich mit dem HA-Epitop markieren und nachweisen lassen, wurde dieses Epitop verwendet, um den dominanten Marker *SATI* zu etablieren. Das *SATI*-Gen wurde für die Verwendung in *C. albicans* optimiert (Reuß *et al.*, 2004). Es kodiert für eine *N*-Acetyltransferase, die eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin verursacht.

Aus dem Vektor pSAT1-3HA wurde ein Fragment amplifiziert, das die *3xHA*- und die *SATI*-Sequenz enthielt. Wieder wurden mit Hilfe der gleichen PCR etwa 70 Nukleotide auf jeder Seite mit diesem Fragment fusioniert, die eine homologe Rekombination in Genom ermöglichen (Abb. 3.15).

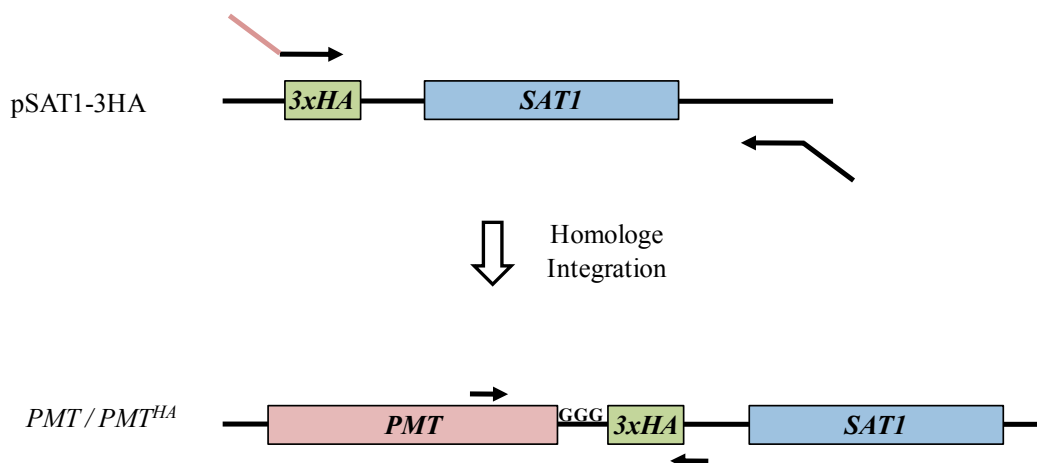


Abb. 3.15: Schema für die HA-Epitop-Markierung der *PMT*-Gene mit dem *SATI*-Selektionsmarker

Die großen Pfeile im oberen Bild stellen das Primerpaar für die Amplifikation des *3xHA-URA3* Fragmentes dar. Die kleinen Pfeile im unteren Bild geben die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR an.

Auch hier wurde ein Glycin-Adapter zwischen das Pmt und das Epitop fusioniert. Diesmal wurden alle PCR-Produkte in den Stamm CAI4 transformiert, der bis auf das fehlende *URA3*-Gen wildtypisch ist. Die Transformanten wurden auf YPD-Medium mit 200 µg/ml Nourseothricin selektiert und vereinzelt. Positive Kolonien wurden wieder mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft, wobei für das *PMT1^{HA}*-Allel eine Fragmentgröße von 335 bp und für das *PMT2^{HA}*-Allel von 492 bp erwartet wurde (Abb. 3.16).

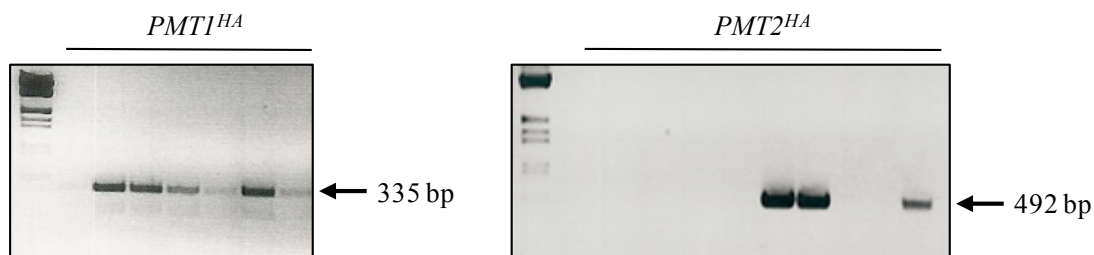


Abb. 3.16: Verifikations-PCR für das HA-Epitop

Gezeigt ist exemplarisch die Verifikations-PCR von Stämmen, die mit dem *PMT1^{HA}*-Fragment bzw. mit dem *PMT2^{HA}*-Fragment transformiert worden waren.

Von den Stämmen, die in der Kolonie-PCR das richtige Fragment aufwiesen, wurden Rohextrakte hergestellt. Diese wurden wiederum mit einem Immunoblot auf die korrekte Expression der mit dem HA-Epitop markierten Pmt-Proteine untersucht (Abb. 3.17).

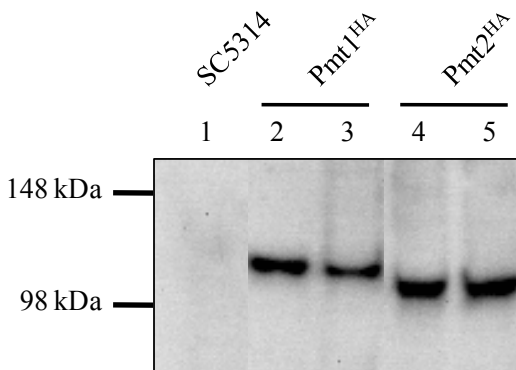


Abb. 3.17: Immunoblot-Analyse der HA-Markierung von Pmt1p und Pmt2p in CAI4

SC5314 ist der unmarkierte Stamm als Negativkontrolle (Spur 1). *Pmt1^{HA}* wurde in den Stämmen CIS23 (Spur 2) und CIS24 (Spur 3) nachgewiesen und *Pmt2^{HA}* in den Stämmen CIS25 (Spur 4) und CIS26 (Spur 5). Es wurden jeweils 40 µg der ganzen Rohextrakte auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:2000 verdünnten Anti-HA Antikörpern, die direkt mit der Peroxidase gekoppelt waren (Kapitel 2.6.7).

In Abb. 3.17 fällt auf, dass *PMT1* im Stamm CAI4 nicht so stark exprimiert wurde wie in dem halbdisruptierten Stamm CAP1-31 (vergl. Abb. 3.14). Hier schienen die *Pmt1^{HA}*- und *Pmt2^{HA}*-Banden sogar ungefähr gleich stark zu sein. *Pmt1^{HA}* lief mit etwas höherer molekularer Masse als *Pmt2^{HA}* und beide liefen mit größerer Masse als vorher theoretisch mit 99,9 kDa bzw. 88,4 kDa errechnet. In beiden Fällen waren die Banden klar abgegrenzt.

3.1.2.3 Markierung mit dem Flag-Epitop

Um eine Koimmunopräzipitation durchführen zu können, wurde eine zweite Epitop-Markierung benötigt. Zuerst wurde versucht, *Pmt1p* und *Pmt2p* mit dem Flag-Epitop zu markieren, der schon erfolgreich für die Epitop-Markierung von Proteinen in *C. albicans* verwendet worden war

(Umeyama et al., 2002; Weber, 2001). Dabei wurde der Vektor pSK2 als Matrize für die Amplifikation eines Fragments, das sowohl die Sequenzen für *FLAG* als auch für den *URA3*-Marker enthielt, genutzt. Auch zwischen das Flag-Epitop und das jeweilige Pmt wurde ein Glycin Adapter fusioniert (Abb. 3.18).

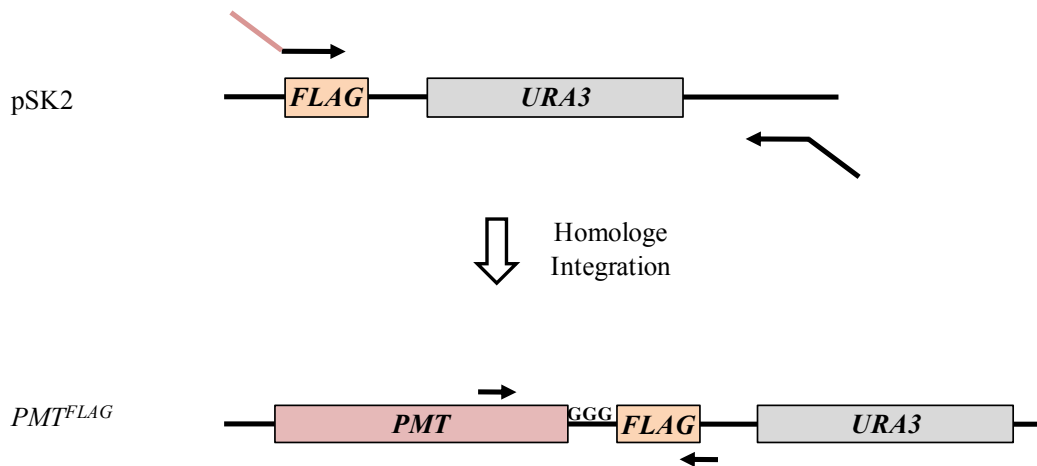


Abb. 3.18: Schema für die *FLAG*-Epitop-Markierung der *PMT*-Gene mit dem *URA3*-Selektionsmarker

Die großen Pfeile im oberen Bild stellen das Primerpaar für die Amplifikation des *3xHA-URA3* Fragmentes dar. Die kleinen Pfeile im unteren Bild geben die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR an.

Auch diese amplifizierten Fragmente enthielten flankierende homologe Bereiche der betreffenden *PMT*-Gene und wurden in den Stamm CAI4 transformiert. Nach Selektion auf SD-Medium wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, wobei für *PMT1^{FLAG}* ein Produkt von 338 bp erwartet wurde und für *PMT2^{FLAG}* ein Produkt von 495 bp (Abb. 3.19).

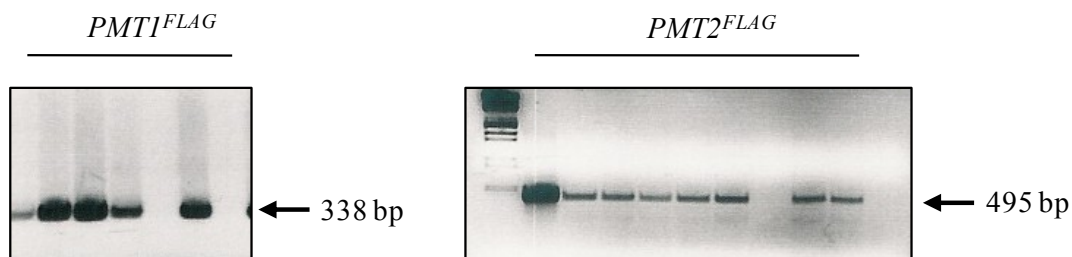


Abb. 3.19: Verifizierungs-PCR für das Flag-Epitop

Gezeigt ist exemplarisch eine Kolonie-PCR für den Nachweis der Integration der *FLAG*-Fragmente. Dabei sind im rechten Bild die Fragmente von *PMT1^{FLAG}* zu sehen und im linken Bild von *PMT2^{FLAG}*. In der jeweils letzten Spur wurde als Negativkontrolle die PCR-Reaktion des Stammes SC5314 aufgetragen.

Die mit Hilfe der Kolonie-PCR positiv getesteten Stämme wurden mit einem Immunoblot auf die Expression von Pmt1^{Flag} und Pmt2^{Flag} untersucht (Abb. 3.20).

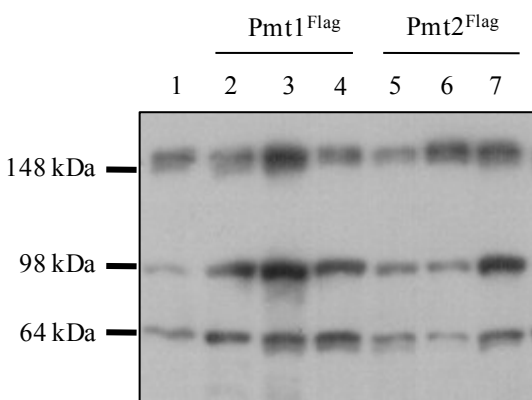


Abb. 3.20: Immunoblot-Analyse der Flag-Markierung von Pmt1p und Pmt2p

Gezeigt ist exemplarisch die Immunoblot-Analyse von jeweils drei Stämmen von Pmt1^{Flag} (Spur 2-4) bzw. Pmt2^{Flag} (Spur 5-7). In Spur 1 wurde als Negativkontrolle Rohextrakt des Stammes SC5314 aufgetragen. Es wurden jeweils 40 µg der ganzen Rohextrakte auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:1000 Anti-Flag Antikörpern, die direkt mit der Peroxidase gekoppelt waren (Kapitel 2.6.7).

In Abb. 3.20 lässt sich erkennen, dass es drei starke Hintergrund-Banden gibt, die auch im Rohextrakt des unmarkierten Stammes SC5314 detektiert werden konnten. Eine davon lag ungefähr auf der Höhe, auf der die Banden für das markierte Pmt1p bzw. Pmt2p erwartet wurden, nämlich etwa bei 100 kDa. Die Banden auf dieser Höhe in den Spuren 2-7, in denen die wahrscheinlich Flag-markierten Proteine zu finden waren, waren deutlich stärker, als die des unmarkierten Wildtyps in Spur 1, aber man konnte aufgrund der Hintergrund-Bande nicht mit Sicherheit feststellen, dass markierte Pmt-Proteine vorhanden waren.

3.1.2.4 Markierung mit dem V5-Epitop

Eine weitere Markierungsmöglichkeit ist das V5-Epitop, mit dem ebenfalls schon Proteine in *C. albicans* markiert worden waren (Martinez *et al.*, 2004). Dabei wurde der Vektor pV5-URA3 als Matrize für die Amplifikation eines Fragments, das sowohl die Sequenz von *V5* als auch die des *URA3*-Marker enthielt, genutzt. Auch zwischen das V5-Epitop und das jeweilige Pmt wurde ein Glycin Adapter fusioniert (Abb. 3.21).

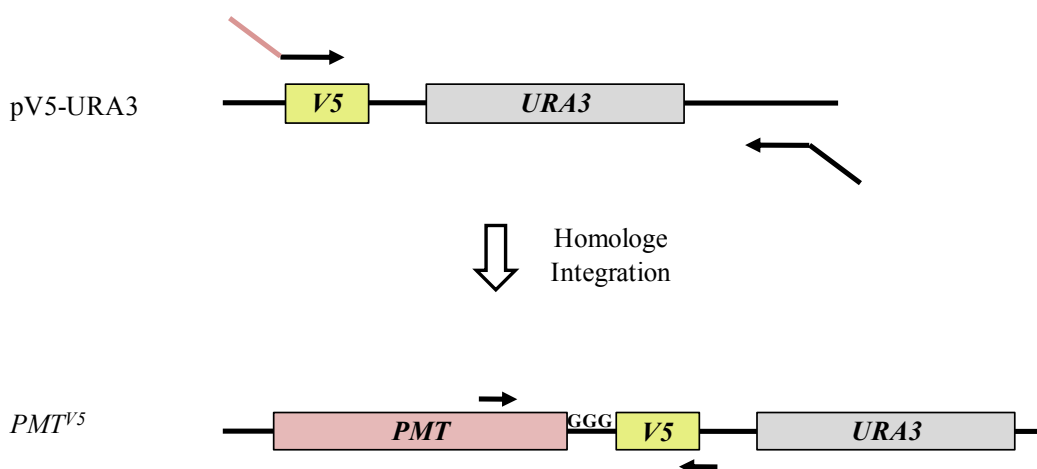


Abb. 3.21: Schema für die FLAG-Epitop-Markierung der PMT-Gene mit dem URA3-Selektionsmarker

Die großen Pfeile im oberen Bild stellen das Primerpaar für die Amplifikation des 3xHA-URA3-Fragmentes dar. Die kleinen Pfeile im unteren Bild geben die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR an.

Auch diese amplifizierten Fragmente enthielten flankierende homologe Bereiche der betreffenden *PMT*-Gene und wurden in den Stamm CAI4 transformiert. Nach Selektion auf SD-Medium wurden die Transformanten mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft, wobei für das *PMT1*^{V5}-Fragment ein PCR-Produkt von 729 bp erwartet wurde und für das *PMT2*^{V5}-Fragment ein PCR-Produkt von 883 bp (Abb. 3.22).

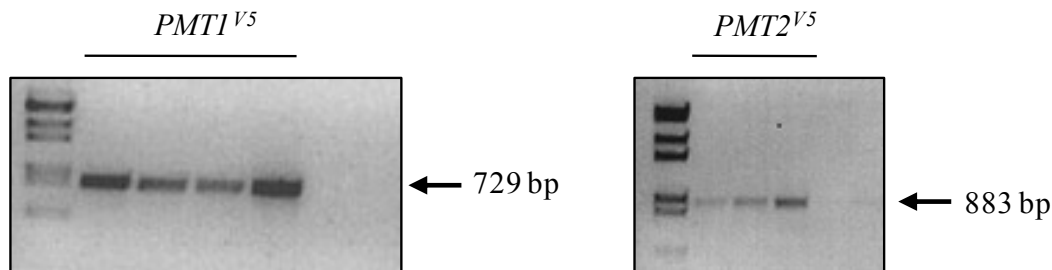


Abb. 3.22: Verifizierungs-PCR für das V5- Epitop

Gezeigt ist exemplarisch eine Kolonie-PCR für den Nachweis der Integration der V5-Fragmente. Dabei sind im rechten Bild die Fragmente von *PMT1*^{V5} zu sehen und im linken Bild von *PMT2*^{V5}. In der jeweils letzten Spur wurde als Negativkontrolle die PCR-Reaktion des Stammes SC5314 aufgetragen.

Die in der Verifizierungs-PCR positiv getesteten Stämme wurden mit Hilfe eines Immunoblots hinsichtlich der Expression von *PMT1*^{V5} und *PMT2*^{V5} überprüft (Abb. 3.23).

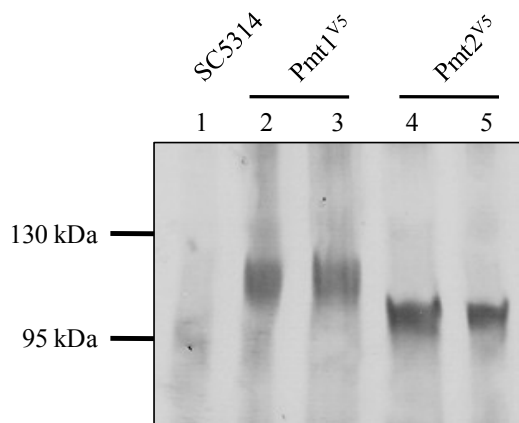


Abb. 3.23: Immunoblot-Analyse der V5-Epitop-Markierung von Pmt1p und Pmt2p

SC5314 ist der unmarkierte Stamm als Negativkontrolle (Spur 1). *Pmt1*^{V5} wurde in den Stämmen CIS27 (Spur 2) und CIS28 (Spur 3) nachgewiesen und *Pmt2*^{V5} in den Stämmen CIS29 (Spur 4) und CIS30 (Spur 5). Es wurden jeweils 40 µg der ganzen Rohextrakte auf einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:1000 verdünnten Anti-V5 Antikörpern aus der Maus und dem sekundären Anti-Maus Antikörper, der an die Peroxidase gekoppelt war (Kapitel 2.6.7).

Anhand von Abb. 3.23 lässt sich erkennen, dass sowohl *Pmt1p* als auch *Pmt2p* erfolgreich mit dem V5-Epitop markiert worden waren. Interessanterweise waren die Banden hier nicht so klar abgegrenzt, wie bei der HA-Markierung (Abb. 3.17). Auch lief *Pmt1*^{V5} mit ca. 110 kDa etwas höher als *Pmt2*^{V5}.

Da mit V5 ein weiteres funktionierendes Epitop für die Markierung der *Pmts* gefunden worden war, wurde anschließend versucht auch *Pmt4p*, *Pmt5p* und *Pmt6p* zu markieren. Es konnten Transformanten etabliert werden, die auf SD-Medium wuchsen. Auch bei der Kolonie-PCR zeigten einige dieser Stämme die erwarteten Fragmente von 941 bp (*PMT4*^{V5}), 915 bp (*PMT5*^{V5})

und 881 bp ($PMT6^{V5}$). Im Immunoblot ließen sich die mit V5-fusionierten Pmt4p, Pmt5p und Pmt6p aber nicht detektieren (Daten nicht gezeigt).

Es wurden daher zwei Vektoren konstruiert, die mit Hilfe des *MET3*-Promotors eine leichte Überexpression von Pmt4^{V5} bzw. von Pmt6^{V5} ermöglichen sollten (Care *et al.*, 1999). Die Expressions-Vektoren pPMT4-V5-URA und pPMT6-V5-URA wurden in den *RPS10*-Locus im Genom von *C. albicans* integriert. Dieser Gen-Locus kodiert für ein potentielles ribosomales Protein und wird häufig für die ektopische Integration von Plasmiden verwendet (Brand *et al.*, 2004). Die korrekte Integration in den *RPS10*-Locus im Genom (Abb. 3.24) wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft. Aber auch hier war der Immunoblot erfolglos (Daten nicht gezeigt).

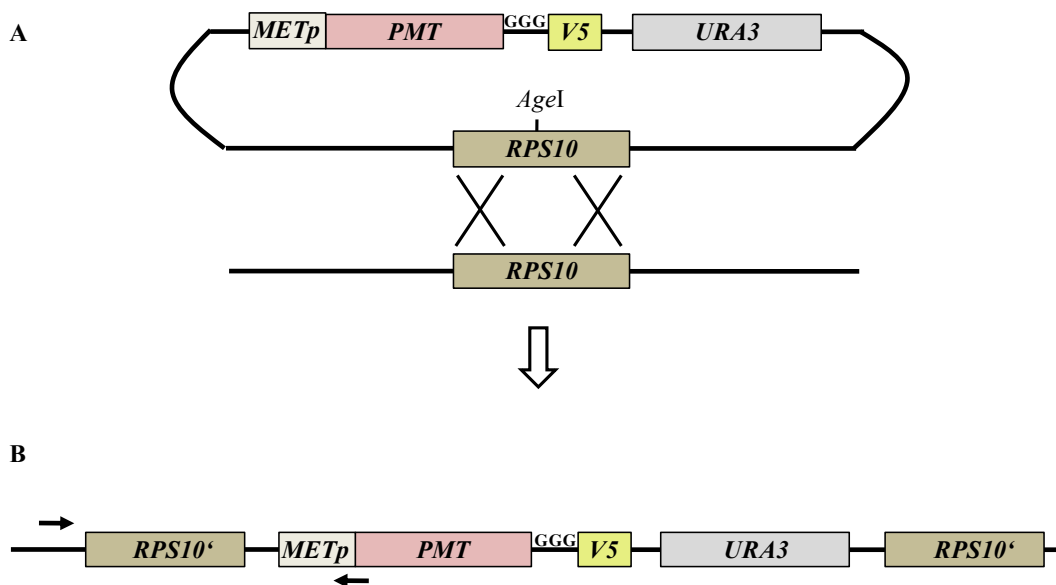


Abb. 3.24: Schema für die ektopische Integration von Epitop- markierten *PMT*-Genen

(A) Das Plasmid pPMT4-V5-URA bzw. pPMT6-V5-URA wurde im *RPS10*- Locus mit dem Restriktionsenzym *AgeI* linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde in den *C. albicans*-Stamm CAI4 transformiert. (B) Nach homologer Rekombination befinden sich im Genom zwei Kopien von *RPS10*, die das integrierte Plasmid flankieren. Die kleinen Pfeile stellen die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR dar.

Da im Split-Ubiquitin System das jeweils verkürzte Pmt4p bzw. Pmt6p Homodimere bildeten (Kapitel 3.1.1.2), wurde versucht, diese verkürzten *PMT*-Formen am C-terminalen Ende mit V5 zu markieren. Auch diese Versionen sollte mit Hilfe des *MET3*-Promotors überexprimiert werden. Aufgrund dessen wurden die Plasmide pPMT4kurz-V5-URA bzw. pPMT6kurz-V5-URA ebenfalls wie in Abb. 3.24 gezeigt in den *RPS10*-Locus integriert. Die erhaltenen Stämme wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden Membranen isoliert und Membranproteine solubilisiert (Kapitel 2.6.3). Diese solubilisierten

Membranproteine wurden mit einer Immunoblot-Analyse auf V5-markierte Pmt-Proteine hin untersucht (Abb. 3.25).

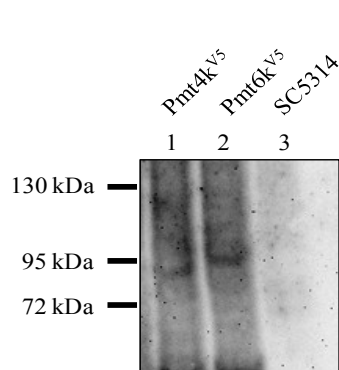


Abb. 3.25: Immunoblot-Analyse von Pmt4k^{V5} und Pmt6k^{V5}

Alle Stämme wurden in SD-Medium angezogen, um den *MET*-Promotor zu aktivieren. SC5314 ist der unmarkierte Stamm als Negativkontrolle (Spur 3). Pmt4k^{V5} wurde in dem Stamm CIS39 (Spur 1) nachgewiesen und Pmt6k^{V5} in dem Stamm CIS40 (Spur 2). Es wurden jeweils 40 µg der der solubilisierten Membranproteine auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:1000 verdünnten Anti-V5 Antikörpern aus der Maus und dem sekundären Anti-Maus Antikörper, der an die Peroxidase gekoppelt war (Kapitel 2.6.7).

Die Markierung der verkürzten, überexprimierten Pmts war erfolgreich. Erwartet waren Proteine der molekularen Größen von 80 kDa (Pmt4k^{V5}), bzw. von 90 kDa (Pmt6k^{V5}), die etwa gegeben waren.

Nach dieser erfolgreichen Markierung des verkürzten Pmt4p und des verkürzten Pmt6p sollte auch die HA-Markierung auf diese Weise erfolgen. Nach Transformation von pPMT4kurz-HA-SAT1 bzw. pPMT6kurz-HA-SAT1 in die Stämme CIS39 bzw. CIS40 konnten aber keine mit HA markierten Proteine nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.1.2.5 Funktionalität des Epitop-markierten Pmt1p bzw. Pmt2p

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass *PMT2* ein essentielles Gen ist (Prill *et al.*, 2005). Demnach wäre es nicht möglich gewesen, die beiden Stämme CIS5 und CIS6 zu konstruieren, wenn Pmt2^{HA} nicht funktionell ist, da diese nur ein *PMT2*-Allel besitzen und das ist mit dem HA-Epitop markiert.

Die Funktionalität von Pmt2^{V5} wurde aufgrund der bekannten Sensitivität der Halbdysruptanten gegenüber Hygromycin und Wärme getestet (Abb. 3.26).

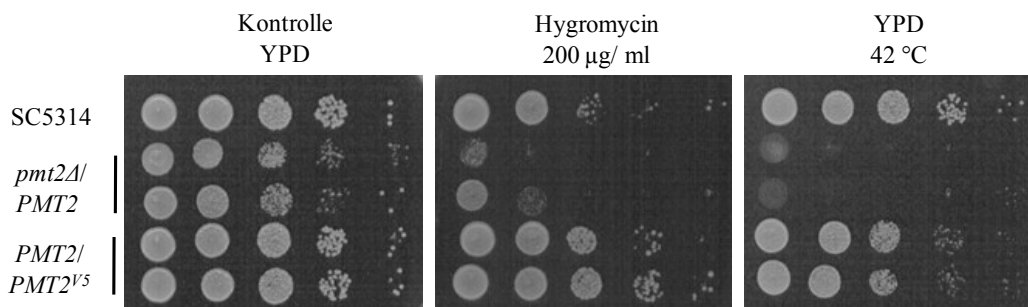


Abb. 3.26: Test auf Funktionalität von Pmt2^{V5}

Übernachtskulturen der Stämme SC5314 (Kontrolle), SPCa4 und SPCa5 (beide *pmt2Δ/ PMT2*, mit *URA3* rekonstituiert), sowie CIS29 und CIS30 (*PMT2/ PMT2^{V5}::URA3*) wurden von 10⁵ bis 10¹ Zellen verdünnt und jeweils 5 µl auf die YPD-Platten getropft. Die Platten wurden zwei bis drei Tage inkubiert.

Auch das mit V5 markierte Pmt2p schien seine Funktion noch zu erfüllen. Wäre es nicht funktionell gewesen, hätten die Stämme CIS29 und CIS30 sensitiv auf Hygromycin und die 42 °C reagiert, wie es die in Bezug auf *PMT2* heterozygoten Stämme auch zeigten. Aber CIS29 und CIS30 wuchsen genauso gut wie der Wildtyp SC5314 und demnach schien die V5-Markierung die Funktion von Pmt2p in keiner Weise zu beeinträchtigen.

Ein anderes Ergebnis wurde zur Funktion von Pmt1^{HA} erhalten. Für den *pmt1*-Disruptionsstamm war eine starke Sensitivität gegenüber Hygromycin und hoher Temperatur bekannt (Prill *et al.*, 2005). Die Stämme CIS1 und CIS2 wurden getestet, die jeweils ein disruptiertes *pmt1*-Allel trugen, während das andere *PMT1*-Allel mit dem HA-Epitop markiert war. Als Positivkontrolle diente die Halbdisruptante von *PMT1* (CAP1-3) und als Negativkontrolle der Stamm SPCa2, der beide *pmt1*-Allele disruptiert hatte, aber mit *URA3* rekonstituiert war (Abb. 3.27).

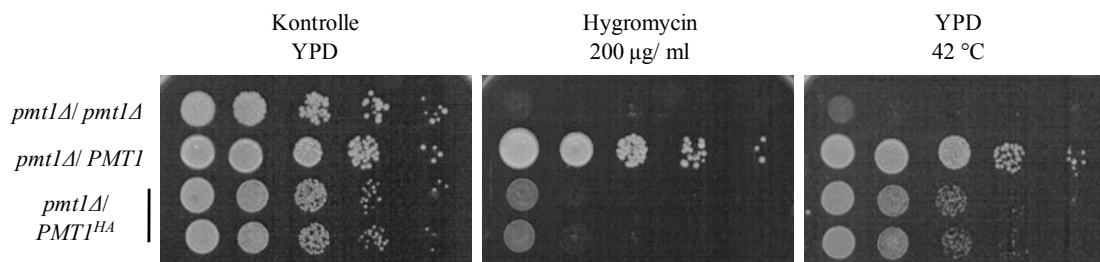


Abb. 3.27: Test auf Funktionalität von Pmt1^{HA}

Übernachtskulturen der Stämme SPCa2 (*pmt1Δ/ pmt1Δ*, mit *URA3* rekonstituiert), CAP1-3 (*pmt1Δ/ PMT1*, mit *URA3*), sowie CIS1 und CIS2 (beide *pmt1Δ/ PMT1^{HA}::URA3*) wurden von 10⁵ bis 10¹ Zellen verdünnt und jeweils 5 µl auf die YPD-Platten getropft. Die Platten wurden zwei bis drei Tage inkubiert.

Anhand von Abb. 3.27 lässt sich erkennen, dass das mit dem HA-Epitop markierte Pmt1p nicht seine volle Funktion erfüllt. Zwar wuchsen die Stämme CIS1 und CIS2 bei 42 °C immerhin noch bis zur vorletzten Verdünnung, aber die Halbdisruptante (CAP1-3) wuchs in allen Verdünnungen. Weit weniger gut konnte Pmt1^{HA} die Aufgaben von dem unmarkierten Pmt1p auf Hygromycin übernehmen. Diesen Beobachtungen zufolge schien Pmt1^{HA} die Funktionen des unmarkierten Pmt1p bei 42 °C besser zu übernehmen als bei Wachstum auf Hygromycin.

Von dem homozygoten *pmt1*-Disruptionsstamm war bekannt, dass er große Zellaggregate bildet und demnach eine starke Flokkulation aufweist (Timpel *et al.*, 1998). Schon beim Verdünnen dieser Kultur ließ sich diese Eigenschaft beobachten, während die Stämme CIS1 und CIS2 keine sichtbaren Aggregate aufwiesen. Um diese Beobachtung zu verifizieren wurde ein Flokkulationstest durchgeführt (Abb. 3.28).

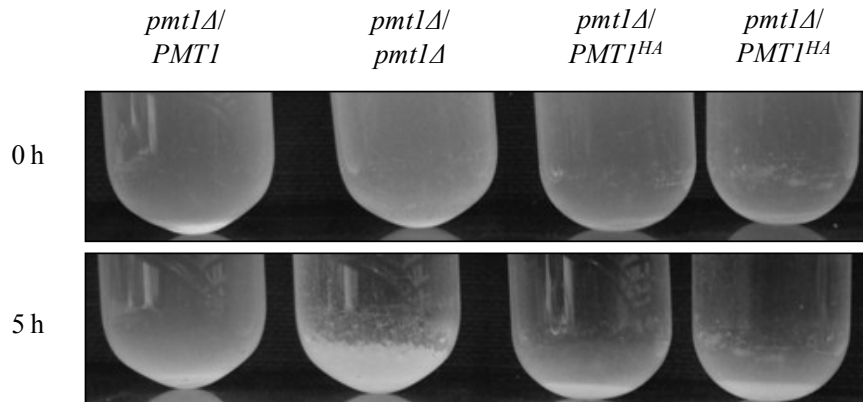


Abb. 3.28: Flokkulations-Versuch

Übernachtskulturen der Stämme SPCa2 (*pmt1Δ/pmt1Δ*, mit *URA3* rekonstituiert), CAP1-3 (*pmt1Δ/PMT1*, mit *URA3*), sowie CIS1 und CIS2 (beide *pmt1Δ/PMT1^{HA}::URA3*) wurden auf eine OD_{600} von 1 verdünnt, gemischt und 5 h bei RT stehen gelassen.

In Abb. 3.28 kann beobachtet werden, dass der Stamm SPCa2 (*pmt1Δ/pmt1Δ*) nach 5 h eine starke Aggregatbildung aufwies, während die Zellen des heterozygoten Stammes CAP1-3 sich nur leicht unten abgesetzt hatten. Im Vergleich zu den beiden Kontrollstämmen wiesen die *PMT1^{HA}*-Stämme (CIS1 und CIS2) zwar eine Flokkulation auf, diese war aber bei weitem nicht so stark, wie bei CAP1-3.

Um zu testen, ob Pmt1 funktionell war, nachdem es mit dem V5-Epitop markiert worden war, wurde der Stamm CIS27 (*PMT1/PMT1^{V5}*) auf seine Eigenschaft Hyphen ausbilden zu können, überprüft (Abb. 3.29).

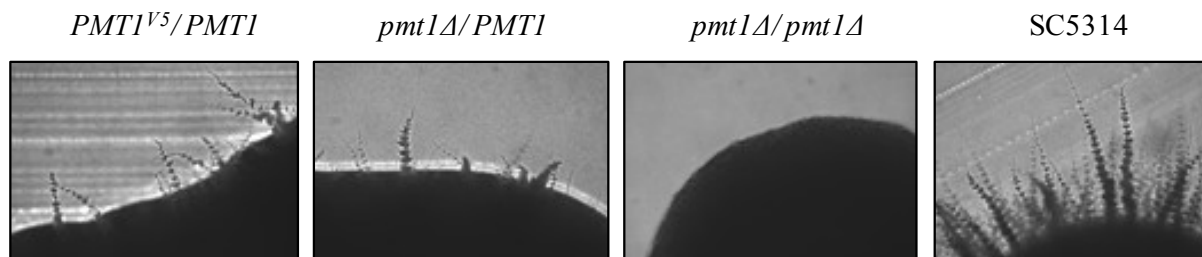


Abb. 3.29 : Hyphenbildung auf Spider-Medium

Gezeigt sind Kolonieränder in 100facher Vergrößerung. Die Stämme CIS27 (*PMT1^{V5}/PMT1*), CAP1-3 (*pmt1Δ/PMT1*), SPCa2 (*pmt1Δ/pmt1Δ*) sowie der Wildtyp SC5314 wurden drei Tage auf Spider-Medium bei 37 °C inkubiert.

Von dem heterozygoten *pmt1*-Deletionsstamm (CAP1-3) war bekannt, dass er auf Hyphen-induzierendem Medium, wie z. B. Spider-Medium, schlechter in der Lage ist, Filamente auszubilden (Timpel *et al.*, 1998). Im Vergleich mit dem Wildtyp (SC5314) produzierte er dementsprechend weniger Hyphen (Abb. 3.29). Demgegenüber war der *pmt1*-Deletionsstamm (SPCa2) nicht mehr in der Lage, Filamente zu bilden. Stamm IS27 (*PMT1/PMT1^{V5}*) zeigte eine Hyphenproduktion, die in ihrer Stärke der des heterozygoten Stammes (CAP1-3) ähnelte. Demnach war das mit V5 markierte Pmt1-Protein nicht voll funktionstüchtig.

3.1.2.6 Lokalisation von Pmt1^{HA} und Pmt2^{HA}

Das Epitop-markierte Pmt1p konnte die Funktion eines unmarkierten Pmt1 -Proteins nur begrenzt ausfüllen (Kapitel 3.1.2.5). Hier sollte untersucht werden, ob die beiden markierten Pmt -Proteine wie erwartet in der ER-Membran lokalisiert waren. Dafür wurde eine Immunfluoreszenz mit den Stämmen CIS23 ($\text{PMT1}/\text{PMT1}^{\text{HA}}$) und CIS25 ($\text{PMT2}/\text{PMT2}^{\text{HA}}$) durchgeführt (Abb. 3.30).

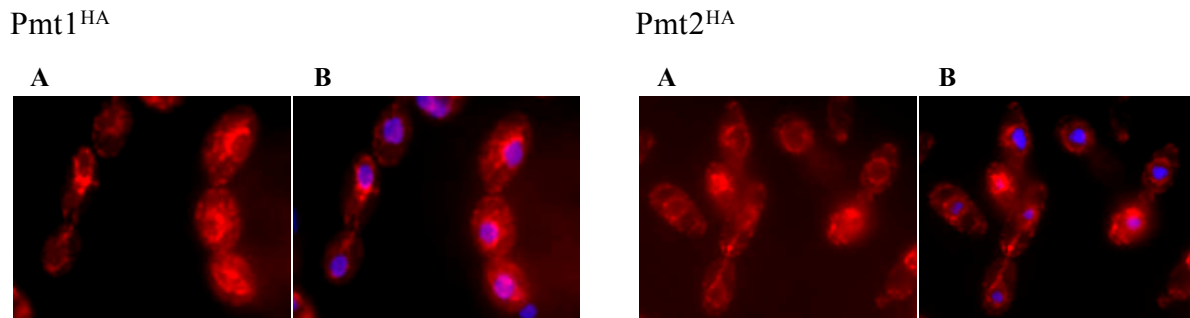


Abb. 3.30: Immunfluoreszenz von Pmt1^{HA} und Pmt2^{HA}

Die Stämme CIS23 ($\text{PMT1}/\text{PMT1}^{\text{HA}}$) und CIS25 ($\text{PMT2}/\text{PMT2}^{\text{HA}}$) wurden auf eine OD_{600} von 0,8 angezogen und fixiert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben behandelt, das HA-Epitop mit 1:25 verdünnten Anti-HA Antikörpern aus der Ratte dekoriert und mit 1:100 verdünnten Anti-Ratte Antikörpern detektiert, die mit FITC konjugiert waren. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt. Dabei ist jeweils in (A) die Fluoreszenz von FITC zu sehen und in (B) die Überlagerung mit DAPI. Die Fluoreszenz von FITC und DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 480 nm bzw. 365 nm angeregt und mit einem Axioscop von Zeiss beobachtet und fotografiert. Die Einfärbung und Überlagerung der einzelnen Bilder erfolgte in AdobePhotoshop®. Dabei wurde DAPI blau und FITC rot eingefärbt.

Anhand von Abb. 3.30 lässt sich beobachten, dass die Lokalisation von Pmt1^{HA} und Pmt2^{HA} ähnlich war. Eine Immunfluoreszenz mit Anti-ScSec61 Antikörpern schlug fehl. Sec61 gilt als Marker-Protein für die ER-Membran und wäre für eine Ko-Lokalisation geeignet gewesen (Deshaies *et al.*, 1991). Die fluoreszierenden Bereiche in Abb. 3.30 deuteten aber auch ohne das Marker-Protein darauf hin, dass es sich um eine Lokalisierung in der ER-Membran handelte, da jeweils ein fluoreszierender Ring um die durch DAPI-Färbung blau leuchtenden Kerne zu sehen war. Zusätzlich gab es eine Art Netzstruktur um diesen leuchtenden Ring und oft in der ganzen Zelle verteilt. Demgegenüber ließen Zellen des unmarkierten Stammes SC5314 sich nur mit DAPI färben und zeigten bei einer Anregung von 480 nm nur einen leichten Hintergrundleuchten (nicht gezeigt).

3.1.2.7 Doppelt markierte Stämme

Für eine Koimmunopräzipitation müssen zwei Proteine in einem Stamm mit zwei unterschiedlichen Epitopen markiert werden. Daher wurden weitere Stämme konstruiert (Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3). In den Pmt1^{V5} -produzierenden Stämmen (CIS27 und CIS28) wurde Pmt2p mit HA markiert (CIS31 und CIS32) und in den Pmt2^{V5} -produzierenden Stämmen (CIS29 und CIS30) wurde das zweite PMT2 -Allel mit HA markiert (CIS33 und CIS34). Dabei ging bei etwa

50 % aller Transformanten das mit *V5* markierte *PMT2*-Allel wieder verloren durch Rekombination (Abb. 3.31).

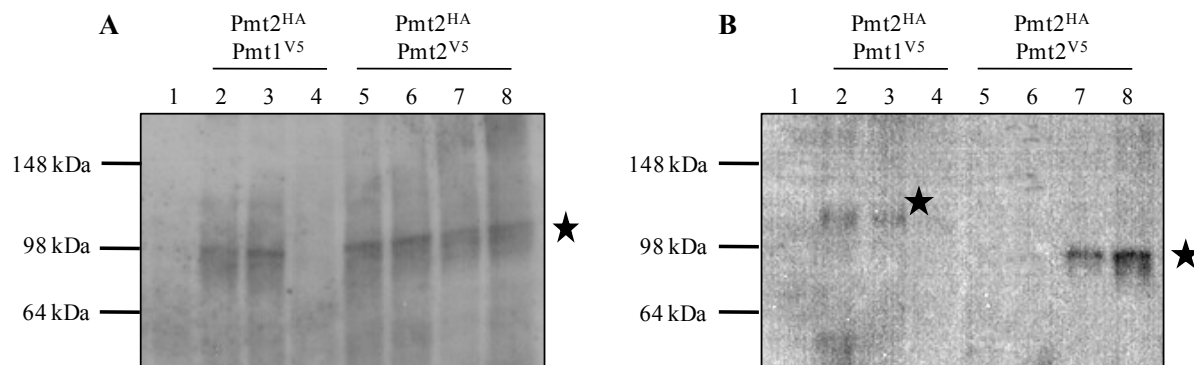
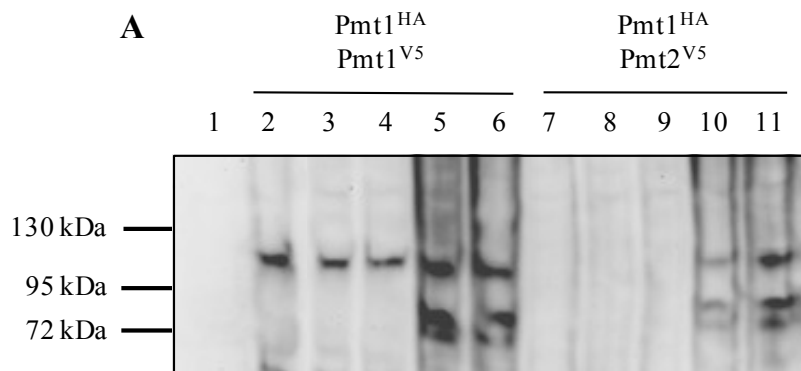


Abb. 3.31: Immunoblot-Analyse der doppelt Pmt-markierten Stämme

Gezeigt ist die Immunoblot-Analyse von drei *Pmt1^{V5}*-Stämmen, die mit dem *PMT2^{HA}*-Fragment transformiert worden waren (Spur 2-4) und von vier *Pmt2^{V5}*-Stämmen die ebenfalls mit dem *PMT2^{HA}*-Fragment transformiert worden waren (Spur 5-8). In Spur 1 wurde als Negativkontrolle Rohextrakt des Stammes SC5314 aufgetragen. Es wurden jeweils 40 µg der ganzen Rohextrakte auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.6.6). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis in (A) mit 1:1000 Anti-HA Antikörpern, die direkt mit der Peroxidase gekoppelt waren (Kapitel 2.6.7). Die Membran aus (A) wurde gestrippt (Kapitel 2.6.8) und mit 1:1000 Anti-V5 Antikörpern aus der Maus und sekundären Anti-Maus-POD Antikörpern detektiert (B). Dabei wurde in den Stämmen CIS31 und CIS32 die Markierung von *Pmt2^{HA}* als auch von *Pmt1^{V5}* nachgewiesen (Spur 2 und 3). Gleichzeitig wurde in den Stämmen (CIS33 und CIS34) die Markierung beider *PMT2*-Allele mit *HA* bzw. *V5* gezeigt (Spur 7 und 8).

Ebenso sollten Stämme hergestellt werden, bei denen zusätzlich zum HA-markierten *Pmt1p* jeweils ein Allel von *PMT1* bzw. von *PMT2* mit *V5* markiert war. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die Stämme CIS27 und CIS28 (*PMT1^{V5}*) sowie die Stämme CIS29 und CIS30 (*PMT2^{V5}*) mit dem *PMT1^{HA}*-*SAT1*-Fragment transformiert (Kapitel 3.1.2.2). Die resultierenden Immunoblot-Analysen sind in Abb. 3.32 zu sehen.



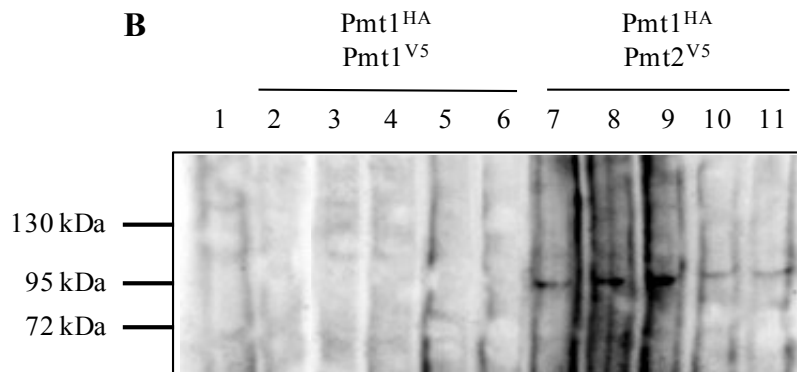


Abb. 3.32: Immunoblot-Analyse doppelt Pmt-markierter Stämme

Gezeigt ist die Immunoblot-Analyse von jeweils fünf Stämmen von Pmt1^{V5} (Spur 2-6) und von vier Pmt2^{V5} Stämmen (Spur 7-11), die mit dem *PMT1^{HA}*-Fragment transformiert worden waren. In Spur 1 wurde als Negativkontrolle Rohextrakt des Stammes SC5314 aufgetragen. Es wurden jeweils 40 µg der ganzen Rohextrakte auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis in (A) mit 1:1000 Anti-HA Antikörpern aus der Ratte und sekundären Anti-Ratte-POD Antikörpern. Die Membran aus (A) wurde gestrippt (Kapitel 2.6.8) und mit 1:1000 Anti-V5 Antikörpern aus der Maus und sekundären Anti-Maus-POD Antikörpern detektiert (B). Dabei wurde in den Stämmen CIS35 und CIS36 die Markierung von Pmt2^{HA} als auch von Pmt1^{V5} nachgewiesen (Spur 10 und 11).

In Abb. 3.32 lässt sich erkennen, dass die Stämme CIS35 und CIS36 erfolgreich konstruiert worden waren, da deren Rohextrakte jeweils in Spur 10 und 11 sowohl das Signal von Pmt1^{HA} (A) als auch für Pmt2^{V5} (B) zeigten. Die restlichen drei Pmt2^{V5} Stämme in den Spuren 7-9 hatten das *PMT1^{HA}*-Fragment nicht integriert (Abb. 3.32 A). Die fünf hier in Spur 2-6 gezeigten Pmt1^{V5}-Stämme, die mit dem *PMT1^{HA}*-Fragment transformiert worden waren, zeigten kein Signal für Pmt1^{V5} (Abb. 3.32 B). Auch bei weiteren 15 Transformanten, war es nicht möglich gewesen, beide *PMT1*-Allele zu markieren (Daten nicht gezeigt). Die Epitop-markierten Versionen von Pmt1 waren in ihrer Funktion sehr stark eingeschränkt (Kapitel 3.1.2.5). Demnach war es wahrscheinlicher, dass die Transformante das mit V5 markierte Allel verlor, als das zweite Allel mit HA zu markieren, da *C. albicans* ohne ein funktionierendes Pmt1 einige Wachstumsdefekte aufweist (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005).

3.1.2.8 Koimmunopräzipitationen von Pmt1p und Pmt2p

Mit den doppelt Pmt-markierten Stämmen CIS31-36 (Abb. 3.31 und Abb. 3.32) wurden Koimmunopräzipitationen durchgeführt. Zum einen sollte das Ergebnis aus dem Split-Ubiquitin System (Kapitel 3.1.1.2) bestätigt werden, dass Pmt2p aus *C. albicans* Homodimere bildet, zum anderen sollte mit dieser Methode die Bildung von Pmt1/ Pmt2-Heterodimeren untersucht werden (Girrbach *et al.*, 2000; Girrbach und Strahl, 2003), die für *C. albicans* mit dem Split-Ubiquitin System nicht nachgewiesen werden konnte.

Um diese Koimmunopräzipitationen durchführen zu können wurden aus den verschiedenen *C. albicans*-Stämmen die Membran-Fraktionen isoliert, aus denen mit Detergenzien die Membranproteine solubilisiert wurden (Kapitel 2.6.3). Es wurden in der Koimmunopräzipitation sowohl von den doppelt Pmt-markierten Stämmen, als auch von den einfach markierten

Stämmen, sowie vom Wildtyp SC5314 solubilisierete Membranproteine eingesetzt (Abb. 3.33 und Kapitel 2.6.5).

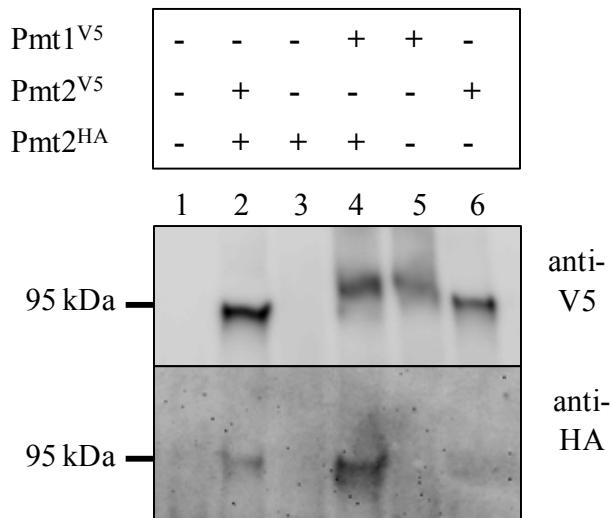


Abb. 3.33: Immunpräzipitationen von Pmt1^{V5} und Pmt2^{V5}

Solubilisierete Membranproteine der Stämme SC5314 (Spur 1), CIS33 (*PMT2^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur 2), CIS25 (*PMT2^{HA}/ PMT2*, Spur 3 und 7), CIS31 (*PMT1^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur 4), CIS27 (*PMT1^{V5}/ PMT2*, Spur 5) und CIS29 (*PMT2^{V5}/ PMT2*, Spur 6) wurden mit Anti-V5 Antikörpern immunpräzipitiert (Kapitel 2.6.5). Diese präzipitierten Proteine wurden 1:1 auf zwei 8%ige SDS-Gele verteilt und aufgetrennt. Nach dem Transfer auf je eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit Anti-V5 Antikörpern aus der Maus (V5), bzw. mit Anti-HA Antikörpern aus der Ratte (HA). Detektiert wurden diese mit Anti-Maus, bzw. Anti-Ratte Antikörpern, die jeweils mit der Peroxidase konjugiert waren.

In den Immunpräzipitationen von Pmt1^{V5} und Pmt2^{V5} ließ sich erkennen, dass Pmt2^{HA} in beiden Fällen mit präzipitiert wurde (Abb. 3.33, Spur 2 und 4). Als Kontrollen waren zum einen Membranproteine des Wildtyps (SC5314) präzipitiert worden, um sicher zu gehen, dass kein Protein an der Sepharose hängen geblieben war, das ein falsch-positives Signal geben könnte. Zum anderen wurden die Membranproteine der einfach mit V5 markierten *PMT1^{V5}* und *PMT2^{V5}* Stämme (CIS27, Spur 5 und CIS29, Spur 6) präzipitiert, um festzustellen, dass die mit Anti-V5 Antikörpern herausgezogenen Proteine kein falsch-positives Signal mit den Anti-HA Antikörpern gaben. Als letzte Kontrolle wurden auch die Membranproteine von Stamm CIS25 (*PMT2^{HA}*, Spur 2 und 7) in die Präzipitation eingesetzt. In diesem Fall sollte kontrolliert werden, dass Pmt2^{HA} nicht selbstständig an der Sepharose hängen blieb und dass die Präzipitate ordentlich gewaschen worden waren. Da alle Kontrollen negativ blieben, kann als Ergebnis festgehalten werden, dass Pmt2^{HA} stark an Pmt1^{V5} und etwas schwächer an Pmt2^{V5} bindet.

Demnach ließ sich die über das Split-Ubiquitin System ermittelte Homodimer-Bildung von Pmt2p (Kapitel 3.1.1.2) hier biochemisch bestätigen. Das Heterodimer aus Pmt1p und Pmt2p war für *S. cerevisiae* beschrieben worden (Girrbach und Strahl, 2003), ließ sich aber für *C. albicans* im Split-Ubiquitin System nicht nachweisen, während durch Koimmunopräzipitation hier ein deutlicher Komplex aus Pmt1^{V5} und Pmt2^{HA} gezeigt wurde. Die Komplexbildung sollte anschließend bestätigt werden, indem in den doppelt Pmt-markierten Stämmen Pmt1^{HA} bzw. Pmt2^{HA} mit Anti-HA Antikörpern präzipitiert wurden.

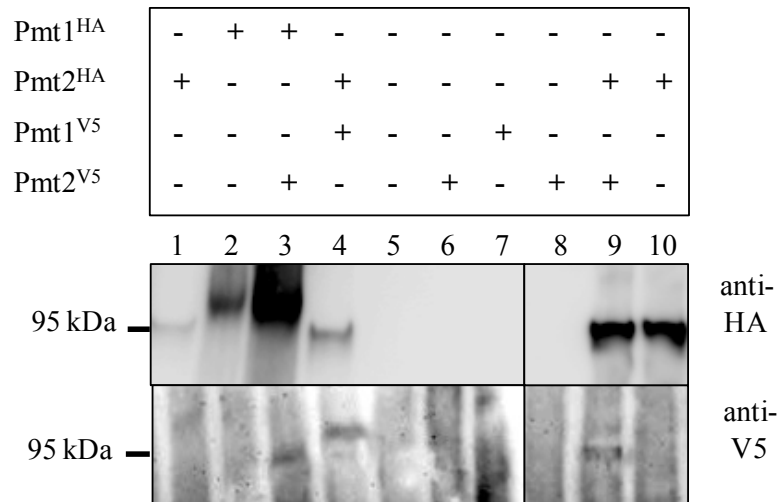


Abb. 3.34: Immunpräzipitationen von Pmt1^{HA} und Pmt2^{HA}

Solubilisierte Membranproteine der Stämme SC5314 (Spur 5), CIS25 (*PMT1/ PMT2^{HA}* bzw. *PMT2/ PMT2^{HA}*, Spur 1 und 10), CIS23 (*PMT1^{HA}/ PMT2*, Spur 2), CIS35 (*PMT1^{HA}/ PMT2^{V5}*, Spur 3), CIS31 (*PMT1^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur 4), CIS29 (*PMT1/ PMT2^{V5}* bzw. *PMT2^{HA}/ PMT2*, Spur 6 und 8), CIS27 (*PMT1^{V5}/ PMT2*, Spur 7) und CIS33 (*PMT2^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur 9) wurden mit polyklonalen Anti-HA Antikörpern aus dem Kaninchen immunpräzipitiert (Kapitel 2.6.5). Diese präzipitierten Proteine wurden 1:1 auf zwei 8 %ige SDS-Gele verteilt und aufgetrennt. Nach dem Transfer auf je eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit Anti-HA Antikörpern aus der Ratte (HA), bzw. mit Anti-V5 Antikörpern aus der Maus (V5). Detektiert wurden diese mit Anti-Ratte, bzw. Anti- Maus Antikörpern, die jeweils mit der Peroxidase konjugiert waren.

In Abb. 3.34 lässt sich erkennen, dass die Anreicherung von Pmt1p/ Pmt2p- bzw. von Pmt2p/ Pmt2p-Komplexen auch funktionierte, wenn mit Anti-HA Antikörpern präzipitiert wurde (Spur 3, 4 und 9), auch wenn die Banden, die in Abb. 3.34 (Anti-V5) detektiert werden konnten, nicht ganz so deutlich wie in Abb. 3.33 (Anti-HA) waren. Auch in diesem Versuch blieben alle Kontrollen negativ, so dass durch HA markiertes Pmt1p bzw. Pmt2p kein unbekanntes Protein angereichert wurde (Spur 1 und 2), und weder Pmt1^{V5} noch Pmt2^{V5} durch die Sepharose bzw. durch die HA-Antikörper präzipitiert wurden (Spur 6, 7 und 8).

3.2 Suche nach neuen Interaktionspartnern von Pmt6p von *C. albicans*

In *C. albicans* scheint Pmt6p eine besondere Rolle bei der Hyphenbildung zu spielen (1.5). Aber weder für *C. albicans* noch für *S. cerevisiae* waren bisher Zielproteine von Pmt6p bekannt. Daher war es von großem Interesse, eine Genbank-Suche nach Interaktionspartnern von Pmt6p zu starten, um dadurch Pmt6-Zielproteine zu identifizieren.

3.2.1 Vorversuche für die Pmt6p-Interaktionspartner-Suche mit dem klassischen Two-Hybrid System

Von Pmt1p aus *S. cerevisiae* war bekannt, dass es sich bei der fünften hydrophilen Domäne, die in das ER-Lumen ragt, um den katalytischen Teil des Proteins handelte (Girrbach *et al.*, 2000). Da fast alle bekannten Pmt-Proteine eine konservierte Struktur auswiesen, wie auch Pmt6p aus *C. albicans*, wurde angenommen, dass auch hier diese Domäne dem katalytischen Teil des

Proteins entspricht, an das ein potentielles Zielprotein bindet. Diese Überlegung war insofern wichtig, da im klassischen Two-Hybrid System keine Membran-gebundene Proteine eingesetzt werden können. Für das Köderplasmid wurde also diese Domäne (AS 354- 674) mit der Bindedomäne von Gal4 C-terminal im Vektor pGBD fusioniert.

In der Arbeitsgruppe (C. Timpel und Y. Weber, unveröffentlichte Daten) war eine *C. albicans* genomische DNA-Bank in drei verschiedenen Leserahmen im Vektor pGAD konstruiert worden (James *et al.*, 1996). Hierbei wurde die genomische DNA des Stammes SC5314 partiell mit den Restriktionsenzymen *AciI*, *MspI*, *HinPII*, *MaeII*, bzw. *TaqI* geschnitten und mit *Clal* in die Aktivierungsdomänen-Vektoren pGAD (C1- C3) kloniert.

Zur Überprüfung dieser Gen-Bank wurden sie in *E. coli* transformiert und aus einzelnen Transformanten Plasmide isoliert. Um zu überprüfen, ob die Vektoren tatsächlich unterschiedlich große Fragmente trugen, wurden diese mit *EcoRI* und *PstI* geschnitten. Erwartet wurden Fragmente von Größen zwischen 0,5 kb und 3 kb (James *et al.*, 1996), sowie das etwa 6,6 kb große Fragment des Vektors (Abb. 3.35).

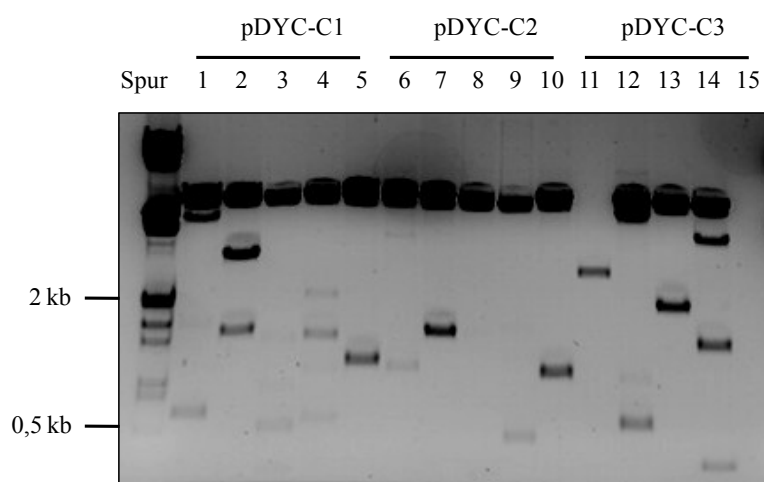


Abb. 3.35: Überprüfung der Plasmide einer genomischen *C. albicans*-Bank in einem klassischen Two-Hybrid System

Die Vektoren pDYC-C1 (Spur 1-5), pDYC-C2 (Spur 6-10) und pDYC-C3 (Spur 11-15) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* 1 h bei 37 °C inkubiert und auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

In Abb. 3.35 lässt sich erkennen, dass die Two-Hybrid Vektoren größtenteils ein Fragment trugen. Nur in Spur 8 handelte es sich um einen leeren Vektor, während in Spur 11 eine unerklärliche Bande auftauchte und in Spur 15 gar kein Plasmid isoliert werden konnte. Einige Insertionen waren größer und wiesen noch weitere Schnittstellen für *EcoRI* oder *PstI* auf (Spur 2 und 14). Insgesamt wurden jeweils 20 Isolate der einzelnen Bank-Plasmide pDYC-C1, -C2 und -C3 überprüft, wobei über 90 % ein Fragment aufweisen konnten.

Das Köderplasmid pGBD-Pmt6lum wurde zusammen mit dem Leervektor pGAD-C1 in den *S. cerevisiae* Stamm PJ69-4A transformiert, der die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* unter Kontrolle des *GAL4*-Promotors trägt. Die Transformanten wurden auf SD-Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan selektiert, da der pGAD-Vektor eine Leucin-Prototrophie vermittelt und pGBD den *TRP1*-Selektionsmarker trägt. Ebenso wurden zwei Kontrollplasmide (pSE1112 und pSE1111) mit einer ScSnf1-Gal4-Bindedomänen- bzw. ScSnf4-Gal4-Aktivierungsdomänen-

Fusion in PJ69-4A transformiert. Von ScSnf1 und ScSnf4 ist eine starke Interaktion bekannt, die schon häufig als Positivkontrolle im klassischen Two-Hybrid System verwendet wurde (Dureff *et al.*, 1993). Die beiden Leervektoren pGAD-C1 und pGBD wurden als Negativkontrolle in den gleichen Stamm transformiert. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass der Stamm PJ69-4A selber oder die Vektoren einen aktivierenden Einfluss auf die Reporter Gene haben könnten. Eine weitere Negativkontrolle stellte pSE1112 (ScSnf1 + Gal4-Bindedomäne) zusammen mit pGAD-C1 dar, mit der nachgewiesen werden sollte, dass die Aktivierung der Reporter Gene tatsächlich eine Interaktion von ScSnf1 und ScSnf4 erfordert. Ebenso sollte eine Selbstaktivierung von pGBD-Pmt6lum durch die gemeinsame Transformation dieses Vektors sowie des Leervektors pGAD-C1 ausgeschlossen werden.

Um die Reporter Gen-Aktivitäten dieser einzelnen Paarungen zu überprüfen wurden jeweils zwei Transformanten über Nacht in Flüssigmedium angezogen. Die Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und zum einen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin getropft, um die Aktivierung der Reporter Gene *HIS3* und *ADE2* zu überprüfen. Zum anderen wurden die Zellen auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan getropft, um die Anwesenheit der beiden Plasmide zu überprüfen und einen sogenannten X-Gal-Overlay- Test durchzuführen (Kapitel 2.6.9). Dieser diente als Nachweis auf die Expression des Reporter Gens *lacZ* (Abb. 3.36).

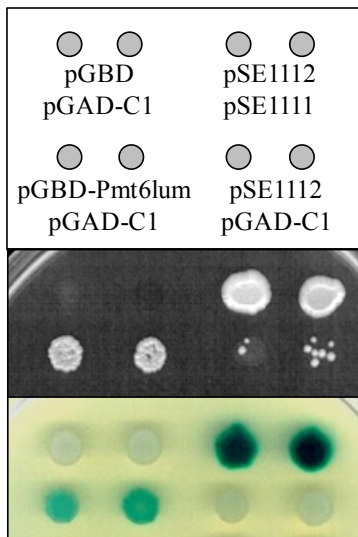


Abb. 3.36: Nachweis für die selbstaktivierende Eigenschaft von pGBD-Pmt6lum

Jeweils zwei Plasmide wurden zusammen in den *S. cerevisiae*-Stamm PJ69-4A transformiert: Die Leervektoren pGBD und pGAD-C1, die Kontrollvektoren pSE1112 und pSE1111, pSE1112 und pGAD-C1 sowie pGBD-Pmt6lum und pGAD-C1. Jeweils zwei dieser Transformanten wurden über Nacht angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt und jeweils 5 µl auf das jeweilige Nährmedium getropft. Im oberen Bild ist das Schema der Tropfen dargestellt. Im mittleren Bild ist das Wachstum bei Selektion auf die Reporter Gene *HIS3* und *ADE2* zu sehen (5 Tage, 30 °C). Unten ist zum einen das Wachstum auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan nach 2 Tagen bei 30 °C zu erkennen, d. h. Selektion auf die beiden Plasmide (pGBD und pGAD). Zum anderen wurde ein X-Gal-Overlay durchgeführt, um die Kolonien auf die Expression des dritten Reporters *lacZ* zu testen.

In Abb. 3.36 lässt sich erkennen, dass das Köderplasmid pPmt6lum eine selbstaktivierende Funktion hat. Die Reporter Gene des Stammes PJ69-4A wurden allein durch die Anwesenheit dieses Plasmids zusammen mit dem Leervektor pGAD-C1 aktiviert. Demgegenüber waren die Reporter Gene in den zwei Negativkontrollen so gut wie ausgeschaltet. Dieses Ergebnis zeigt, dass der ER-lumenale Bereich von Pmt6p transkriptionsaktivierende Eigenschaften hat. Aufgrund dessen konnte dieses Plasmid bzw. das klassische Two-Hybrid System nicht in der Suche nach interagierenden Proteinen verwendet werden.

3.2.2 Konstruktion einer genomischen Split-Ubiquitin Bank

Ein Vorteil bei der Verwendung des Split-Ubiquitin Systems ist, dass nicht nur ein kleiner Teil von Pmt6p für ein Köderplasmid verwendet werden kann, wie im klassischen Two-Hybrid System, sondern das Membranprotein Pmt6Cub dafür eingesetzt werden konnte (Kapitel 3.1.1). Für die Konstruktion einer genomischen Bank für das Split-Ubiquitin System wurde die schon vorhandene Two-Hybrid Bank verwendet (Kapitel 3.2.1). Die einzelnen genomischen Fragmente aus den Vektoren pDYC-C1, pDYC-C2 und pDYC-C3 sollten N- bzw. C-terminal mit *NUBG* fusioniert werden. Dafür wurden Primer konstruiert, die die flankierenden Regionen dieser Fragmente binden, sowie zusätzlich spezifische Linker-Sequenzen für die homologe Rekombination in pADH1p-NubGkanMX bzw. pADH1p-kanMX-NubG. Die Primer 5'pGAD+linker (C1- C3) erkennen jeweils einen Bereich in der *MCS* von den genannten Vektoren. 3'pGAD+linker bindet direkt stromabwärts der jeweiligen Fragmente in allen drei Vektoren, während die Bindestelle von 3'pGAD+linkerB weiter im Plasmid liegt und somit bei einer PCR-Reaktion die Stopcodons in allen drei Leserahmen mit amplifizieren kann (Abb. 3.37).

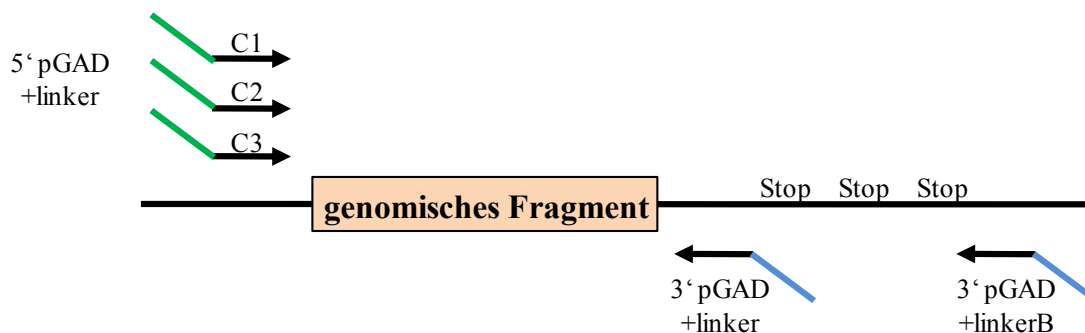


Abb. 3.37: Schematische Darstellung der Amplifikation von genomischen Fragmenten aus den Two-Hybrid Vektoren

Dargestellt ist ein schematischer Ausschnitt aus den Two-Hybrid Vektoren, die die genomische Bank von *C. albicans* tragen (pDYC; C1-C3). Die linken Pfeile stellen die 5'Primer dar, die vor dem unbekanntem Fragment binden. Jedes C steht für einen Leserahmen des Ausgangsplasmids. Die rechten Pfeile zeigen an, in welchen Regionen die beiden 3'Primer binden. Die grünen und blauen, nicht gebundenen Bereiche der Primer symbolisieren die fusionierten Linker-Sequenzen.

Mit Hilfe dieser Oligonukleotide wurden die unbekanntem Sequenzen aus den Bank-Vektoren amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden testweise auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3.38).

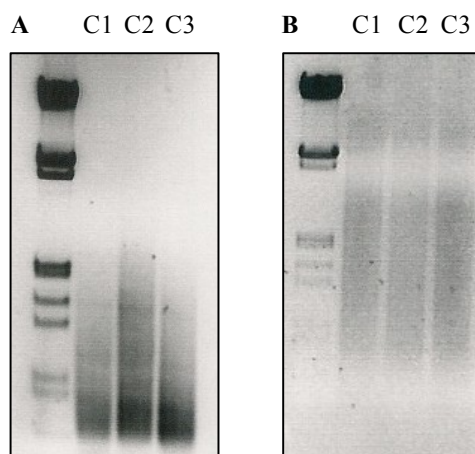


Abb. 3.38: Amplifizierte genomische Fragmente

(A) PCR für die C-terminale Fusion mit NubG

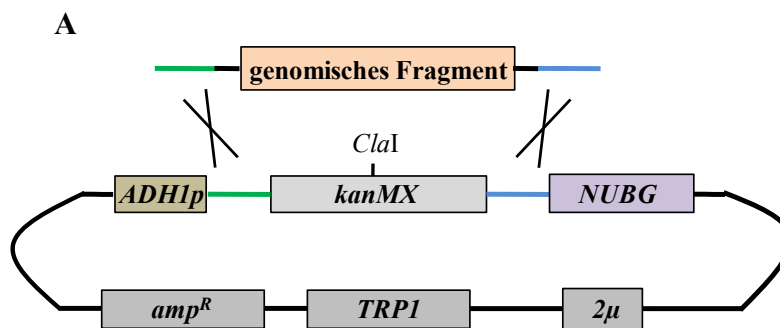
Die PCR-Produkte aus den Reaktionen mit den jeweiligen 5'Primern (5'pGAD+linker C1-C3) und dem 3'pGAD+linker auf den Bank- Vektoren (pDYC-C1, pDYC-C2 und pDYC-C3) wurden auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

(B) PCR für die N-terminale Fusion mit NubG

Die PCR-Produkte aus den Reaktionen mit den jeweiligen 5'Primern (5'pGAD+linker C1-C3) und dem 3'pGAD+linkerB auf den Bank-Vektoren (pDYC-C1, pDYC-C2 und pDYC-C3) wurden auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

In Abb. 3.38 lässt sich erkennen, dass die Amplifikation der unbekannt, unterschiedlich großen Fragmente aus den Two-Hybrid Vektoren gelang, da in allen sechs Spuren ein DNA-„Schmier“ zu sehen, der viele DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe repräsentierte. Interessanterweise schienen diese Fragmente in (A; C-terminale Fusion) etwas kleiner zu sein, als in (B; N-terminale Fusion). Erwartet wurden Fragment-Größen zwischen 0,5 kb und 3 kb, die in beiden Fällen auch ungefähr erhalten wurden.

Diese amplifizierten Fragmente wurden über die homologen Linker-Sequenzen in die beiden Split-Ubiquitin System Vektoren für die N-terminale bzw. die C-terminale Fusion mit NubG kloniert. Dafür wurden die Vektoren mit *ClaI* innerhalb der *kanMX*-Kassette linearisiert und zusammen mit den PCR-Produkten in *S. cerevisiae* transformiert. Die Transformanten wurden auf SD-Medium ohne Tryptophan auf die Anwesenheit der NubG-Vektoren selektiert. In der Zelle fand dann über homologe Rekombination der Austausch der *kanMX*-Kassette mit den genomischen Fragmenten statt (Abb. 3.39).



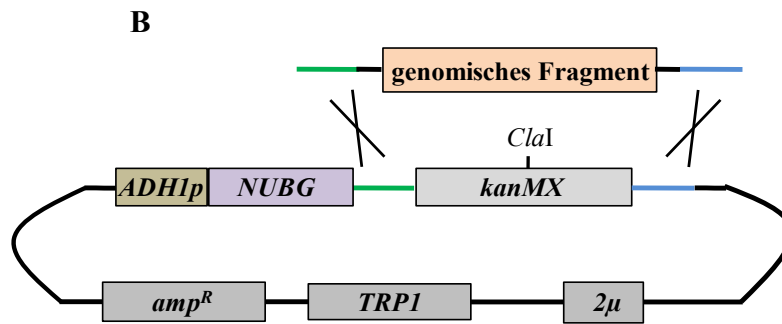


Abb. 3.39: Schema für die in vivo Klonierung der Genbank in die NubG-Vektoren

Die Vektoren pADH1p-kanMXNubG (A) und pADH1p-NubGkanMX (B) für die C-terminale (A) bzw. N-terminale (B) Fusion von NubG wurden mit *Cla*I linearisiert. Über die flankierenden Linkersequenzen (grün und blau) der PCR-Produkte wurde die Kanamycin-Kassette mit Genbank-Fragmenten ausgetauscht.

Anschließend wurde überprüft, ob die homologe Rekombination der unbekannt Fragmente in die Vektoren stattgefunden hatte. Dafür wurden die Plasmide aus den einzelnen Transformanten isoliert und zur Amplifikation in den *E. coli*-Stamm XL1-blue transformiert. Nachdem sie mit Hilfe der *E. coli*-Zellen vermehrt worden waren, konnten die Plasmide über einen Restriktionsansatz überprüft werden (Abb. 3.40).

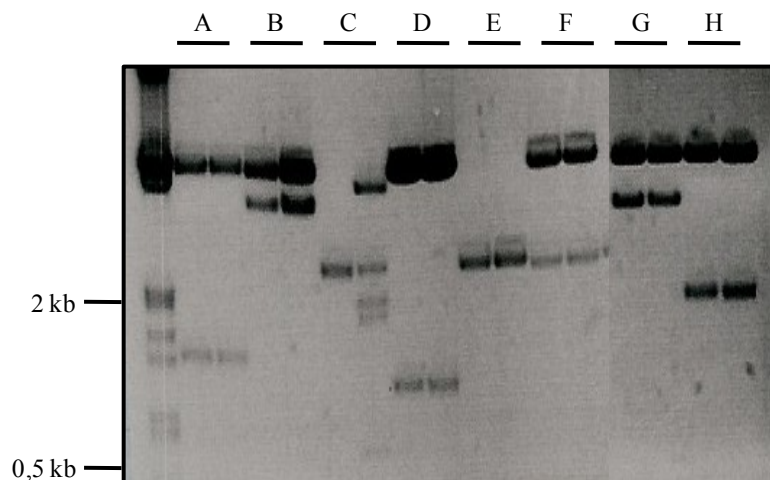


Abb. 3.40: Überprüfung der Bank-Plasmide für das Split-Ubiquitin Systems

Exemplarisch ist hier die Überprüfung der Plasmide mit Hilfe einer Restriktion durch *Pvu*II gezeigt. Zu sehen ist jeweils in einer Spur das isolierte Plasmid aus einer *E. coli*-Transformante. (A-H) Jeweils zwei *E. coli*-Transformanten repräsentieren das Isolat einer *S. cerevisiae*-Kolonie nach der Transformation mit dem amplifizierten Fragment aus den Two-Hybrid Vektoren, sowie den linearisierten NubG-Plasmiden.

In Abb. 3.40 lässt sich erkennen, dass die homologe Rekombination der unbekannt genomischen Fragmente aus den Two-Hybrid Vektoren in die NubG-Plasmide größtenteils erfolgreich war. Nur in den beiden C- und den E-Spuren wurden unerwartete Banden beobachtet. In allen anderen Spuren zeigten sich jeweils ein etwa 5,2 kb großes, sowie ein variables Fragment, in dem die unbekannte genomische Sequenz enthalten war. Letzteres beinhaltet aber auch noch 792 bp des Vektors, die bei der Berechnung der jeweiligen Fragment-Größen berücksichtigt werden mussten. Beispielhaft wurden in Abb. 3.40 die Plasmide untersucht, die nach der Amplifikation der Fragmenten aus pDYC-C1 mit Hilfe der Primer 5'pGAD+linker-C1 und 3'pGAD+linkerB und deren anschließender Transformation zusammen mit dem

linearisierten pADH1p-NubGkanMX durch homologe Rekombination entstanden waren. Aber auch die restlichen fünf Kombinationsmöglichkeiten waren erfolgreich (nicht gezeigt). Demnach konnten die genomischen DNA-Fragmente von *C. albicans* sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende mit *NUBG* fusioniert werden. Auch schien pro Hefe-Zellen immer nur ein Split-Ubiquitin Bank-Plasmid zu entstehen, da die beiden *E. coli*-Transformanten immer die gleichen Fragmente zeigten.

3.2.3 Suche nach Interaktionspartnern von Pmt6p mit Hilfe der Split-Ubiquitin Bank

Für die Suche mit der Split-Ubiquitin Bank musste beachtet werden, dass es sechs unterschiedliche Vektor-Primer Kombinationen gab. Für jeweils eine Kombination wurden 20 PCR-Reaktionen vereinigt und mit etwa 1 µg linearisierten Nub-Vektor in den *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP5 (*MATα*) co-transformiert. Dieser Ansatz wurde auf 20 SD-Platten ohne Tryptophan verteilt und ausplattiert. Dabei war von Vorteil, dass die Two-Hybrid Vektoren, die während der PCR als Matrize dienten, nur einen *LEU2*-Marker besaßen. Daher war es nicht nötig, die PCR-Produkte aufzureinigen.

Nach drei Tagen bei 30 °C konnte man zwischen 500 und 750 gut gewachsene Kolonien erkennen. Diese wurden mit dem *MATα*-Stamm THY.AP4, der das Plasmid pPMT6-Cub trug, gepaart. Dafür wurde letzterer über Nacht in einer Flüssigkultur angezogen und auf YPD-Platten ausplattiert und die Kolonien auf diese Replika-plattiert. Nach einem Tag bei 30 °C wurde auf SD-Platten ohne Leucin und ohne Tryptophan Replika-plattiert, um auf diploide Hefen zu selektieren, die beide Plasmide trugen. Nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurde weiter auf SD-Platten Replika-plattiert, denen außer Leucin und Tryptophan auch noch Histidin und Adenin fehlten. Auf diese Weise sollte auf die Aktivierung der Reporter-Gene selektiert werden.

Nach einigen Tagen bei 30 °C wuchsen einige Hefe-Kolonien. Dabei fiel auf, dass nach der N-terminalen Fusion mit NubG auf jeder Platte mehrere Kolonien wuchsen, während nach der C-terminalen Fusion mit NubG nur etwa eine Kolonie auf zehn Platten zu finden war. Ganz unerwartet war dieses Ergebnis nicht, da bei der N-terminalen Fusion das NubG auf jeden Fall exprimiert werden konnte, egal was für eine Sequenz fusioniert wurde. Demgegenüber konnte das NubG bei der C-terminalen Fusion nur exprimiert werden, wenn das unbekannte Fragment sowohl vollständig transkribiert und translatiert wurde, als auch im richtigen Leserahmen für die *NUBG*-Sequenz vorlag. Aus allen gewachsenen Hefen wurden die Plasmide isoliert, in *E. coli* (XL1-blue) amplifiziert, isoliert und mit *PvuII* geschnitten (Abb. 3.41).

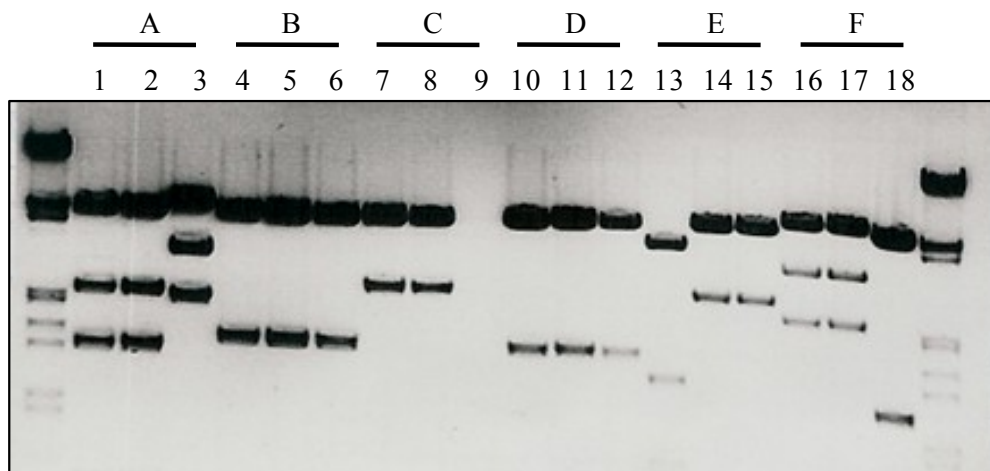


Abb. 3.41: Beispielhafte Überprüfung der isolierten Bank-Plasmide

Aus jeweils drei *E. coli*-Transformanten, die von einer positiven Hefe-Transformanten (A-F) abstammten, wurden die Plasmide isoliert. Diese Vektoren wurden mit *Pvu*II geschnitten und auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

Jede Hefezelle, die auf den vierfachen Selektionsplatten wachsen konnte, sollte theoretisch eines der Bank-Plasmide tragen, sowie auch pPMT6-Cub. Letzteres zeigte nach einer Restriktion mit *Pvu*II Banden der Längen 2,1 kb, 3,2 kb und 5,8 kb und konnte mit diesem Bandenmuster von den isolierten Bank-Plasmiden unterschieden werden. In den Spuren 3, 16 und 17 waren diese Fragmente auch zu erkennen (Abb. 3.41). Alle anderen isolierten Plasmide, außer in Spur 9 und 13, zeigten die Bandenmuster der Bank-Plasmide. Zum einen zeigten sie ein Fragment von 5,2 kb und zum anderen ein Fragment variabler Länge, von dem noch 792 bp abgezogen werden mussten, um auf die tatsächliche Länge des genomischen DNA-Stückes zu kommen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Abschätzung der genomischen DNA-Fragmente

Hefe-Kolonie	A	B	C	D	E	F
Fragmentlänge	2,8 kb	0,8 kb	1,5 kb	0,8 kb	1,5 kb	0,5 kb

Die Bank-Plasmide, die aus den gewachsenen Hefe-Kolonien stammten, wurden wiederum in den *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP5 transformiert. Diese Transformanten wurden zum einen mit dem THY.AP4-Stamm, der pPMT6-Cub enthielt, gepaart, zum anderen aber auch mit weiteren TYAP4-Stämmen, die die anderen Cub-Plasmide (Pmt1-5) trugen (Kapitel 3.1.1.). Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Bank-Plasmide tatsächlich für NubG-Fusionsproteine codierten, die spezifisch mit Pmt6Cub interagierten (Abb. 3.42).

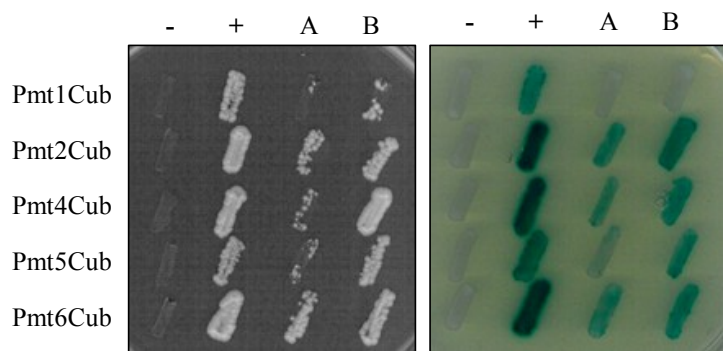


Abb. 3.42: Exemplarische Überprüfung zweier N-terminal fusionierter Bank-Plasmide

Jeder *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP4, der eines der fünf PmtCub-Plasmide trug, wurde mit einem der vier THY.AP5-Stämme gepaart, die eines der beiden Bank-Plasmide (A und B) trugen, bzw. pADH1p-NubGkanMX als Negativkontrolle (-) oder pNubWt als Positivkontrolle (+). Die Diploiden wurden auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan bzw. auf SD-Medium, in dem zusätzlich auch noch

Histidin und Adenin fehlten, ausgestrichen. Alle Stämme konnten auf der zweifachen Selektionsplatte wachsen und wurden mit einem X-Gal-Overlay überschichtet, um die Expression des Reporter-Gens *lacZ* zu testen.

In Abb. 3.42 lässt sich erkennen, dass die beiden hier getesteten Bank-Plasmide A und B eine deutliche Expression der Reportergene verursachten. Dies trat sowohl zusammen mit Pmt6Cub, als auch mit den anderen PmtCub-Fusionsproteinen auf, vielleicht etwas weniger deutlich mit Pmt1Cub. Diese Ergebnisse wurden mit allen 159 getesteten N-terminal fusionierten NubG-Bank-Plasmiden erhalten. Dieses Ergebnis erinnerte an die N-terminal fusionierten NubGPmt-Fusionsproteine, die auch mit allen PmtCub-Fusionsproteinen interagierten (Kapitel 3.1.1.3). Auf diese Weise ließ sich keine Aussage über die Funktion der unbekannt genomschen Sequenzen treffen.

Die Interaktionen der C-terminalen NubG-Fusionen waren spezifischer, wie auch schon die Interaktionen der PmtNubG-Proteine (Kapitel 3.1.1.2). Zwar ließen sich auch hier einige falsch-Positive beobachten, die mit allen PmtCub-Fusionen zu interagieren schienen und die meisten isolierten Plasmide zeigten gar keine Interaktion mehr, aber unter etwa 200.000 getesteten Kolonien zeigten immerhin einige eine Spezifität, und zwar die Plasmide mit den Nummern 18, 20, 23, 43 und 103 (Abb. 3.43).

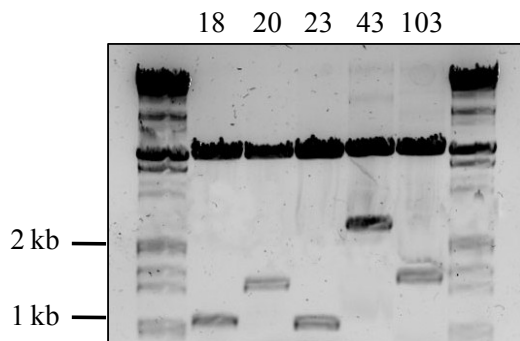
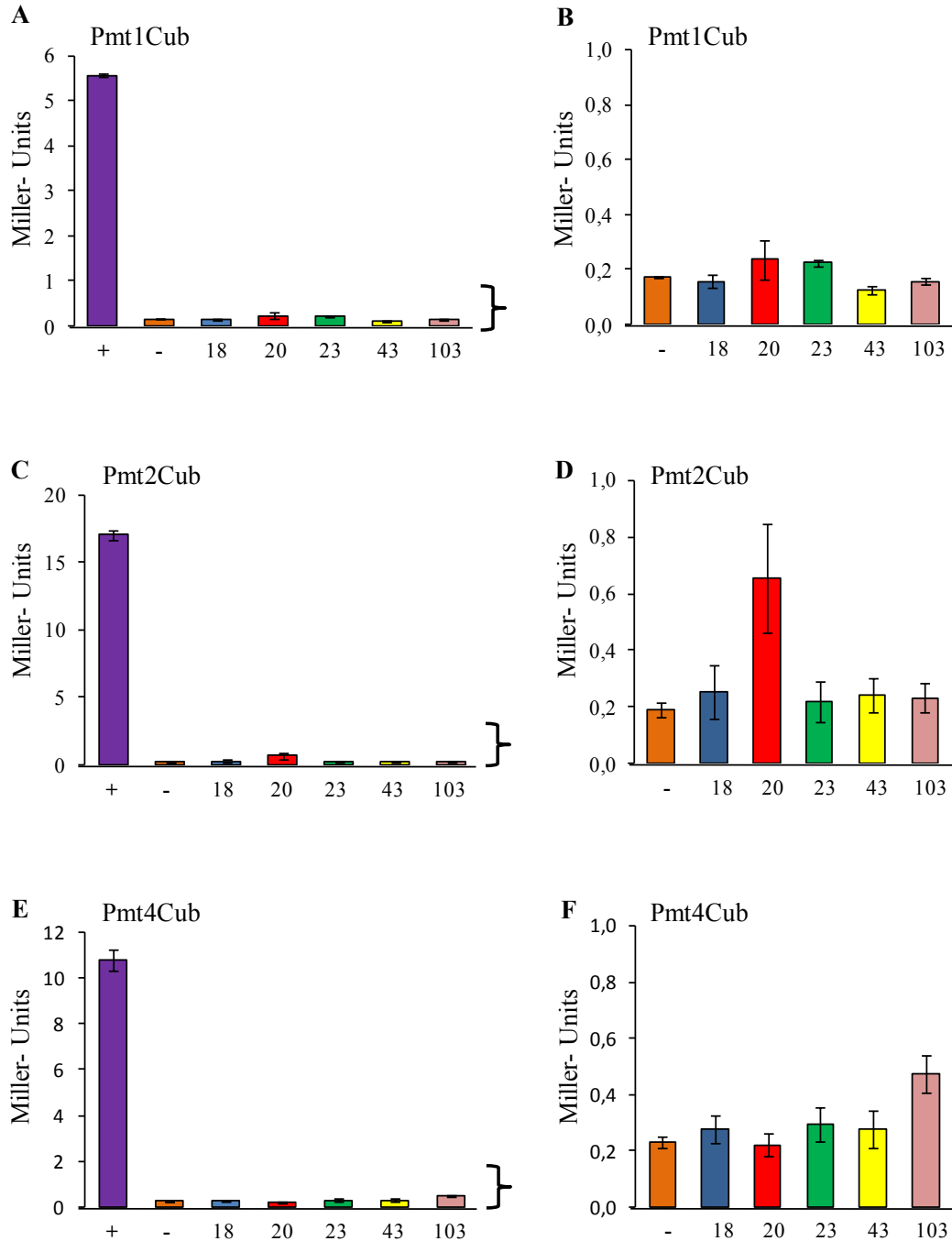


Abb. 3.43: Abschätzung der Fragment-Größen der isolierten, C-terminal fusionierten Bank-Plasmide

Die isolierten Bank-Plasmide wurden mit *PvuII* geschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Zahlen stehen dabei für die Nummern der einzelnen Vektoren.

Die Überprüfung der interessanten Bank-Plasmide durch Restriktion mit *PvuII* zeigte, dass Nummer 18 und 23 jeweils ein sehr kurzes Fragment beinhalteten (Abb. 3.43). Dieses konnte nur einige Nukleotide lang sein, da nach einer Restriktion mit *PvuII* noch 792 bp von dem erhaltenen Fragment abgezogen werden mussten, um zur eigentlichen Fragment-Länge zu kommen. Aber

gerade die Produkte dieser beiden Bank-Plasmide zeigten eine spezifische Interaktion mit Pmt6Cub. Auch Nr. 43 interagierte mit Pmt6Cub, während die Nr. 20 eine Interaktion mit Pmt2Cub zeigte und Nr. 103 eine leichte Interaktion mit Pmt4Cub (Abb. 3.44).



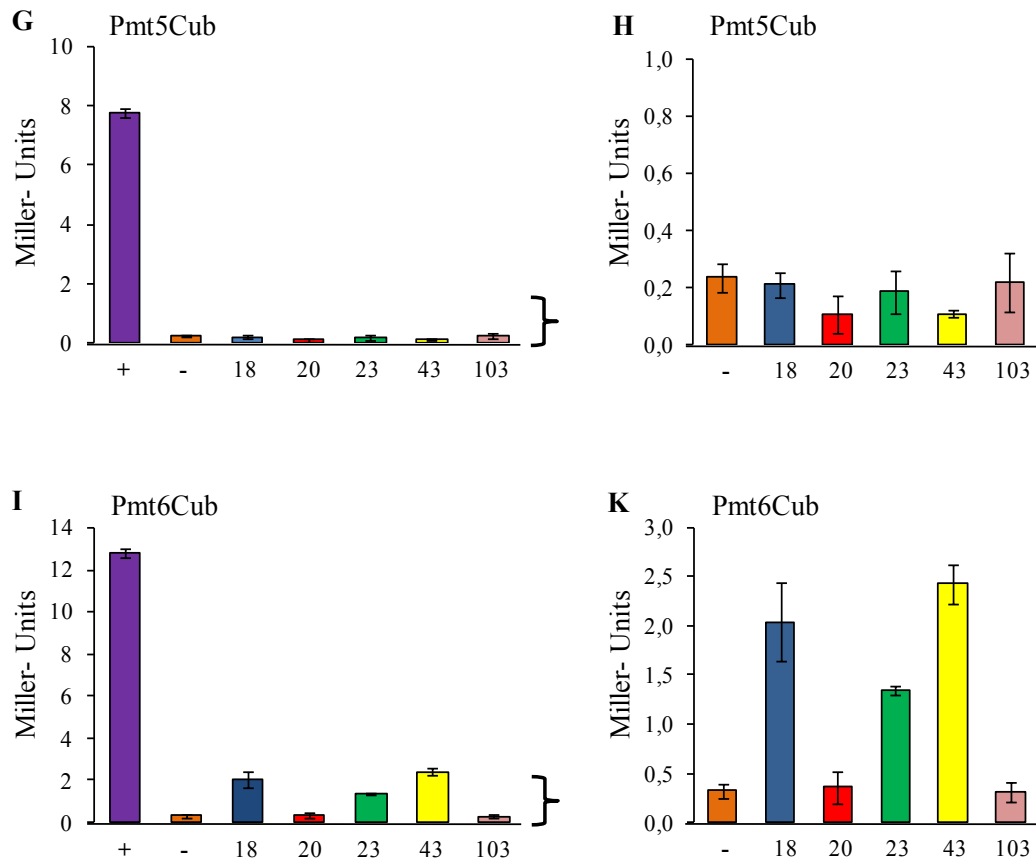


Abb. 3.44: β -Galaktosidase-Messungen der fünf Bank-Kandidaten

Von jeder Paarung wurden zwei unabhängige diploide Stämme über Nacht in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kultur wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser vier Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. (B), (D), (F), (H) und (K) zeigen jeweils den Ausschnitt aus (A), (C), (E), (G) bzw. (I) ohne die Positivkontrolle, die in allen Messungen eine so hohe Aktivität zeigte, dass in der jeweiligen Graphik Unterschiede in den anderen Messungen kaum zu sehen waren. Die Positivkontrolle bestand auch hier aus dem diploiden Stamm, der sowohl das jeweilige Cub-Plasmid als auch das NubWt-Plasmid trug, während die Negativkontrolle die Paarung aus dem Cub-Plasmid und dem NubG-Plasmid darstellte. Die Nummern (18, 20, 23, 43 und 103) stehen für das jeweilige Bankplasmid.

In Abb. 3.44 lässt sich erkennen, dass die Bank-Plasmide 18, 23 und 43 eine spezifische Aktivität mit Pmt6Cub zeigten. Währenddessen schien die Nummer 20 eher mit Pmt2Cub zu interagieren, und eine ganz leichte Interaktion war zwischen Pmt4Cub und der Nummer 103 auszumachen.

Diese fünf Bank-Plasmide wurden einmal mit Hilfe des Primers Split-Ubi_Seq von der Firma SEQLAB sequenziert und noch einmal mit dem Oligonukleotid Inv-Ubi_Seq in die andere Richtung. Es wurde besonders auf den Leserahmen geachtet, in dem sich die unbekannte genomische Sequenz befand. Diese Sequenzen wurden mit Hilfe von PubMedBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), der *Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>) und der *Candida* Data Base (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) zugeordnet und bestimmt (Anhang und Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Zuordnung der unbekannt Sequenzen

Sequenznummer	Länge des ORFs*	Protein	Position des Fragmentes im Protein
18 (17x)	354 bp	117 AS	n. d.
20 (1x)	789 bp	Alg9	44 AS- 217 AS
23 (1x)	354 bp	117 AS	n. d.
43 (1x)	2535 bp	Pmt6	29 AS- 784 AS
103 (1x)	855 bp	Dur3	95 AS- 296 AS

*Die Länge des ORFs beinhaltet die Linker-Sequenzen, das unbekannte Fragment, sowie das *NUBG*.

Die Bank-Plasmide Nummer 18 und 23 hatten die gleiche kurze Sequenz integriert. Sie interagierten spezifisch mit Pmt6Cub (Abb. 3.44), aber die Suche nach der Übersetzung dieser Sequenz blieb erfolglos. Im Laufe der Suche mit der Split-Ubiquitin Bank wurde immer wieder diese kurze Sequenz isoliert, insgesamt sogar 18 Mal. Es handelte sich dabei um das amplifizierte Stück aus dem leeren Two-Hybrid Vektor pDYC-C2, der keine Insertion der genomischen *Candida*-DNA hatte. Aufgrund der Amplifikation wurde ein Teil dieses Vektors mit den Linker-Sequenzen fusioniert und durch die anschließende homologe Rekombination wurde noch die *NUBG*-Sequenz angefügt. Auf diese Weise entstand durch Zufall ein künstliches kleines Protein, das spezifisch mit Pmt6Cub interagiert.

Das Plasmid Nummer 43 dagegen trug die Nukleotide der Positionen 85-2352 der *PMT6*-Sequenz, die insgesamt 2481 bp lang ist. Ein Vergleich mit dem verkürzten Pmt6, das für die Klonierung von pPmt6Cub und pPmt6kNubG eingesetzt worden war, zeigte, dass es sich hier um ein Fragment des verkürzten Pmt6 handelte, dem die ersten 27 Aminosäuren fehlten, aber im C-terminalen Bereich nur drei (Kapitel 3.1.1.2). Zum einen war diese Interaktion zwar schon bekannt, zum anderen bestätigte dies aber die Funktion der Split-Ubiquitin Bank.

Das Plasmid Nummer 20 beinhaltete die Sequenz von *IPF3098 (orf19.4442)* aus dem *Candida*-Genom im richtigen Leseraster, das homolog zu *ALG9* aus *S. cerevisiae* ist. Die Proteine in beiden Spezies weisen eine 37 %ige Identität auf. Alg9p ist eine Mannosyltransferase, die während der *N*-Glykosylierung zweimal eine mit Dolichol-Phosphat aktivierte Mannose auf die wachsende Zuckerkette im ER überträgt. Hier wurden die Aminosäuren der Positionen 44-217 isoliert, während das ganze Protein 561 AS lang ist. Für das vollständige Protein werden neun Transmembran-Domänen vermutet, während für die Sequenz des kleinen Fragments noch drei Membran durchspannende hydrophobe Bereiche vorhergesagt werden (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) und <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Das Plasmid Nummer 103 beinhaltete die Sequenz von *IPF2277 (orf19.6656)* aus dem *C. albicans*-Genom im richtigen Leseraster, das homolog zu Dur3p aus *S. cerevisiae* war. Die Proteine in beiden Pilz-Spezies weisen eine 36 %ige Identität auf. Dur3p ist ein Transporter für Harnstoff und Polyamine durch die Plasmamembran. Die spezifische Interaktion mit Pmt4Cub

war aber nur sehr schwach. Hier wurden die Aminosäuren der Positionen 95-296 isoliert, während das ganze Protein 522 AS lang ist. 13 Transmembran-Domänen wurden für das vollständige Protein vermutet, während für die Sequenz des isolierten Fragments noch vier Transmembran-Domänen vorhergesagt wurden.

3.2.3.1 Biochemische Überprüfung der Interaktion von Pmt2p und Alg9p

Das Bank-Plasmid Nummer 20 beinhaltet die Sequenz von *ALG9* aus *C. albicans*. Zwar war mit Pmt6Cub die Bank-Suche gestartet worden, aber bei der Überprüfung der isolierten Plasmide, zeigte Nummer 20 eine spezifische Interaktion mit Pmt2Cub (Abb. 3.44).

Um die Interaktion von Pmt2p und Alg9p in *C. albicans* zu verifizieren, wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt. Dafür sollte Alg9p C-terminal mit dem V5-Epitop markiert werden. Mit Hilfe des Primer-Paares 5'Alg9-V5 und 3'Alg9-V5 wurde ein Fragment aus dem Vektor pV5-URA3 amplifiziert, das V5- und URA3-Sequenzen beinhaltet. Das resultierende PCR-Produkt wurde durch 72 bp-lange Sequenzen flankiert, die Homologien zum *ALG9*-Locus aufweisen und so für die homologe Rekombination ins Genom von *C. albicans* verwendet wurden (Abb. 3.45).

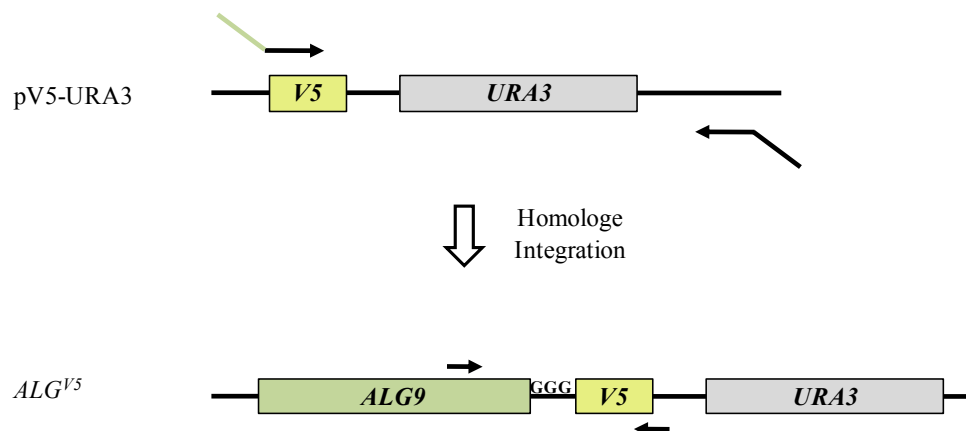


Abb. 3.45: Schema für die V5-Epitop-Markierung von Alg9

Die großen Pfeile im oberen Bild stellen das Primerpaar für die Amplifikation des *3xHA-URA3* Fragmentes dar. Die kleinen Pfeile im unteren Bild geben die Bindestellen für die Oligonukleotide der Verifikations-PCR an.

Das amplifizierte Fragment wurde zum einen in den *C. albicans*-Stamm CAI4 und zum anderen in den Stamm CIS25 (*PMT2^{HA}*) transformiert und auf SD-Medium ohne Leucin selektiert. Mit dem Primer-Paar 5'TestAlg9 und 3'TestV5 wurde eine Kolonie-PCR der Transformanten durchgeführt, um die korrekte Integration des Fragmentes nachzuweisen. Dabei wurde jeweils eine Bande von 994 bp erwartet (Abb. 3.46).

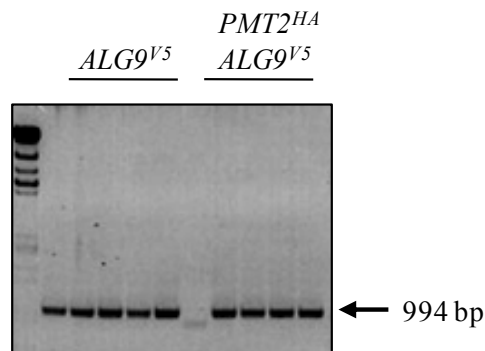


Abb. 3.46: Verifikations-PCR für das V5 markierte *ALG9*

Exemplarisch ist hier die Kolonie-PCR für den Nachweis der integrierten *ALG9^{V5}*-Fragmente gezeigt. Die ersten fünf Spuren zeigen die erfolgreiche Integration in den CAI4-Stamm und die restlichen fünf Spuren in CIS25-Stamm.

In den Rohextrakten der positiv getesteten Transformanten konnte mit Hilfe eines Immunoblots kein Epitop-markiertes Alg9p nachgewiesen werden. Aber nach Isolierung der solubilisierten Membranproteine (Kapitel 2.6.3) aus den Transformanten konnte bei zwei Transformanten eine schwache spezifische Bande erkannt werden (Abb. 3.47).

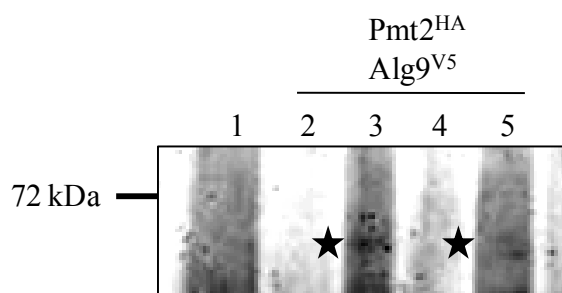


Abb. 3.47: Immunoblot-Analyse von *Alg9^{V5}*

In Spur 1 wurden die isolierten Membranproteine des unmarkierten Stammes SC5314 als Negativkontrolle aufgetragen. Jeweils eine sehr schwache Bande auf der erwarteten Höhen von *Alg9^{V5}* (64 kDa) wurde in den Stämmen CIS37 (Spur 3) und CIS38 (Spur 5) nachgewiesen (Stern). Es wurden jeweils 40 µg der solubilisierten Membranproteine auf einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit 1:1000 verdünnten Anti-V5 Antikörpern aus der Maus und dem sekundären Anti-Maus Antikörper, der an die Peroxidase gekoppelt war.

Wie in Abb. 3.47 gezeigt, konnte nur in den zwei Stämmen CIS37 und CIS38 (beide *PMT2^{HA}*, *ALG9^{V5}*) eine sehr schwache Bande des mit V5-markierten Alg9 nachgewiesen werden. Alg9 aus *C. albicans* hat eine theoretische Größe von 64 kDa, was im Immunoblot bestätigt werden konnte. Trotz der niedrigen Expression von *Alg9^{V5}* wurde mit dem Stamm CIS37 eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Da es nicht gelungen war, einen Stamm zu konstruieren, der lediglich ein Allel von *ALG9* mit V5 markiert hatte, fehlte bei diesem Experiment eine Negativkontrolle. Es war aber relativ unwahrscheinlich, dass tatsächlich ein unbekanntes Protein zusammen mit *Alg9^{V5}* angereichert werden konnte, das anschließend mit Anti-HA Antikörpern auf der Höhe von Pmt2 nachgewiesen werden kann. Als Positivkontrollen wurden die Stämme CIS31 (*PMT1^{V5}/PMT2^{HA}*), und CIS33 (*PMT2^{V5}/PMT2^{HA}*) verwendet (Abb. 3.48).

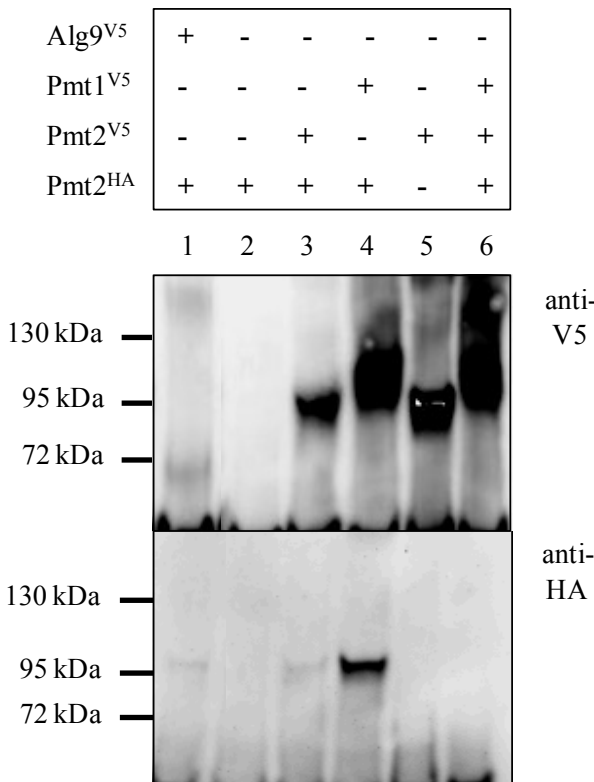


Abb. 3.48: Immunpräzitationen von Alg9^{V5}, Pmt1^{V5} und Pmt2^{V5}

Solubilisierte Membranproteine (Kapitel 2.6.3) der Stämme CIS37 (*PMT2^{HA}/ ALG9^{V5}*, Spur1), CIS25 (*PMT2^{HA}/ ALG9*, Spur2), CIS33 (*PMT2^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur3), CIS31 (*PMT1^{V5}/ PMT2^{HA}*, Spur4), CIS29 (*PMT2^{V5}/ PMT2*, Spur5) und CIS27 (*PMT1^{V5}/ PMT2*, Spur6) und wurden mit monoklonalen Anti-V5 Antikörpern aus der Maus immunpräzipitiert (Kapitel 2.6.5). Diese präzipitierten Proteine wurden 1:1 auf zwei 8 %ige SDS-Gele verteilt und aufgetrennt. Nach dem Transfer auf je eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis mit Anti-HA Antikörpern aus der Ratte (HA), bzw. mit Anti-V5 Antikörpern aus der Maus (V5). Detektiert wurden diese mit Anti-Ratte , bzw. Anti-Maus Antikörpern, die jeweils mit der Peroxidase konjugiert waren.

In Abb. 3.48 kann zum einen beobachtet werden, dass es möglich war, das markierte Protein Alg9^{V5} anzureichern. Zum anderen konnte es auch noch mit Pmt2^{HA} zusammen präzipitiert werden (Spur 1). Diese Interaktion war zwar schwach im Vergleich zu der Bindung zwischen Pmt1^{V5} und Pmt2^{HA} (Spur 4), aber nicht soviel schwächer, als die Interaktion von Pmt2^{V5} und Pmt2^{HA} (Spur 3) in diesem Experiment. Wahrscheinlich lag die auffälligere Anreicherung von Pmt2^{HA} durch Pmt1^{V5} auch an der starken Expression von letzterem.

3.2.3.2 Untersuchungen zu Fusionen von Nr. 18 und Nr. 23

Die Nukleotid-Sequenz, die durch Amplifikation des leeren Bank-Vektors pDYC-C2 durch das Primer-Paar 5'pGAD-C2+linker und 3'pGAD+linker entstanden war, kodierte für das folgende künstliche Protein. Dargestellt sind die sequenzierte Nukleotidsequenz und dessen Übersetzung. Mit Hilfe der beiden Programme TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) und TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) wurde anhand dieser Aminosäure-Sequenz vorhergesagt, dass es sich wahrscheinlich um ein Protein mit einer Transmembran-Domäne handelt. Dementsprechend wurden die Aminosäuren der Transmembran-Domäne blau hinterlegt und die des NubG-Peptids grün. Als Modell kann man sich dieses Peptid folgendermaßen vorstellen (Abb. 3.49).

```

ATG  GCC  GCT  CCA  GCA  CCT  GCC  TTG  GCT  GCT  CCA  GCC  ACC  ACC
M   A   A   P   A   P   A   L   A   A   P   A   T   T
GAA  TTC  CCC  GGG  GGA  TCC  ATC  GAA  TTG  TAC  TGG  ATC  AAG  ATA

```

E	F	P	G	G	S	I	E	L	Y	W	I	K	I
TTC	CTC	TTC	AGT	GAT	GTC	TTT	AGA	GTT	ATT	GTC	CTT	GTC	TTC
F	L	F	S	D	V	F	R	V	I	V	L	V	F
CTC	ATC	TTG	ATT	CAA	ATT	CGA	TGT	CGA	CCT	GCA	GAG	ATC	CCT
L	I	L	I	Q	I	R	C	R	P	A	E	I	P
GCT	CCA	GCT	GCC	CCA	TTG	GCT	GTT	CCA	ACC	GCA	GCT	ATG	CAG
A	P	A	A	P	L	A	V	P	T	A	A	M	Q
ATT	TTC	GTC	AAG	ACT	TTG	ACC	GGT	AAA	ACC	GGA	ACA	TTG	GAA
I	F	V	K	T	L	T	G	K	T	G	T	L	E
GTT	GAA	TCT	TCC	GAT	ACC	ATC	GAC	AAC	GTT	AAG	TCG	AAA	ATT
V	E	S	S	D	T	I	D	N	V	K	S	K	I
CAA	GAC	AAG	GAA	GGA	ATC	CCT	GGT	GGG	TCG	ACC	ATG	AGC	GGC
Q	D	K	E	G	I	P	G	G	S	T	M	S	G
CGC	CTG	CAG	CCA	AGC	TAA								
R	S	Q	P	S	Stop								

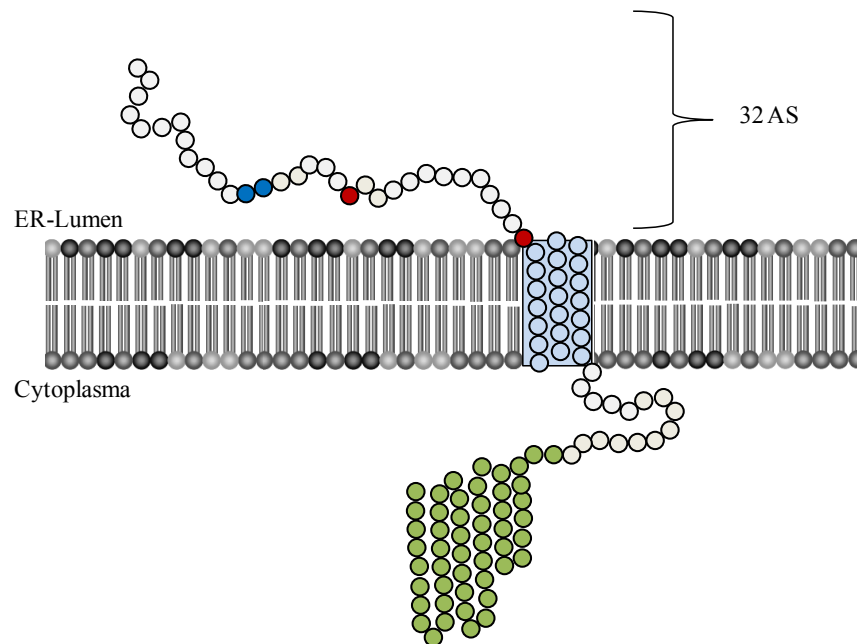


Abb. 3.49: Sequenz und Modell des künstlichen Proteins Nr. 23 und Nr. 18

Gezeigt ist die theoretische Lage des synthetischen Proteins in der ER-Membran. Dabei symbolisiert jedes Kugelchen eine Aminosäure, während eine blaue Kugel für ein Threonin steht und eine rote für ein Serin. Die grünen Kugeln symbolisieren die Aminosäuren, die zum NubG gehören und hellblau ist die Transmembran-Domäne hinterlegt.

Der N-terminale Teil des Proteins befindet sich auf der Innenseite der ER-Membran (Abb. 3.49). Und dieser Teil besteht aus 32 Aminosäuren und beinhaltet sowohl zwei Serine als auch zwei

Threonine. Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob es sich bei dieser Aminosäure-Sequenz, die spezifisch mit Pmt6Cub interagierte, vielleicht um eine Zielsequenz für Pmt6p handelte. Um diese Frage zu beantworten, sollten die vier potentiellen O-Glykosylierungsstellen mutiert werden. Die beiden Serin- und Threonin-Reste sollten einzeln zu Asparagin mutiert werden. Es wurde jeweils eine Mutagenese-PCR mit dem "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" von Stratagene durchgeführt. Als Ausgangs-Vektor diente jeweils das isolierte NubG-Bank-Plasmid Nummer 23. Trotz einiger Versuche war es nur möglich, die beiden Serine einzeln zu Arginin zu mutieren.

Nr. 23	MAAPAPALAAPAT T TEFPGG S IELYWIKIFL F S –TM - Nub
Nr. 23_S20-N	MAAPAPALAAPAT T TEFPGG R IELYWIKIFL F S –TM - Nub
Nr. 23_S20-N	MAAPAPALAAPAT T TEFPGG S IELYWIKIFL R –TM - Nub

Die Threonin-Reste ließen sich weder einzeln noch zusammen mutieren. Die beiden mutierten Plasmide p23_S20R-NubG und p23_S32R-NubG wurden in den *S. cerevisiae*-Stamm THY.AP5 transformiert. Die Transformanten wurden mit THY.AP4, der pPmt6Cub trug, gepaart und auf Aktivierung der Reporter-Gene getestet. Gezeigt ist in Abb. 3.50 die β -Galaktosidase-Messung.

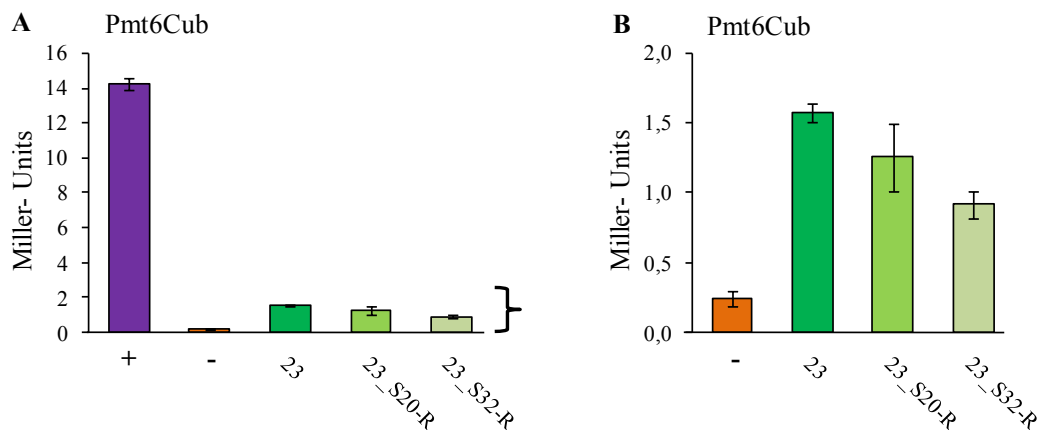


Abb. 3.50: β -Galaktosidase-Messung des Bank-Plasmids pDYC-23 und dessen mutierten Versionen

Von jeder Paarung wurden zwei unabhängige diploide Stämme über Nacht in SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan angezogen. Von jeder Kultur wurde die β -Galaktosidase-Aktivität doppelt nach Kapitel 2.6.10 bestimmt. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte dieser vier Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung. Dabei zeigt (B) den Ausschnitt aus (A) ohne die Positivkontrolle, die eine so hohe Aktivität zeigte, dass in der Graphik (A) Unterschiede in den Messungen kaum zu sehen waren. Die Positivkontrolle bestand auch hier aus dem diploiden Stamm, der sowohl das jeweilige Cub-Plasmid als auch das NubWt-Plasmid trug, während die Negativkontrolle die Paarung aus dem Cub-Plasmid und dem NubG-Plasmid darstellte. Die 23 symbolisiert das Plasmid p23-NubG, während 23_S20-R und 23_S32-R für die jeweilige Mutation stehen.

Anhand von Abb. 3.50 ließ sich erkennen, dass die Mutationen S20-R und S32-R des künstlichen Proteins mit Pmt6Cub ebenso wie die unmutierte Form eine Interaktion eingehen konnten.

Vielleicht war die Interaktion aufgrund des mutierten S32 etwas schwächer, aber es gab auch hier nach wie vor eine deutlich messbare Aktivierung von *lacZ*.

4 Diskussion

Pmt-Proteine kommen in tierischen Lebewesen, außer in *C. elegans* vor, während Pflanzen keine *PMT*-Gene besitzen. Generell scheint die von Pmt-Proteinen katalysierte Modifikation der Ziel-Proteine mit *O*-glykosidisch gebundenen Mannosen für die Lebensfähigkeit der Organismen essentiell zu sein (Gentzsch und Tanner, 1996; Ichimiya *et al.*, 2004; Willer *et al.*, 2004). Für den humanpathogenen Pilz *C. albicans* ist schon die Deletion der einzelnen Pmt2-Isoform lethal (Prill *et al.*, 2005). Fast alle *PMT*-Deletionen in *C. albicans* führen zu Zellwand-Defekten und eingeschränkter Virulenz (Prill *et al.*, 2005; Rouabhia *et al.*, 2005).

4.1 Interaktionen der Pmt-Proteine untereinander

Aus *S. cerevisiae* sind Heterodimere aus Pmt1 und Pmt2, sowie aus Pmt3 und Pmt5 bekannt, während Pmt1 und Pmt5, wie auch Pmt3 und Pmt2 weniger starke Komplexe eingehen (Girrbach und Strahl, 2003). Dabei ist auffällig, dass immer Mitglieder der Pmt1-Familie mit einem Pmt2-Familienmitglied interagieren. Pmt4p dagegen bildet ein Homodimer in *S. cerevisiae*, aber das Pmt4-homologe Pomt1 in Säugetieren interagiert mit dem Pmt2-homologen Pomt2 und bildet ein Heterodimer. Dabei konnte für die Heterodimere aus Pmt1p und Pmt2p, sowie für den Komplex aus Pomt1 und Pomt2 nachgewiesen werden, dass diese Interaktionen essentiell für die Mannosyltransferase-Aktivität sind (Gentzsch *et al.*, 1995; Akasaka-Manyu *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden für *C. albicans* Homodimere aus Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p, sowie ein Heterodimer aus Pmt1p und Pmt2p nachgewiesen (Abb. 4.1).

In Abb. 4.1 ist der Vergleich zwischen dem Interaktionsverhalten der Pmt-Proteine aus *C. albicans* zu denen aus *S. cerevisiae*, sowie aus der Fruchtfliege und dem Menschen dargestellt. Dabei fällt auf, dass das Heterodimer aus Pmt1p und Pmt2p, wie auch das Homodimer aus Pmt4p ihre Entsprechung in der Bäckerhefe finden. Demgegenüber bilden in den höheren Eukaryoten das Pmt2- und das Pmt4-Homologon einen Komplex, der weder in *C. albicans* noch in *S. cerevisiae* beobachtet werden konnte. Der einzige Hinweis für ein Heterodimer aus Pmt2p und Pmt4p bei Pilzen stammt bisher aus *C. neoformans* (Grahl, 2006).

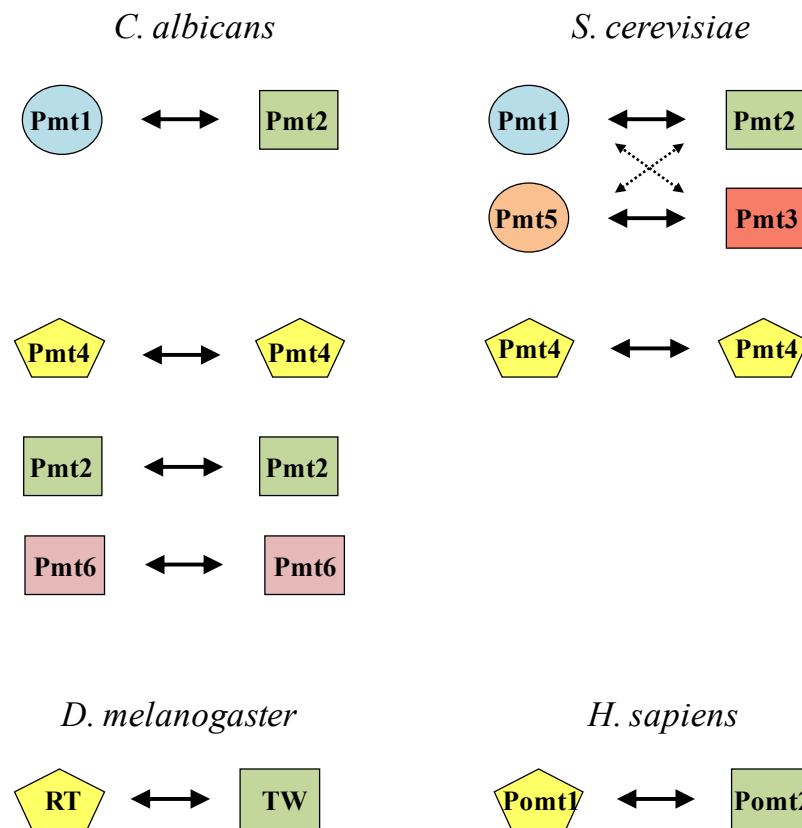


Abb. 4.1: Vergleich der Pmt-Komplexe unterschiedlicher Organismen

Gezeigt sind die nachgewiesenen Komplexe der Pmt-Proteine aus *C. albicans*, *S. cerevisiae* (Girrbach und Strahl, 2003), *D. melanogaster* (Ichimiya *et al.*, 2004) und *H. sapiens* (Akasaka-Manya *et al.*, 2006). Dabei sind die Mitglieder der Pmt1-Familie als Kreis dargestellt, während die Pmt2-Familie durch ein Rechteck repräsentiert wird und die Pmt4-Familie durch ein Fünfeck. Die einzelnen homologen Pmt-Proteine werden durch die gleiche Farbe dargestellt.

4.1.1 Homodimere aus Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin Systems wurden die Homodimere aus Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p nachgewiesen (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Die Interaktion von Pmt2p mit sich selbst wurde zudem über eine Koimmunopräzipitation bestätigt (Abb. 3.33 und Abb. 3.34). Dabei war eine Homodimer-Bildung von Pmt4p schon in *S. cerevisiae* beobachtet worden, während homomere Komplexe aus Pmt2p und Pmt6p dort nicht detektiert werden konnten (Girrbach und Strahl, 2003). Allerdings wurde von den Autoren ein hochmolekularer Komplex mit Pmt6p beobachtet, wobei aber die Bildung eines Homodimers ausgeschlossen wurde. Auch konnte keine Beteiligung weiterer Pmt-Isoformen festgestellt werden und die Autoren schlossen daraufhin, dass es sich um einen unbekanntem Interaktionspartner von Pmt6p handelte.

Eine offene Frage bei der Dimer-Bildung der Pmt-Proteine allgemein ist, ob sie im Komplex arbeiten oder sich gegenseitig glykosylieren und dabei aktivieren. Die Homodimer-Bildung von

Pmt4p in *S. cerevisiae* konnte durch einen Aminosäure-Austausch des hoch konservierten Arginins an Position 142 zu Glutamat verhindert werden. Demgegenüber konnte der Komplex nach Deletion des katalytischen Loop5 immer noch beobachtet werden (Girrbach und Strahl, 2003). Dies spricht eher für eine Dimerisierung, als für einen katalytischen Komplex, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Glykosylierung und die Bindung von Zielproteinen in unterschiedlichen Regionen erfolgen können. Für *C. albicans* wurde gezeigt, dass die Komplexbildung von Pmt4p hier tatsächlich von loop5 abhängt, während das hochkonservierte Arginin an Position 137 dafür nicht essentiell ist (Misselwitz, 2007). In diesem Fall ist die gegenseitige Glykosylierung der einzelnen Pmt4-Proteine nicht unwahrscheinlich. In dieser Arbeit wurde das konservierte Arginin von Pmt6p an Position 179 zu Glutamat ausgetauscht, sowie der loop5 deletiert. Interessanterweise war die Homodimer-Bildung von Pmt6p ohne die katalytische Schleife nicht grundsätzlich beeinträchtigt, während die Interaktion durch den Aminosäure-Austausch erheblich behindert, wenn auch nicht vollständig inhibiert wurde (Abb. 3.10). Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die Homodimere aus Pmt4p in *S. cerevisiae*, sowie aus Pmt6p in *C. albicans* keine Enzym-Zielprotein-Komplexe sind, während die Pmt4-Proteine in *C. albicans* sich möglicherweise gegenseitig glykosylieren. Für diese These spricht auch die Beobachtung, dass eine Interaktion von Pmt4p mit dessen Substrat Sec20p im Split-Ubiquitin System nachgewiesen werden konnte und diese Interaktion durch die Deletion von loop5 ebenfalls inhibiert wurde (Misselwitz, 2007).

4.1.2 Homodimere auch für Pmt1p?

Bei drei von fünf Pmt-Isoformen in *C. albicans* konnten Homodimer-Bildungen beobachtet werden. Fraglich ist, warum dies für Pmt1p und Pmt5p nicht zutrifft. Zum einen ist es natürlich durchaus möglich, dass diese beiden Mannosyltransferasen die Ausnahmen sind und keine Homodimere bilden, da auch für Pmt1p und Pmt5p aus *S. cerevisiae* keine homomeren Komplexe beobachtet wurden. Zum anderen könnte eine eventuelle Dimerisierung durch die experimentellen Voraussetzungen behindert worden sein. In Kapitel 3.1.1.1 wurde beschrieben, dass für die Verwendung des Split-Ubiquitin Systems der C-Terminus der Pmt-Proteine verkürzt werden musste. Gerade Pmt1p hat aber im Gegensatz zu den anderen Pmt-Proteinen einen langen C-terminalen Bereich, der für die Dimer-Bildung wichtig sein könnte. Mit 153 AS, die C-terminal von der siebten Transmembrandomäne liegen, ist dieser Bereich fünf- bis siebenfach länger als bei den anderen Pmt-Isoformen. In *S. cerevisiae* konnte zwar beobachtet werden, dass dieser verlängerte Bereich von Pmt1p weder für die Aktivität noch für die Heterodimer-Bildung von Pmt1p und Pmt2p erforderlich war (Girrbach *et al.*, 2000), aber der C-terminale Bereich von Pmt1p ist hier auch mit 111 AS um 42 AS kürzer als in *C. albicans*. Für die Inhibierung einer eventuellen Homodimerisierung von Pmt1p im Split-Ubiquitin System spricht ebenfalls die Abwesenheit eines Komplexes aus Pmt1p und Pmt2p, da ein Dimer aus diesen beiden Pmt-Proteinen mit Hilfe einer Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.33; Abb. 3.34). In diesem Experiment wurden Epitop-markierte Pmt-Proteine eingesetzt, die eine vollständige C-terminale Region aufwiesen.

4.1.3 Dimer-Bildung von Pmt5p?

Für Pmt5p konnte im Split-Ubiquitin System ebenfalls keine Homodimer-Bildung beobachtet werden. Aber bei *S. cerevisiae* ist eine Heterodimer-Bildung aus Pmt5p und Pmt3p, sowie ein schwächerer Komplex aus Pmt5p und Pmt2p bekannt (Abb. 4.1; Girrbach und Strahl, 2003). Ein Pmt3-Homolog findet sich nicht bei *C. albicans*, aber auch mit Pmt2p scheint Pmt5p hier keine Bindung einzugehen. Diese Abwesenheit von Pmt5-Komplexen kann zum einen experimentelle Ursachen haben. Denn wie auch Pmt1Cub, wies Pmt5Cub sehr niedrige β -Galaktosidase-Aktivitäten auf (Abb. 3.6; Abb. 3.8). Vielleicht waren gerade mit den C-terminalen PmtNubG-Fusionen eventuelle Pmt5Cub Interaktionen so gering, dass die Reporteragen-Aktivitäten nicht detektierbar waren. Diese herabgesetzte Aktivierung der Reporter gene bei C-terminalen NubG-Fusionen wurde schon beschrieben (Obrdlik *et al.*, 2004). Nub ist die N-terminale Hälfte des Ubiquitins. Dementsprechend besitzt es im nativen Protein eine freie N-terminale Region, welche durch die C-terminale Fusion mit anderen Proteinen abgeschirmt wird. Vielleicht erkennt die Ubiquitin-spezifische Protease ihr Zielprotein aufgrund dieses versteckten N-Terminus sehr viel schlechter. In diesem Fall wären sehr viele interagierende NubG- und Cub-Proteine notwendig, damit genug Transkriptionsfaktoren abgespalten werden, um eine Reporteraktivität detektieren zu können.

Demgegenüber war eine generelle Grundaktivität der Reporter gene durch die Interaktion der Cub-Fusionsproteine mit den N-terminalen NubG-Fusionen zu beobachten. Für Pmt1Cub und Pmt5Cub war diese aber sehr viel schwächer als für die anderen PmtCub-Proteine (Abb. 3.7; Abb. 3.8). Dementsprechend sollten Aussagen anhand der Interaktionen von Pmt1Cub und Pmt5Cub mit den N-terminal fusionierten NubGPmt-Proteinen getroffen werden können. Aber auch hier zeigte Pmt1p keine Neigung zu einer Homodimer-Bildung (Abb. 3.8 A). Demgegenüber zeigte sich zwar eine schwache Interaktion mit NubGPmt2, die aber durch eine Interaktion von NubGPmt2 mit allen getesteten PmtCub-Proteinen relativiert werden muss. Das Gleiche gilt auch für die Interaktion zwischen Pmt5Cub und NubGPmt2 (Abb. 3.8 D). Hier konnte aber gleichzeitig eine selektive Interaktion zwischen Pmt5Cub und NubGPmt6 in der langen Pmt-Version beobachtet werden. NubGPmt6 zeigte abgesehen davon nur noch zusammen mit Pmt6Cub eine vergleichbare Aktivität der β -Galaktosidase (Abb. 3.8 E). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass Pmt5p und Pmt6p aus *C. albicans* ein Heterodimer bilden können. Pmt6p gehört, genau wie Pmt3p aus *S. cerevisiae* in die Pmt2-Familie. Heterodimere aus der Pmt1- und der Pmt2-Familie wurden schon für *S. cerevisiae* nachgewiesen (Girrbach und Strahl, 2003).

4.1.4 Komplexbildung aus Pmt1p und Pmt2p

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Heterodimer aus Pmt1p und Pmt2p in *C. albicans* mit einer Koimmunopräzipitation nachgewiesen (Abb. 3.33; Abb. 3.34). Diese Interaktion ließ sich im Split-Ubiquitin System aber nicht beobachten (Abb. 3.6; 3.8). Ein Grund könnte die C-terminale Verkürzung der Pmt-Proteine gewesen sein, die gerade Pmt1p gehindert haben könnte, Komplexe

auszubilden. Dagegen sprechen aber die Ergebnisse aus den N-terminalen Fusionen (Abb. 3.8 A und B). Hier wurde nicht nur die verkürzte Version von Pmt1p, sondern zusätzlich auch das vollständige Protein an NubG fusioniert. Pmt2Cub wurde durch die C-terminale Verkürzung offenbar in seiner Interaktionsfähigkeit nicht eingeschränkt, da es mit Pmt2NubG interagiert (Abb. 3.5; Abb. 3.6). Dementsprechend wäre eine Interaktion zwischen dem NubGPmt1 in der langen Version und Pmt2Cub zu erwarten gewesen. Da hier aber auch keine Interaktion beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass Pmt1p sich nicht für das Split-Ubiquitin System eignet. Wahrscheinlich verändert das N-terminal fusionierte NubG den N-terminalen Bereich von Pmt1p. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das N-terminale erste Drittel von ScPmt1p hier essentiell für die Interaktion mit ScPmt2p ist (Girrbach et al., 2000).

Vielleicht führte aber auch die Expression in *S. cerevisiae* zu einem veränderten Pmt1p. Wobei der Verdacht einer Punktmutation aufgrund einer unterschiedlichen Codon-Verwendung nahe liegt. Denn *C. albicans* übersetzt das Basentriplet CUG nicht mit Leucin, wie alle anderen Organismen sondern mit Serin (Santos und Tuite, 1995). Tatsächlich findet sich in der Proteinsequenz von Pmt1p an Position 60 ein nicht konserviertes Serin, das in der Nukleotidsequenz durch dieses Codon dargestellt wird. Es befindet sich im N-terminalen Bereich noch vor der ersten Transmembrandomäne. Ein mögliches Szenario wäre, dass dieser Basen-Austausch zu Leucin in *S. cerevisiae* zu einer Inhibierung der Pmt1-Pmt2-Interaktion geführt hat. Schließlich konnte schon gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der Lage war die Interaktion von ScPmt1p und ScPmt2p in *S. cerevisiae* zu unterdrücken. In dem Fall war es das hochkonservierte Arginin an Position 138 von ScPmt1p (Girrbach et al., 2000).

Für Pmt1p und Pmt2p aus *S. cerevisiae* wird angenommen, dass sie hauptsächlich als Heterodimer funktionieren (Gentzsch und Tanner, 1995; Girrbach et al., 2003). Diese Vermutung kann für *C. albicans* weitgehend ausgeschlossen werden, da die *pmt1*-Deletionsmutante lebensfähig ist, während *PMT2* ein essentielles Gen darstellt (Prill et al., 2005). Vielleicht glykosylieren diese beiden Mannosyltransferasen einzeln bzw. als Homodimer andere Zielproteine als das Heterodimer aus beiden Proteinen.

4.1.5 Bedeutung der C-terminalen Region von Pmt1p

Interessanterweise führte die C-terminale Epitop-Markierung von Pmt1p zu einem weitgehend inaktiven Pmt (Kapitel 3.1.3.1), das aber immer noch mit Pmt2p interagiert (Abb. 3.33; Abb. 3.34). Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass der überdurchschnittlich lange C-terminale Bereich von Pmt1p von essentieller Bedeutung für dessen Mannosyltransferase-Funktion ist. Demgegenüber ist keine Beeinträchtigung der Funktion von Pmt2p nach der Epitop-Markierung festzustellen (Kapitel 3.1.3.1). Überraschenderweise führte aber die Deletion des C-terminalen Bereiches in ScPmt1p nicht zu einer Abnahme der Mannosyltransferase-Aktivität, sondern zu einem kleinen, aber signifikanten Anstieg (Girrbach et al., 2000). Vielleicht haben die 42 AS, die dieser C-terminale Bereich von CaPmt1p länger ist als von ScPmt1p, eine große

Bedeutung für die Funktion der Mannosyltransferase. Andererseits wäre es auch möglich, dass dieser C-terminale Teil von Pmt1p aus beiden Organismen eine Rolle bei der Erkennung bestimmter Zielproteine spielt. In *S. cerevisiae* wurde nämlich nur die Übertragung eines [C^{14}] Mannose von dem C-terminal mutierten Pmt1p *in vitro* auf das künstliche Akzeptor-Peptid Acetyl-YATAV-NH₂ gemessen (Strahl-Bolsinger und Tanner, 1991; Girrbach *et al.*, 2000). Dieses Pentapeptid wurde bisher aber in keiner Sequenz der natürlichen Zielproteine von Pmt1p gefunden. Wahrscheinlich repräsentiert dieser Test daher auch nicht die Zielerkennung von Pmt1p *in vivo*.

Interessant wäre es, sich die Phänotypen in *C. albicans* nach einer Deletion dieses C-terminalen Bereiches anzugucken. Einen Vorgeschmack darauf geben die Phänotypen der Stämme CIS1 und CIS2 (*pmt1/ PMT1^{HA}*) in Kapitel 3.1.3.1. Interessanterweise scheint hier das Epitop-markierte Pmt1p die Temperatursensitivität des *pmt1*-Deletionsstammes bei 42 °C fast vollständig aufzuheben, aber die Sensitivität gegenüber Hygromycin konnte nicht komplementiert werden (Abb. 3.27). Vielleicht resultiert dieses Phänomen aus der O-Glykosylierung unterschiedlicher Zielproteine von Pmt1p. Wahrscheinlich wäre aber auch, dass eine gewisse Restaktivität von Pmt1^{HA} für die Komplementation des einen Phänotyps ausreicht, für die des anderen aber nicht. Für diese These spricht die starke, bis zu etwa 100fache Überexpression von Pmt1^{HA} in den Stämmen CIS1 und CIS2 (*pmt1/ PMT1^{HA}*) im Vergleich mit den Stämmen CIS23 und CIS24 (*PMT1/ PMT1^{HA}*) (vergl. Abb. 3.14 und Abb. 3.17). In dem Fall würde die Transkription des kaum funktionierenden Pmt1p stark aktiviert werden. Wahrscheinlich gibt es bestimmte Sensoren, die z. B. den verstärkten Abbau von unterglykosyliertem Sec20 oder die verstärkte Zellakkumulation der *pmt1*-Mutanten registrieren (Weber *et al.*, 2004; Prill *et al.*, 2005). Vielleicht sind dies die gleichen Sensoren, die auch die verstärkte Transkription von *PMT2* in der *pmt1*-Mutante induzieren (Cantero *et al.*, 2007).

4.2 Verwendung einer genomischen Split-Ubiquitin Bank

Anhand dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich das Split-Ubiquitin System mit kleinen Einschränkungen für die Suche nach Interaktionspartnern von Pmt-Proteinen aus *C. albicans* eignet. Ungeeignet ist dabei die Verwendung der N-terminal fusionierten NubG-Fusionsproteine (Kapitel 3.1.1.3; Abb. 3.42). Auch waren Interaktionen von Pmt1p auf diese Weise nicht festzustellen. Aufgrund der Homodimer-Bildung von Pmt6p konnte aber davon ausgegangen werden, dass weitere Interaktionspartner von Pmt6p mit Hilfe dieses Systems zu finden sein sollten.

Mit der C-terminal fusionierten Bank wurden etwa 200.000 Klone untersucht. Diese decken natürlich noch bei weitem nicht alle potentiellen Gene des *C. albicans*-Genoms (16 Mb) ab. Auch besteht eine wichtige Voraussetzung für die C-terminale NubG-Fusion an das unbekannte genomische Fragment darin, dass die Translation des Fusionsproteins nicht aufgrund eines Stop-

Codons vorzeitig abbricht. In dem Fall wäre das NubG nicht an das unbekannte Protein fusioniert. Gerade bei langen genomischen Fragmenten bis zu 3 kb ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, dass dies passiert. Bei den langen Fragmenten besteht allerdings auch noch die Möglichkeit, dass zufällig ein Promotor in die Bank kloniert wurde, der unter den gegebenen Umständen in *S. cerevisiae* aktiv ist und die Transkription des Fusionsproteins steuert. In der Praxis konnte dies aber nicht beobachtet werden. Aber als Beweis für die Funktionalität dieser Split-Ubiquitin Bank kann die Isolierung eines nahezu vollständigen Pmt6NubG gewertet werden (Abb. 3.44 K, Nr.43). In dem Fall wurde ein 2,5 kb großes Fragment in den Bankvektor kloniert und komplett transkribiert sowie translatiert, so dass ein C-terminal mit NubG fusioniertes Protein entstehen konnte.

4.2.1 Interaktion zwischen Pmt6p und einem künstlichen Protein

Ein zweites Protein konnte mit Hilfe der Split-Ubiquitin Bank isoliert werden, das ebenfalls eindeutig und selektiv mit Pmt6p interagierte (Abb. 3.44 K, Nr. 18 und 23). Dieses Protein war mit 117 AS recht klein und resultierte aus der Amplifikation leerer pGAD-C2 Vektoren mit den spezifischen Oligonukleotiden für die Split-Ubiquitin Bank. Die Suche nach homologen Genen wie auch nach homologen Proteinen in den Candida-Datenbanken (<http://www.candidagenome.org/> und <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) blieb ohne Ergebnis. Durch eine Hydropathie-Analyse (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> und http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) konnte strukturell vorhergesagt werden, dass dieses künstliche Peptid eine Transmembran-Domäne besitzt. Zudem befinden sich der N-terminale Bereich im ER-Lumen und der C-terminale Bereich zusammen mit dem NubG im Cytoplasma (Abb. 3.49). Dabei gilt der lumenalen Region eine besondere Aufmerksamkeit, dessen AS-Sequenz hier dargestellt wird:

MAAPAPALAAPATTEFPGGSIELYWIKIFLFS –TM – NubG

Wenn es sich nämlich um ein künstliches Zielprotein von Pmt6p handelte, sollte man die Zielsequenz für die *O*-Glykosylierung im Lumen des ERs vermuten, da hier die Übertragung des ersten Mannosylrestes stattfindet (Haselbeck und Tanner, 1983). Nach der Mutagenese der beiden Serine an Position 20 und 32 wurde die Interaktion zwischen Pmt6p und dem Protein nicht wesentlich herabgesetzt. Wäre dies der Fall gewesen, hätte die Vermutung nahe gelegen, dass diese Serine von Pmt6p glykosyliert werden. Da aber in *C. albicans* Threonine gegenüber Serinen bei der *O*-Glykosylierung bevorzugt werden (Westen *et al.*, 1993), ist die Mutagenese der Threonin-Reste an Position 13 und 14 noch abzuwarten.

Allerdings gehören die ersten 19 Aminosäuren zu der Linkersequenz des Split-Ubiquitin Systems und kommen in allen getesteten NubG-Fusionsproteinen vor. Daher ist es unsinnig, ausgerechnet in dieser Region eine spezifische Bindesequenz für Pmt6p zu suchen. Eine spezifische Konsensus-Sequenz für die Glykosylierung durch ein bestimmtes Pmt6p gibt es aber möglicherweise nicht, da die Erkennung eines Pmt6p-Zielproteins über strukturelle Eigenschaften stattfinden könnte. Für Pmt4p aus *S. cerevisiae* wurde postuliert, dass für die Erkennung des

Zielproteins eine S/T-reiche Region auf der ER-luminalen Seite einer Transmembran-Domäne wichtig ist (Hutzler *et al.*, 2007). Die Autoren konnten zeigen, dass Fus1p, eigentlich ein Zielprotein von Pmt4p, nach Deletion der Transmembran-Domäne spezifisch von Pmt1p und Pmt2p glykosyliert wurde. Vielleicht ist auch im Fall von Pmt6p die Position der Transmembran-Domäne entscheidend, sowie die Struktur der umgebenden Sequenzen. Dabei könnte auch durchaus die cytosolische Seite des Proteins eine entscheidende Funktion bei der Bindung an Pmt6p innehaben. Dementsprechend wäre es interessant hier weitere Mutationen einzuführen, die die Transmembran-Domäne flankierenden Bereiche betreffen.

4.2.2 Verbindung zwischen O- und N-Glykosylierung

Der Bank-Vektor Nr. 20 wurde ebenfalls aus einem positiven Bank-Klon mit Pmt6p als Köder isoliert. Dieser Vektor wurde in den *MAT α* -Stamm retransformiert, der anschließend mit den einzelnen *MAT α* -Stämmen, die die unterschiedlichen PmtCub-Plasmide trugen, gepaart. Aber es zeigte sich keine Aktivität des diploiden Stammes mit dem Pmt6Cub-Plasmid und Vektor Nr. 20. Diese Beobachtung war während der Bank-Suche eigentlich nicht ungewöhnlich, da die meisten Bank-Vektoren, die aus den positiven Klonen isoliert worden waren, anschließend keine Interaktion mehr mit Pmt6Cub zeigten. Eine Ursache dafür liegt wahrscheinlich an den langen Inkubationszeiten für das Wachstum der gepaarten Bank-Klone, die teilweise bei bis zu zwei Wochen lagen. In dieser Zeit ermöglichte vielleicht eine Mutation der Zelle ein langsames Wachstum auf dem Selektionsmedium. Vielleicht wurde auch der an Cub fusionierte Transkriptionsfaktor PLV im Laufe der Zeit doch einfach abgeschnitten und konnte die Reportergene aktivieren.

Im Fall von Vektor Nr. 20 kann eines dieser Szenarien durchaus abgelaufen sein. Das genomische Fragment kodierte aber die Sequenz für ein Protein, das eine selektive Interaktion mit Pmt2Cub zeigte (Abb. 3.44). Dieses Protein stellte sich als Teil des *Candida*-Homologs zu Alg9 aus *S. cerevisiae* heraus, einer Mannosyltransferase der N-Glykosylierung (AS 44-217 von insgesamt 789 AS). Die Hydropathie-Analyse ergab ein Protein mit 9 Transmembran-Domänen, von denen drei im Klon Nr. 20 enthalten waren (Abb. 4.2).

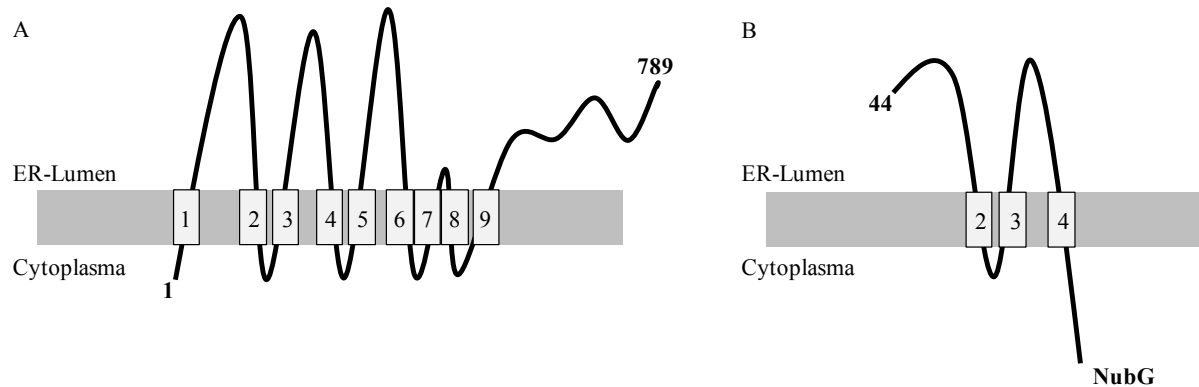


Abb. 4.2: Schematische Darstellung von Alg9 und des Bank-Vektors Nr. 20

(A) Schematische Darstellung von Alg9 aus *C. albicans* nach einer Hydropathie-Analyse mit neun Transmembran-Domänen. (B) Schematische Darstellung von Nr. 20 nach einer Hydropathie-Analyse der Aminosäuresequenz. Die Transmembran-Domänen 2-4 bleiben bestehen, sowie die lumenale Schleife zwischen der dritten und der vierten Transmembran-Domäne. NubG ist an das C-terminale Ende fusioniert und wie erwartet im Cytoplasma lokalisiert.

Von den drei Schleifen, die von dem vollständigen Alg9p in das Lumen des ER ragen, blieb im verkürzten Alg9p nur eine zwischen der dritten und der vierten Transmembran-Domäne übrig (Abb. 4.2). Diese Region ist 46 AS lang und beinhaltet immerhin fünf Serin- und zwei Threonin-Reste. Vielleicht wird Alg9p genau hier von Pmt2p mannosyliert, wobei die Art der Interaktion zwischen Alg9p und Pmt2p nicht unbedingt aus Enzym und Zielprotein bestehen muss. Interessanterweise ist Alg9p ebenfalls eine Mannosyltransferase, die wie Pmt2p Dolichyl-Phosphat-Mannose als Zuckerdonor verwendet. Während Pmt2p den Mannoserest auf eine Hydroxylgruppe des Zielproteins überträgt, verlängert Alg9p den wachsenden, Dolichol-gebundenen Zuckerbaum gleich an zwei Ästen mit einer α -1,2-Mannose (Abb. 4.3).

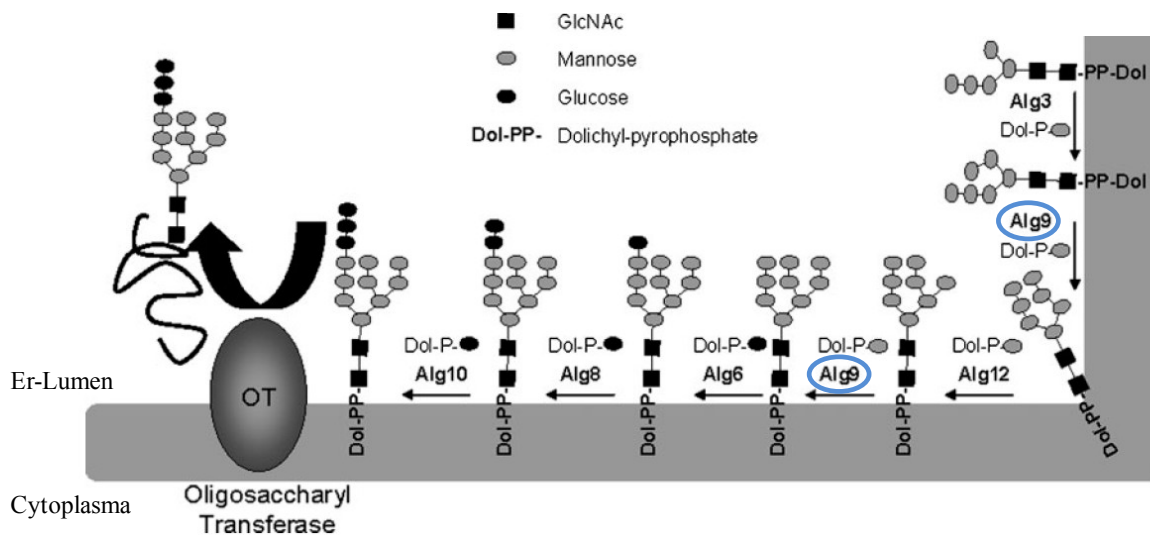


Abb. 4.3: Wirkungsweise von Alg9p während der N-Glykosylierung

Ein Kern-Oligosaccharid wird schrittweise im ER an Dolichyl-Pyrophosphat synthetisiert. Dieses Oligosaccharid wird anschließend von dem Oligosaccharyl-Transferase-Komplex auf das Zielprotein übertragen. Alg9p ist hier

hervorgehoben und katalysiert zweimal die Übertragung eines Mannosylrestes von Dolichyl-Phosphat-Mannose auf die wachsende Zuckerkette. Die Abbildung wurde (Weerapana und Imperiali, 2006) entnommen und modifiziert.

Der Nachweis der *O*-Glykosylierung eines bestimmten Proteins durch Pmt2p ist in *C. albicans* allgemein sehr schwierig. Die *O*-Glykosylierung eines Proteins wird normalerweise mit einem veränderten Laufverhalten in der jeweiligen *pmt*-Mutante nachgewiesen. *PMT2* ist aber ein essentielles Gen und daher stehen für diese Tests nur halbdisruptierte Stämme zur Verfügung, die immer noch Pmt2p-Aktivität aufweisen (Prill *et al.*, 2005). Dementsprechend sind soweit keine Zielproteine von Pmt2p in *C. albicans* bekannt. Das *N*-glykosylierte Pir1-Protein zeigte aber in dem *pmt2/ PMT2*-Stamm ein erhöhtes Laufverhalten (Prill *et al.*, 2005). Pir1p aus dem Rohextrakt des halbdisruptierten Stammes *pmt2/ PMT2* wies auf dem SDS-Gel einen *N*-glykosylierten Protein-„Schmier“ auf, der etwas niedriger lief, als bei den anderen *pmt*-Mutanten. Pir1p ist ein Zielprotein von Pmt1p, wird aber an einer Stelle *N*-glykosyliert, wie nach Abspaltung der *N*-Glykosylkette durch PNGaseF bewiesen wurde (Prill *et al.*, 2005). Vielleicht wird Alg9 in der *pmt2/ PMT2*-Mutante auf Grund der fehlenden Proteinaktivität unterglykosyliert und ist demzufolge inaktiv oder wird schneller abgebaut. Aufgrund dessen würden dem *N*-glykosidischen Zuckerbaum mindestens zwei Mannosereste fehlen und die folgende Kettenverlängerung könnte ebenfalls betroffen sein. In einer *alg9*-Deletionsmutante der Bäckerhefe konnte ein solch verändertes Laufverhalten schon für einzelne Proteine gezeigt werden (Burda *et al.*, 1996).

Möglicherweise beeinflusst die Alg9p-Interaktion auch die Pmt2p-Aktivität. Daher sollte die eventuelle *O*-Glykosylierung von Zielproteinen in *alg9*-Deletionsstämmen getestet werden. Aufgrund der hier nachgewiesenen Interaktion von Pmt1p und Pmt2p in *C. albicans* ist es nicht ausgeschlossen, dass Zielproteine, die von dem Pmt1/ Pmt2-Heterodimere *O*-glykosyliert werden, von einer Deletion des Alg9 betroffen werden.

4.2.3 Arbeiten die Mannosyltransferasen zusammen?

Da die Interaktion zwischen Pmt2p und Alg9p, Pmt2p und Pmt2p, sowie zwischen Pmt2p und Pmt1p durch Koimmunopräzipitationen verifiziert werden konnten, spricht Einiges für eine stärkere Verbindung dieser Proteine als eine reine Enzym-Substrat-Bindung. Für andere Glykosyltransferasen konnte gezeigt werden, dass die Kooperation zwischen den einzelnen Proteinen eine Aktivitätssteigerung bewirken kann, so z. B. für die Hamster UDP-GlcNAc:Dolichol-P GlcNAc-1-P Transferase (GPT), die Homomere ausbildet (Dan und Lehrman, 1997) oder die beiden Mannosyltransferase-Komplexe im Golgi-Apparat von *S. cerevisiae*, die aus mehreren unterschiedlichen Mannosyltransferasen bestehen (Jungmann und Munro, 1998; Stolz und Munro, 2002).

Pmt1p, Pmt2p und Alg9p benötigen alle drei Dolichyl-Phosphat-Mannose als Substrat. Vielleicht gehen diese Proteine eine Verbindung ein, um den Mannose-Donor effizienter zu nutzen. Eine Vorstellung dabei wäre z. B., dass ein Dolichyl-Phosphat-Mannose-Molekül von zwei oder sogar mehr Transferasen eingeschlossen wird, damit der Mannoserest übertragen werden kann (Abb.

4.4). Diese Theorie würde auch eine alternative Funktion der Homodimer-Bildung von Pmt2p, Pmt4p und Pmt6p liefern. Vielleicht ist es für ein einzelnes Transferase-Protein gar nicht möglich, den Zuckerdonor so lange zu binden, bis der Mannoserest übertragen wurde.

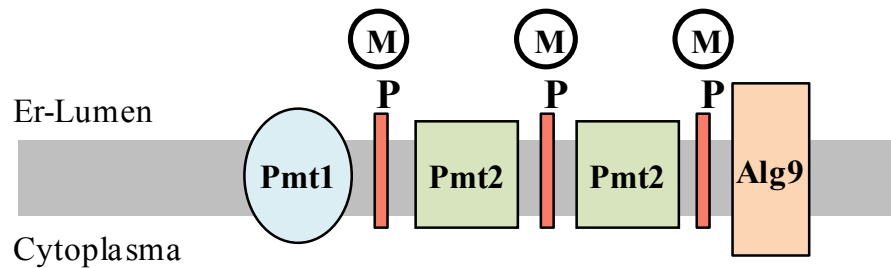


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des theoretischen Zusammenwirkens komplex-bildender Mannosyltransferasen

In dieser Darstellung sind die drei potentiell komplex-bildenden Mannosyltransferasen mit eingeschlossenen Dolichyl-Phosphat-Mannose Molekülen gezeigt.

5 Zusammenfassung

Die Initialreaktion der *O*-Glykosylierung sekretorischer Proteine an Serin- oder Threonin-Resten wird bei Pilzen durch die Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) katalysiert. In dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* wurden fünf Pmt-Isoformen (Pmt1, 2, 4, 5 und 6) charakterisiert, die essentiell für die Pathogenität des Pilzes sind. Da Pmt-Proteine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und höheren Eukaryoten Homo- und Heterodimere ausbilden, wurde in dieser Arbeit mit genetischen und biochemischen Methoden untersucht, ob *C. albicans* Pmt-Proteine ähnliche Dimere ausbilden, sowie weitere Proteinkomplexe mit anderen Interaktionspartnern eingehen.

Das Split-Ubiquitin System in Hefe erlaubt eine genetische Interaktionsanalyse von Membranproteinen. Vollängen- und Kurzformen der Pmt-Isoformen wurden an Ubiquitin-Hälften (Nub, Cub) fusioniert und untereinander auf ihre Interaktion überprüft. Hierdurch konnten Homodimere der Pmt2-, Pmt4- und Pmt6-Isoformen nachgewiesen werden. Die Bildung der homodimeren Komplexe aus Pmt2p und Pmt6p war unerwartet, da diese bei der Hefe *S. cerevisiae* nicht auftritt. Das Homodimer von Pmt6p aus *C. albicans* ließ sich durch den Austausch eines hoch konservierten Arginins (R178) erheblich schwächen, während die Deletion der katalytischen Domäne keine Auswirkungen auf der Pmt6-Pmt6-Interaktion hatte.

Zum biochemischen Nachweis von Pmt-Interaktionen wurden *C. albicans*-Stämme konstruiert, die Pmt1p- und Pmt2p-Fusionen an verschiedene Antigen-Epitope enthalten. Zunächst wurde nachgewiesen, dass Epitop-Fusionen zumindest teilweise funktionell sind und ihre perinukleäre Lokalisation bestätigte die erwartete ER-Membranständigkeit. Durch paarweise Epitop-Markierungen der Pmt-Proteine und Koimmunopräzipitation konnte anschließend das Homodimer aus Pmt2p-Monomeren bestätigt werden, zusätzlich aber auch eine Interaktion zwischen Pmt1p und Pmt2p. Der fehlende Nachweis dieses Heterodimers im Split-Ubiquitin-System kann möglicherweise durch sterische Gründe oder das Fehlen der C-terminalen Pmt-Region erklärt werden.

Auf Grundlage des Split-Ubiquitin Systems wurde nach noch unbekanntem Interaktionspartnern der Pmt6-Isoform gesucht. Hierfür wurde zunächst eine *C. albicans* genomische Bank in einem Nub-Vektor konstruiert, die dann auf die Interaktion mit einer Pmt6-Cub-Köderfusion untersucht wurde. Das Screening ergab mehrere Interaktoren, unter anderem wie erwartet Pmt6p. Zusätzlich wurde mehrfach ein durch die Bankkonstruktion entstandenes, künstliches Protein identifiziert, das spezifisch mit Pmt6p interagiert. Überraschend wurde durch das Screening auch eine spezifische Interaktion zwischen der Pmt2-Isoform und dem Alg9-Protein nachgewiesen, welche eine Mannosyltransferase für die Reifung von *N*-Glykosylketten darstellt. Die Pmt2-Alg9-Interaktion wurde durch Koimmunopräzipitation verifiziert. Die Interaktion von Pmt2p mit Alg9p ist ein erster Hinweis auf eine funktionelle Verbindung zwischen *N*- und *O*-Proteinglykosylierung in Eukaryonten.

6 Summary

The initial reaction of the *O*-glycosylation of secretory proteins in fungi is catalysed by the protein-*O*-mannosyltransferases (Pmt proteins). In the human pathogenic fungus *Candida albicans* five Pmt isoforms have been characterized (Pmt1, 2, 4, 5 and 6), which are essential for its virulence. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and higher eukaryotes Pmt proteins form homo- and heterodimers. In this thesis dimer formation of the Pmt isoforms in *C. albicans* was investigated by genetic and biochemical methods. In addition complex formation of the Pmt proteins with other, novel interaction partners was investigated.

The split-ubiquitin system in yeast is useful for genetic interaction analyses of membrane proteins. A full length protein as well as a short version of the Pmt isoforms were fused to the ubiquitin halves (Nub and Cub) and these fusion proteins were tested for interactions. Using this method homodimer formation of the Pmt2, Pmt4 and Pmt6 isoforms was established. Formation of the homodimeric complex of Pmt2p and Pmt6p was unexpected, because this had not been observed in the yeast *S. cerevisiae*. The homodimer formation of Pmt6p in *C. albicans* was weakened after exchanging a highly conserved arginine residue (R179), while the deletion of the catalytic domain of Pmt6p had no effect on the Pmt6-Pmt6 interaction.

In a biochemical approach *C. albicans* strains were constructed containing different antigen-epitops fused to Pmt1p and Pmt2p. These fusion proteins were at least partially functional and their perinuclear localization confirmed the expected localisation in the ER-membrane. By co-immunoprecipitation the homodimer formation of Pmt2p was verified. In addition, heterodimer formation of Pmt1p and Pmt2p was established. The absence of this heterodimer formation in the split-ubiquitin system can possibly be explained by steric hindrance or by lack of the C-terminal region of Pmt proteins.

Using the split-ubiquitin system the genome of *C. albicans* was screened for further interaction partners of Pmt6p. For this purpose a genomic library was constructed into a Nub-vector and the Pmt6 Cub-vector was used as a bait plasmid. The screening revealed several of interactor proteins including Pmt6p as expected. Repeatedly, a small artificial protein originating from the bank construction was identified, which interacted specifically with Pmt6p. Surprisingly, the screening also revealed an interaction between Pmt2p and Alg9p, which was confirmed by co-immunoprecipitation. Alg9p is involved in *N*-glycosylation and its interaction with Pmt2p is a first hint for a functional linkage of protein *O*- and *N*-glycosylation.

7 Literaturverzeichnis

Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E. C., Häusler, A., Moremen, K., Hirschberg, C. B. und Robbins, P. W. (1993). Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **122**, 307-323

Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Nakajima, A., Kawakita, M. und Endo, T. (2006). Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **281**, 19339-19345

Apweiler, R., Hermjakob, H. und Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4-8

Arroyo-Florres, B. L., Calvo-Méndez, C., Flores-Carreón, A. und López-Romero E. (2004). Partial purification of a mannosyl transferase involved in O-linked mannosylation of glycoproteins in *Candida albicans*. *Anton. Leeuw. Int. J.* **85**, 199-207

Bause, E. und Lehle, L. (1979). Enzymatic N-glycosylation and O-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast. *Eur. J. Biochem.* **101**, 531-540

Beltrán-Valero de Bernabé, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., van Beusekom, E., van der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., Cormand, C., Lehejoski, A.-E., Cruces, J., Voit, T., Walsh, C. A., van Bokhoven, H. und Brunner, H. G. (2002). Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1033-1043

Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow N. A. und Odds F. C. (2004). Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eucaryot. Cell* **3**, 900-909

Burda, P., Te Heesen, S., Brachat, A., Wach, A., Dusterhoft, A. und Aebi, M. (1996). Stepwise assembly of the lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the *ALG9* gene encoding a putative mannosyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7160-7165

Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J. P., Odds, F. C. und Gow, N. A. R. (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7670-7675

Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M. und Sudbery, P. E. (1999). The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**, 792-798

Colley, K. J. und Baenziger, J. U. (1987). Identification of the post-translational modifications of the core-specific lectin. The core-specific lectin contains hydroxyproline, hydroxylysine, and glucosylgalactosylhydroxylysine residues. *J. Biol. Chem.* **262**, 10290-10295

Corfield, A. P. und Shukla, A. K. (2004). Mucins: vital components of the mucosal defensive barrier. *Genomic/Proteomic Technol.* **3**, 20-22

Cozzone, A. J. (1998). Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie* **80**, 43-48

Dan, N. und Lehrman, M. A. (1997). Oligomerization of hamster UDP-GlcNAc:dolichol-P GlcNAc-1-P transferase, an enzyme with multiple transmembrane spans. *J. Biol. Chem.* **272**, 14214-14219

- de Beer, T., Vliegthart, J. F., Löffler, A. und Hofsteenge, J.** (1995). The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alpha-mannopyranose. *Biochemistry* **34**, 11785-11789
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A. und Schekman, R.** (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**, 806-808
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. und Elledge, S. J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes. Dev.* **7**, 555-569
- Ecker, M., Mrsä, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. und Tanner, W.** (2003). O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep.* **4**, 628-632
- Endo T.** (1999). O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**, 273-246
- Ernst, J. F.** (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**, 1763-1774
- Ernst, J. F. und Prill, S. K.-H.** (2001). O-Glycosylation. *Med. Mycol.* **39**, 67-74
- Fonzi, W. A. und Irwin, M. Y.** (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G. und Edwards, J. E. Jr.** (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the *EFG1* filamentation pathway. *Mol. Microbiol.* **44**, 61-72
- Fukuda, H., Sano, N., Muto, S. und Horikoshi, M.** (2006). Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Funct. Genomic Proteomic* **3**, 190-208
- Gemmill, T. R. und Trimble, R. B.** (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 227-237
- Gentsch, M., Immervoll, T. und Tanner, W.** (1995). Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein O-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Lett.* **377**, 128-130.
- Gentsch, M. und Tanner, W.** (1996). The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* **15**, 5752-5759
- Gentsch, M. und Tanner, W.** (1997). Protein-O-Glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**, 481-486
- Girrbach, V. und Strahl, S.** (2003). Members of the evolutionarily conserved *PMT* family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J. Biol. Chem.* **278**, 12554-12562
- Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. und Strahl-Bolsinger, S.** (2000). Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J. Biol. Chem.* **275**, 19288-19296
- Goins, T. L. und Cutler, J. E.** (2000). Relative abundance of oligosaccharides in *Candida* species as determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2862-2869
- Golden, N. J. und Acheson, D. W.** (2002). Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* **70**, 1761-1771

- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. und Seto, E.** (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15-23
- Goto, M.** (2007). Protein O-Glycosylation in Fungi: Diverse Structures and Multiple Functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1415-1427
- Grahl, N.** (2006). Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Protein-O-Mannosyltransferasen in *Cryptococcus neoformans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Majam, G., Thibault, P. und Logan, S.** (2006). Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol.* **60**, 299-311.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. und Kelly, W.G.** (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 841-874
- Hartmann, S. und Hofsteenge, J.** (2000). Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *J. Biol. Chem.* **275**, 28569–28574
- Harty, C., Strahl, S. und Römisch, K.** (2001). O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1093-1101
- Haselbeck, A. und Tanner, W.** (1983). O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated at the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **158**, 335-338
- Helenius, J., Ng, D. T. W., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A. und Aebi, M.** (2002). Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**, 447-450
- Hochstrasser, M.** (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **84**, 813-815
- Hofsteenge, J., Müller, D. R., de Beer, T., Löffler, A., Richter, W. J. und Vliegthart, J. F.** (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* **33**, 13524-13530
- Hutzler, J., Schmid, M., Bernard, T., Henrissat, B. und Strahl, S.** (2007). Membrane association is a determinant for substrate recognition by *PMT4* protein O-mannosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7827-7832
- Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T. und Nishihara, S.** (2004). The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* *POMT1* and *POMT2* mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 42638-42647
- Immervoll, T., Gentzsch, M. und Tanner, W.** (1995). *PMT3* and *PMT4*, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1345-1351
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168
- James, P., Halladay, J. und Craig, E. A.** (1996). Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436
- Jarvis, W. R.** (1995). Epidemiology of nosokomial fungal infections, with emphasis on *Candida*-species. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 1526-1530

- Johnsson, N. und Varshavsky, A.** (1994a). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10340-4
- Johnsson, N. und Varshavsky, A.** (1994b). Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J.* **13**, 2686-98
- Jungmann, J. und Munro, S.** (1998). Multi-protein complexes in the *cis* Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *EMBO J.* **17**, 423-434.
- Jurado, L. A., Coloma, A. und Cruces, J.** (1999). Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein *O*-mannosyltransferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* **58**, 171-180
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. und Klis, F. M.** (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 373-383
- Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Müller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van den Ende, H. und Klis, F. M.** (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol. Microbiol.* **35**, 601-611
- Kieliszewski, M. J., O'Neill, M., Leykam, J. und Orlando, R.** (1995). Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline *O*-arabinylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 2541-2549
- Klis, F. M., De Groot, P., und Hellingwerf, K.** (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**, 1-8
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K. und Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239-256
- Kluge S.** (2006). Dom34p als Regulator der Protein-*O*-Mannosylierung bei *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kowarik, M., Young, N. M., Numao, S., Schulz, B. L., Hug, I., Callewaert, N., Mills, D.C., Watson, D. C., Hernandez, M., Kelly, J. F., Wacker, M. und Aebi, M.** (2006). Definition of the bacterial *N*-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J.* **25**, 1957-1966
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lagow, E., DeSouza, M. M. und Carson, D. D.** (1999). Mammalian reproductive tract mucins. *Hum. Reprod. Update* **5**, 280-292
- Lengeler, K. B., Tielker, D. und Ernst, J. F.** (2007). Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell. Mol. Life Sci.* **3**, (Vorabveröffentlichung im Internet)
- Liu, H., Köhler, J. und Fink, G. R.** (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723-1726
- Luria, S. E., Adams, J. N. und Ting, R. C.** (1960). Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* **12**, 348-390
- Lussier, M., Gentzsch, M., Sdicu, A. M., Bussey, H. und Tanner, W.** (1995). Protein *O*-glycosylation in yeast. The *PMT2* gene specifies a second protein *O*-mannosyltransferase that functions in addition to the *PMT1*-encoded activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 2770-2775

- Lussier, M., Sdicu, A.-M., Shahinian, S. und Bussey, H.** (1998). The *Candida albicans* *KRE9* gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9825-9830
- Lyalin, D., Koles, K., Roosendaal, S. D., Repnikova, E., Van Wechel, L. und Panin, V. M.** (2006). The twisted gene encodes *Drosophila* protein *O*-mannosyltransferase 2 and genetically interacts with the rotated abdomen gene encoding *Drosophila* protein *O*-mannosyltransferase 1. *Genetics* **172**, 343-353
- Mahne, M., Tauch, A., Puhler, A. und Kalinowski, J.** (2006). The *Corynebacterium glutamicum* gene *pmt* encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-*O*-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 226-233
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. und Sudarsanam, S.** (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 514-520
- Marriott, M. und Tanner, W.** (1979). Localization of dolichyl phosphate- and pyrophosphate-dependent glycosyl transfer reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **139**, 566-572
- Martín-Blanco, E. und García-Bellido, A.** (1996). Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6048-6052
- Martínez, A. I., Castillo, L., Garcerá, A., Elorza, M. V., Valentín, E. und Sentandreu, R.** (2004). Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology* **150**, 3151-3161
- Misselwitz, S.** (2007). Untersuchungen zu Interaktionen von *Pmt4* in *C. albicans*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Müller, H., Ziegler, B. und Schweizer, B.** (1993). UV/ VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik. *Biotechnol. Tech.* **4**, 25-29
- Mullis K.B. und Faloona F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350
- Noffz C. S.** (2007). Struktur-Funktionsanalyse des Transkriptionsfaktors Efg1p von *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J.L., Boles, E., Andre, B. und Frommer, W.B.** (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12242-7
- O'Donnell, N.** (2002). Intracellular glycosylation and development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**, 336-345
- Ohtsubo, K. und Marth, J. D.** (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855-867
- Oka, T., Hamaguchi, T., Sameshima, Y., Goto, M. und Furukawa, K.** (2004). Molecular characterization of protein *O*-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **150**, 1973-1982
- Olson, G. M., Fox, D. S., Wang, P., Alspaugh, J. A. und Buchanan, K. L.** (2007). Role of protein *O*-mannosyltransferase *Pmt4* in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **6**, 222-234

- Orlean, P.** (1990). Dolichol phosphate mannose synthase is required in vivo for glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring, *O* mannosylation, and *N* glycosylation of protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5796-5805
- Pfaller, M. A.** (1996). Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin. Infect. Dis.* **22**, S89-94
- Prill, S. K.-H., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C. A., Schroppel, K. und Ernst, J. F.** (2005). *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* **55**, 546-560
- Prill, S. K.-H.** (2004). Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-*O*- mannosyltransferase des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Proszynski, T. J., Simons, K. und Bagnat, M.** (2004). *O*-Glycosylation as a Sorting Determinant for Cell Surface Delivery in Yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1533-1543
- Reuß, O., Vik, A., Kolter, R. und Morschhäuser, J.** (2004). The *SATI* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119-127
- Reuter, G. und Gabius, H. J.** (1999). Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 368-422
- Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S. K.-H., Giasson, L. und Ernst, J. F.** (2005). Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect. Immun.* **73**, 4571-4580
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press NY*.
- Sanchez, A. A., Johnston, D. A., Myers, C., Edwards Jr., J. E., Mitchell, A. P. und Filler, S. G.** (2004). Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogeneously disseminated infection and endothelial cell damage in vitro. *Infect. Immun.* **72**, 598-601
- Santos, M. A. und Tuite, M. F.** (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1481-1486
- Schäffer, C. und Messner, P.** (2001). Glycobiology of surface layer proteins. *Biochimie* **83**, 591-599
- Schmidt, M. A., Riley, L. W. und Benz, I.** (2003). Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **11**, 554-560.
- Sentandreu, R. und Northcote, D. H.** (1969). Yeast cell-wall synthesis. *Biochem. J.* **115**, 231-240
- Sharma, C. B., Babczinski, P., Lehle, L. und Tanner, W.** (1974). The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **46**, 35-41.
- Smythe, C. und Cohen, P.** (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* **200**, 625-631
- Spiro, R. G.** (1969). Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens. *J. Biol. Chem.* **244**, 602-612
- Spiro, R. G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S.** (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5187-92
- Stolz, J. und Munro, S.** (2002). The components of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 44801-44808
- Strahl-Bolsinger, S. und Tanner, W.** (1991). Protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the dolichyl-phosphate-D-mannoseprotein *O*-D-mannosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **196**, 185-190
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. und Tanner, W.** (1993). *PMT1*, the gene for a key enzyme of protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8164-8168
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M. und Tanner, W.** (1999). Protein *O*-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 297-307
- Strahl-Bolsinger, S. und Scheinost, A.** (1999). Transmembrane Topology of Pmt1p, a Member of an Evolutionarily Conserved Family of Protein *O*-Mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **274**, 9068-9075
- Strahm, A., Amado, R. und Neukom, H.** (1981). Hydroxyproline-galactosides as proteinpolysaccharide linkages in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Phytochem.* **20**, 1061-1063
- Suckow, M. und Hollenberg, C. P.** (1998). The activation specificities of wild-type and mutant Gen4p *in vivo* can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **276**, 887-902
- Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J. und Guerry, P.** (1999). Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1022-1030
- Szymanski, C. M. und Wren, B. W.** (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 225-237
- Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C. und Takegawa, K.** (2005). Characterization of *O*-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 813-820
- Tanner, W. und Lehle, L.** (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 81-99
- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J. und Guerry, P.** (2001). Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem.* **276**, 34862-34870.
- Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K., und Ernst, J. F.** (1998). Multiple Functions of Pmt1p-mediated Protein *O*-Mannosylation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20837-20846
- Timpel, C., Zink, S., Strahl-Bolsinger, S., Schroppel, K. und Ernst, J. F.** (2000). Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**, 3063-3071
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
- Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M. und Uehara, Y.** (2002). Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. *Yeast* **19**, 611-618

- VanderVen, B. C., Harder, J. D., Crick, D. C. und Belisle, J. T.** (2005). Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* **309**, 941-943.
- Van Reeuwijk, J., Brunner, H. G. und van Bokhoven, H.** (2004). Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin. Genet.* **67**, 281-289
- Van Reeuwijk, J., Janssen, M., van den Elzen, C., Beltran-Valero de Bernabe, D., Sabatelli, P., Merlini, L., Boon, M., Scheffer, H., Brockington, M., Muntoni, F., Huynen, M. A., Verrips, A., Walsh, C. A., Barth, P. G., Brunner, H. G. und van Bokhoven, H.** (2005). POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker- Warburg syndrome. *J. Med. Genet.* **42**, 907-912
- Varshavsky, A.** (1997). The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 383-387
- Verger, A., Perdomo, J. und Crossley, M.** (2003). Modification with SUMO. *EMBO Rep.* **4**, 137-142
- Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P. G., Nita-Lazar, M., Haslam, S. M., North, S. J., Panico, M., Morris, H. R., Dell, A., Wren, B. W. und Aebi, M.** (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**, 1790-1793
- Weber, Y., Prill, S. K.-H. und Ernst, J. F.** (2004). Pmt-mediated O-glycosylation stabilizes an essential element of the secretory apparatus (Sec20p) in *Candida albicans*. *Eukar. Cell* **3**, 1164-1168
- Weber, Y.** (2001). Funktionen des Sec20-Proteins im Sekretionsweg des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Weerapana, E. und Imperiali, B.** (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**, 91R-101R
- Weston, A., Nassau, P. M., Henly, C. und Marriot, M. S.** (1993). Protein O-mannosylation in *Candida albicans*. Determination of the amino acid sequences of peptide acceptors for protein O-mannosyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **215**, 845-849
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. und Strahl, S.** (2002). Characterisation of *POMT2*, a novel member of the *PMT* protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* **12**, 771-783
- Willer, T., Valero, C.M., Tanner, W., Cruces, J. und Strahl, S.** (2003). O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **13**, 621-630
- Willer, T., Prados, B., Falcón-Pérez, J. M., Renner-Müller, I., Przemeck, G. K., Lommel, M., Coloma, A., Valero, M. C., de Angelis, M. H., Tanner, W., Wolf, E., Strahl, S. und Cruces, J.** (2004). Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14126-14131
- Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. und Strahl, S.** (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **57**, 156-170
- Willger, S.** (2007). Die Bedeutung der Protein-O-Mannosyltransferasen für die Virulenz von *Cryptococcus neoformans*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wilson, I. B. H., Gavel, Y. und Heijne, G.** (1991). Amino acid distribution around O-linked glycosylation sites. *Biochem. J.* **275**, 529-534

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

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Dogerty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Sunith, S. S., Micheal, M. Z. und Graha, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17, 3469-3478

Zimmermann, F. K. (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 31, 71-86

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	mM	Millimolar
μ	mikro	MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
A	Adenin	mRNA	messenger RNA
Abb.	Abbildung	OD _x	optische Dichte bei λ = x nm
Amp	Ampicillin	oNPG	o-Nitrophenyl β-D-Galactopyranosid
AP	Alkalische Phosphatase	ORF	offener Leserahmen
ARS	Autonom replizierende Sequenz	PAA	Polyacrylamid
AS	Aminosäure	PBS	Phosphate buffered saline
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	PCR	'polymerase chain reaction'
b (bp)	Basen (Basenpaare)	PEG	Polyethylenglycol
bidest.	bidestilliert	pers.	persönlich
BSA	Rinderserumalbumin	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
bzw.	beziehungsweise	PKA	ProteinkinaseA
ca.	circa	POD	Peroxidase
C	Cytosin	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
C. albicans	Candida albicans	RNA	Ribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	RNase	Ribonuklease
DMF	Dimethylformamid	RT	Raumtemperatur
DMSO	Demethylsulfoxid	SAT1	Gen für Streptothricin-Acetyl-Transferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunde
dNTP	Desoxinukleotid	S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
DTT	1,4-Dithiothreitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
E. coli	Escherichia coli	T	Thymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tab.	Tabelle
ER	endoplasmatisches Retikulum	TAE	Tris-Acetat-EDTA
g	Gramm	TBE	Tris-Borat-EDTA
G	Guanin	TE	Tris-EDTA
h	Stunde	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
HA	Hämagglutinin	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-	u	units
IP	Immunpräzipitation	u.a.	unter anderem
k.A.	keine Angabe	ÜN	über Nacht
kb	Kilobasenpaare	Upm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton	vgl.	vergleiche
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
M	Molar	YNB	Yeast nitrogen base
mA	Milliampere	YPD	Yeast extract-Pepton-Dextrose (Vollmedium)
MCS	multiple cloning site	wt	Wildtyp
min	Minuten	z. B.	zum Beispiel
ml	Milliliter		

9 Anhang

9.1 Rohdaten der LacZ-Flüssigkeitests

9.1.1 C-terminale PmtNub-Fusionen

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt1+NubG	1,68	30	0,013	0,012	0,3	0,2
CubPmt1+NubWt	1,54	10	0,105	0,11	6,8	7,1
CubPmt1+Pmt1Nuba	2,31	30	0,009	0,013	0,1	0,2
CubPmt1+Pmt1Nubb	1,55	30	0,014	0,013	0,3	0,3
CubPmt1+Pmt1Nubc	1,86	30	0,017	0,012	0,3	0,2
CubPmt1+Pmt2Nuba	2,03	30	0,012	0,017	0,2	0,3
CubPmt1+Pmt2Nubb	2,19	30	0,015	0,013	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt2Nubc	1,52	30	0,014	0,012	0,3	0,3
CubPmt1+Pmt4Nuba	1,66	30	0,008	0,01	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt4Nubb	2,09	30	0,011	0,012	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt4Nubc	1,74	30	0,018	0,015	0,3	0,3
CubPmt1+Pmt5Nuba	1,87	30	0,01	0,013	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt5Nubb	1,96	30	0,013	0,012	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt5Nubc	2,34	30	0,018	0,015	0,3	0,2
CubPmt1+Pmt6Nuba	2,12	30	0,008	0,01	0,1	0,2
CubPmt1+Pmt6Nubb	2,01	30	0,011	0,012	0,2	0,2
CubPmt1+Pmt6Nubc	1,78	30	0,008	0,01	0,1	0,2

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt2+2230	2,14	30	0,014	0,016	0,2	0,2
CubPmt2+wt	1,25	5	0,08	0,076	12,8	12,2
CubPmt2+NubPmt1a	1,64	30	0,011	0,017	0,2	0,3
CubPmt2+NubPmt1b	2,05	30	0,014	0,012	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt1c	1,63	30	0,01	0,012	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt2-2a	1,66	30	0,032	0,029	0,6	0,6
CubPmt2+NubPmt2-2b	1,45	30	0,021	0,022	0,5	0,5
CubPmt2+NubPmt2-2c	1,92	30	0,024	0,023	0,4	0,4
CubPmt2+NubPmt4a	2,13	30	0,013	0,014	0,2	0,2

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt2+NubPmt4b	3,09	30	0,01	0,012	0,1	0,1
CubPmt2+NubPmt4c	1,93	30	0,012	0,013	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt5a	1,87	30	0,011	0,01	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt5b	1,65	30	0,012	0,01	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt5c	1,92	30	0,013	0,014	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt6a	1,74	30	0,011	0,01	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt6b	1,79	30	0,009	0,012	0,2	0,2
CubPmt2+NubPmt6c	2,21	30	0,015	0,017	0,2	0,3

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt4+Nub1a	1,32	30	0,011	0,013	0,3	0,3
CubPmt4+Nub1b	1,82	30	0,013	0,013	0,2	0,2
CubPmt4+Nub1c	1,95	30	0,024	0,018	0,4	0,3
CubPmt4+Nub2a	1,64	30	0,013	0,014	0,3	0,3
CubPmt4+Nub2b	1,51	30	0,011	0,013	0,2	0,3
CubPmt4+Nub2c	2,1	30	0,016	0,019	0,3	0,3
CubPmt4+Nub4a	1,65	30	0,112	0,114	2,3	2,3
CubPmt4+Nub4b	0,83	30	0,065	0,078	2,6	3,1
CubPmt4+Nub4c	0,3	30	0,019	0,019	2,1	2,1
CubPmt4+Nub4d	1,13	30	0,092	0,105	2,7	3,1
CubPmt4+Nub5a	0,68	30	0,009	0,012	0,4	0,6
CubPmt4+Nub5b	0,88	30	0,01	0,012	0,4	0,5
CubPmt4+Nub5c	0,99	30	0,012	0,012	0,4	0,4
CubPmt4+Nub6a	1,63	30	0,015	0,016	0,3	0,3
CubPmt4+Nub6b	2	30	0,018	0,025	0,3	0,4
CubPmt4+Nub6c	2,45	30	0,028	0,041	0,4	0,6
CubPmt4+NubWT1	2	5	0,451	0,451	45,1	45,1
CubPmt4+NubWT2	2	11	0,89	0,89	40,5	40,5
CubPmt4+2230	1,23	30	0,017	0,014	0,5	0,4

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt5+NubG	2,1	30	0,014	0,012	0,2	0,2
CubPmt5+NubWt	1,46	10	0,167	0,179	11,4	12,3
CubPmt5+Pmt1Nuba	2,21	30	0,013	0,013	0,2	0,2
CubPmt5+Pmt1Nubb	1,76	30	0,014	0,013	0,3	0,2

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt5+Pmt1Nubc	1,86	30	0,017	0,012	0,3	0,2
CubPmt5+Pmt2Nuba	1,8	30	0,012	0,017	0,2	0,3
CubPmt5+Pmt2Nubb	1,3	30	0,011	0,013	0,3	0,3
CubPmt5+Pmt2Nubc	1,52	30	0,014	0,012	0,3	0,3
CubPmt5+Pmt4Nuba	2,34	30	0,023	0,021	0,3	0,3
CubPmt5+Pmt4Nubb	1,92	30	0,011	0,012	0,2	0,2
CubPmt5+Pmt4Nubc	2,52	30	0,018	0,015	0,2	0,2
CubPmt5+Pmt5Nuba	1,87	30	0,01	0,013	0,2	0,2
CubPmt5+Pmt5Nubb	1,54	30	0,013	0,012	0,3	0,3
CubPmt5+Pmt5Nubc	2,36	30	0,018	0,015	0,3	0,2
CubPmt5+Pmt6Nuba	2,12	30	0,017	0,014	0,3	0,2
CubPmt5+Pmt6Nubb	1,76	30	0,011	0,012	0,2	0,2
CubPmt5+Pmt6Nubc	2,43	30	0,021	0,019	0,3	0,3

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt6c+2229Pmt1a	1,7	30	0,027	0,02	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt1b	1,7	30	0,022	0,018	0,4	0,4
CubPmt6c+2229Pmt1c	1,88	30	0,026	0,021	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt1d	1,71	30	0,024	0,021	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt2a	1,08	30	0,022	0,017	0,7	0,5
CubPmt6c+2229Pmt2b	1,59	30	0,024	0,017	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt2c	1,87	30	0,031	0,028	0,6	0,5
CubPmt6c+2229Pmt2d	1,42	30	0,024	0,017	0,6	0,4
CubPmt6c+2229Pmt4a	1,78	30	0,027	0,021	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt4b	1,84	30	0,029	0,02	0,5	0,4
CubPmt6c+2229Pmt4c	1	30	0,025	0,02	0,8	0,7
CubPmt6c+2229Pmt4d	1	30	0,036	0,017	1,2	0,6
CubPmt6c+2229Pmt5a	1	30	0,027	0,02	0,9	0,7
CubPmt6c+2229Pmt5b	1,34	30	0,025	0,021	0,6	0,5
CubPmt6c+2229Pmt5c	1,9	30	0,032	0,029	0,6	0,5
CubPmt6c+2229Pmt5d	1	30	0,037	0,028	1,2	0,9
CubPmt6c+2229Pmt6a	1	30	0,055	0,045	1,8	1,5
CubPmt6c+2229Pmt6b	1	30	0,055	0,051	1,8	1,7
CubPmt6c+2229Pmt6c	1	30	0,168	0,163	5,6	5,4
CubPmt6c+2229Pmt6d	1	30	0,062	0,049	2,1	1,6

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt6c+NubWT	2,81	5	0,8	0,696	56,9	49,5
CubPmt6c+2230	2,96	30	0,042	0,026	0,5	0,3

9.1.2 N-terminale NubPmt-Fusionen

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt1+NubWT	2,42	10	0,221	0,229	9,1	9,5
CubPmt1+2230	2,17	30	0,018	0,019	0,3	0,3
CubPmt1+NubPmt1suA	2	30	0,107	0,107	1,8	1,8
CubPmt1+NubPmt1suB	2,28	30	0,051	0,051	0,7	0,7
CubPmt1+NubPmt1suC	1,49	30	0,044	0,049	1,0	1,1
CubPmt1+NubPmt1suD	1,77	30	0,026	0,024	0,5	0,5
CubPmt1+NubPmt1suD	3,29	30	0,072	0,069	0,7	0,7
CubPmt1+NubPmt1IA	2,35	30	0,168	0,165	2,4	2,3
CubPmt1+NubPmt1IB	1,8	30	0,026	0,024	0,5	0,4
CubPmt1+NubPmt2suA	1,95	30	0,049	0,051	0,8	0,9
CubPmt1+NubPmt2suB	1,57	30	0,055	0,057	1,2	1,2
CubPmt1+NubPmt2suC	1,46	30	0,039	0,04	0,9	0,9
CubPmt1+NubPmt2suD	1,82	30	0,052	0,053	1,0	1,0
CubPmt1+NubPmt2IA	2,24	30	0,149	0,166	2,2	2,5
CubPmt1+NubPmt2IB	0,52	30	0,03	0,037	1,9	2,4
CubPmt1+NubPmt2IC	1,38	30	0,132	0,14	3,2	3,4
CubPmt1+NubPmt2ID	2,05	30	0,176	0,209	2,9	3,4
CubPmt1+NubWT	3,18	13	0,19	0,187	4,6	4,5
CubPmt1+2230	3,25	30	0,037	0,036	0,4	0,4
CubPmt1+NubPmt4suA	2,97	30	0,071	0,071	0,8	0,8
CubPmt1+NubPmt4suB	1,79	30	0,025	0,027	0,5	0,5
CubPmt1+NubPmt4IA	2,21	30	0,048	0,05	0,7	0,8
CubPmt1+NubPmt4IB	2,24	30	0,068	0,067	1,0	1,0
CubPmt1+NubPmt4IC	3	30	0,038	0,036	0,4	0,4
CubPmt1+NubPmt4ID	2,62	30	0,04	0,044	0,5	0,6
CubPmt1+NubPmt4IE	2,87	30	0,05	0,061	0,6	0,7
CubPmt1+NubPmt5suA	3,52	30	0,042	0,047	0,4	0,4
CubPmt1+NubPmt5IA	2,41	30	0,06	0,063	0,8	0,9

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt1+NubPmt51B	2,23	30	0,1	0,112	1,5	1,7
CubPmt1+NubPmt51C	3,07	30	0,063	0,068	0,7	0,7
CubPmt1+NubPmt51D	2,76	30	0,052	0,051	0,6	0,6
CubPmt1+NubPmt6suA	2,63	30	0,065	0,059	0,8	0,7
CubPmt1+NubPmt6suB	2,9	30	0,043	0,044	0,5	0,5
CubPmt1+NubPmt61A	2,56	30	0,066	0,066	0,9	0,9
CubPmt1+NubPmt61B	2,47	30	0,08	0,083	1,1	1,1
CubPmt1+NubPmt61C	2,16	30	0,08	0,083	1,2	1,3
CubPmt1+NubPmt61D	1,77	30	0,022	0,024	0,4	0,5
CubPmt1+NubPmt61E	2,56	30	0,093	0,098	1,2	1,3

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt2+2230	0,97	30	0,02	0,018	0,68728522	0,6185567
CubPmt2+NubWT	2,01	8	0,155	0,164	9,63930348	10,199005
CubPmt2+Nub4su-1	1,91	8	0,16	0,17	10,4712042	11,1256545
CubPmt2+Nub4su-4	2,19	30	0,026	0,028	0,3957382	0,4261796
CubPmt2+Nub41-1	1,85	12	0,114	0,12	5,13513514	5,40540541
CubPmt2+Nub41-2	0,62	30	0,064	0,065	3,44086022	3,49462366
CubPmt2+Nub413	2,09	8	0,087	0,083	5,20334928	4,96411483
CubPmt2+Nub41-4	1,78	8	0,104	0,115	7,30337079	8,0758427
CubPmt2+Nub41-5	1,75	12	0,104	0,115	4,95238095	5,47619048
CubPmt2+2230	1,27	30	0,019	0,018	0,5	0,5
CubPmt2+NubWT	0,75	8	0,076	0,078	12,7	13,0
CubPmt2+NubPmt5su3	1,97	30	0,077	0,086	1,3	1,5
CubPmt2+NubPmt511	1,63	8	0,107	0,125	8,2	9,6
CubPmt2+NubPmt513	1,87	8	0,104	0,11	7,0	7,4
CubPmt2+NubPmt514	1,92	8	0,125	0,126	8,1	8,2
CubPmt2+NubPmt515	1,64	8	0,101	0,111	7,7	8,5
CubPmt2+2230	1,4	30	0,024	0,025	0,6	0,6
CubPmt2+NubWT	3,26	5	0,5	0,521	30,7	32,0
CubPmt2+NubPmt6su1	2,34	10	0,118	0,114	5,0	4,9
CubPmt2+NubPmt6su3	2,69	30	0,096	0,093	1,2	1,2
CubPmt2+NubPmt611	2,16	10	0,084	0,083	3,9	3,8

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt2+NubPmt612	1,68	10	0,089	0,094	5,3	5,6
CubPmt2+NubPmt613	2,24	10	0,138	0,133	6,2	5,9
CubPmt2+NubPmt614	0,5	30	0,024	0,024	1,6	1,6
CubPmt2+NubPmt615	2,16	10	0,125	0,111	5,8	5,1
CubPmt2+2230	0,85	28	0,028	0,028	1,2	1,2
CubPmt2+NubWT	3,7	5	0,522	0,544	28,2	29,4
CubPmt2+NubPmt2su1	3,57	5	0,255	0,258	14,3	14,5
CubPmt2+NubPmt2su2	2,46	5	0,438	0,439	35,6	35,7
CubPmt2+NubPmt2su4	2,91	5	0,35	0,351	24,1	24,1
CubPmt2+NubPmt2su5	2,82	5	0,267	0,306	18,9	21,7
CubPmt2+NubPmt212	2,15	5	0,279	0,291	26,0	27,1
CubPmt2+NubPmt213	2,43	5	0,281	0,302	23,1	24,9
CubPmt2+NubPmt214	2,74	5	0,237	0,249	17,3	18,2
CubPmt2+NubPmt215	2,7	5	0,24	0,233	17,8	17,3
CubPmt2+NubWT	0,66	20	0,015		1,1	
CubPmt2+2230	2,36	6	0,15		10,6	
CubPmt2+Nub1su-1	2,13	20	0,173		4,1	
CubPmt2+Nub1su-2	1,56	20	0,084		2,7	
CubPmt2+Nub1su-3	1,82	20	0,181		5,0	
CubPmt2+Nub1su-4	1,74	20	0,065		1,9	
CubPmt2+Nub1su-5	1,44	20	0,085		3,0	
CubPmt2+Nub11-2	1,86	20	0,196		5,3	
CubPmt2+Nub11-4	1,14	20	0,028		1,2	

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt4+2230	1,25	30	0,018	0,022	0,5	0,6
CubPmt4+NubWT	1,95	8	0,081	0,087	5,2	5,6
CubPmt4+NubPmt5su3	1,68	30	0,035	0,04	0,7	0,8
CubPmt4+NubPmt511	1,89	8	0,059	0,062	3,9	4,1
CubPmt4+NubPmt513	1,99	8	0,07	0,063	4,4	4,0
CubPmt4+NubPmt514	1,44	30	0,078	0,087	1,8	2,0
CubPmt4+NubPmt515	1,44	30	0,043	0,045	1,0	1,0
CubPmt4+NubPmt2su1	2,12	12	0,213	0,205	8,4	8,1

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt4+NubPmt2su2	1,12	12	0,119	0,114	8,9	8,5
CubPmt4+NubPmt2su4	0,96	12	0,066	0,07	5,7	6,1
CubPmt4+NubPmt2su5	2,12	12	0,181	0,159	7,1	6,3
CubPmt4+NubPmt2l2	0,75	12	0,086	0,089	9,6	9,9
CubPmt4+NubPmt2l3	1,93	12	0,472	0,44	20,4	19,0
CubPmt4+NubPmt2l4	1,89	12	0,233	0,219	10,3	9,7
CubPmt4+NubPmt2l5	1,93	12	0,207	0,209	8,9	9,0
CubPmt4+2230	1,64	30	0,022	0,022	0,4	0,4
CubPmt4+NubWT	2,83	10	0,12	0,105	4,2	3,7
CubPmt4+NubPmt6su1	2,51	10	0,07	0,086	2,8	3,4
CubPmt4+NubPmt6su3	2,51	15	0,047	0,053	1,2	1,4
CubPmt4+NubPmt6l1	2,3	15	0,069	0,069	2,0	2,0
CubPmt4+NubPmt6l2	2,21	15	0,074	0,075	2,2	2,3
CubPmt4+NubPmt6l3	1,72	15	0,073	0,075	2,8	2,9
CubPmt4+NubPmt6l4	0,55	15	0,018	0,018	2,2	2,2
CubPmt4+NubPmt6l5	2,03	10	0,106	0,096	5,2	4,7
CubPmt4+2230	0,93	20	0,016		0,9	
CubPmt4+NubWT	1,8	6	0,17		15,7	
CubPmt4+Nub1su-1	1,7	20	0,136		4,0	
CubPmt4+Nub1su-2	2,09	20	0,159		3,8	
CubPmt4+Nub1su-3	1,77	20	0,166		4,7	
CubPmt4+Nub1su-4	1,85	20	0,064		1,7	
CubPmt4+Nub1su-5	2,27	20	0,116		2,6	
CubPmt4+Nub1l-2	1,93	20	0,105		2,7	
CubPmt4+Nub1l-4	1,87	20	0,082		2,2	
CubPmt4+2230	1,56	30	0,026	0,028	0,6	0,6
CubPmt4+NubWT	1,91	8	0,124	0,139	8,1	9,1
CubPmt4+Nub4su-1	1,49	8	0,101	0,107	8,5	9,0
CubPmt4+Nub4su-4	1,27	30	0,025	0,027	0,7	0,7
CubPmt4+Nub4l-1	1,06	12	0,094	0,101	7,4	7,9
CubPmt4+Nub4l-2	1,22	12	0,13	0,133	8,9	9,1
CubPmt4+Nub4l-3	0,53	30	0,102	0,107	6,4	6,7
CubPmt4+Nub4l-4	0,62	30	0,082	0,081	4,4	4,4

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt4+Nub41-5	0,92	30	0,172	0,174	6,2	6,3

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt5+2230	1,55	30	0,032	0,029	0,7	0,6
CubPmt5+NubWT	2,88	16	0,126	0,115	2,7	2,5
CubPmt5+Nub1su-1	1,86	30	0,032	0,035	0,6	0,6
CubPmt5+Nub1su-2	2,87	30	0,067	0,069	0,8	0,8
CubPmt5+Nub1su-3	2,31	30	0,076	0,083	1,1	1,2
CubPmt5+Nub1su-4	2,26	30	0,048	0,054	0,7	0,8
CubPmt5+Nub1su-5	2,4	30	0,076	0,073	1,1	1,0
CubPmt5+Nub11-2	1,92	30	0,045	0,047	0,8	0,8
CubPmt5+Nub11-4	2,04	30	0,045	0,047	0,7	0,8
CubPmt5+2230	0,75	30	0,02	0,019	0,9	0,8
CubPmt5+NubWT	1,87	15	0,089	0,084	3,2	3,0
CubPmt5+NubPmt6su1	1,83	15	0,069	0,075	2,5	2,7
CubPmt5+NubPmt6su3	2,13	15	0,044	0,044	1,4	1,4
CubPmt5+NubPmt611	1,68	15	0,062	0,06	2,5	2,4
CubPmt5+NubPmt612	1,71	15	0,158	0,149	6,2	5,8
CubPmt5+NubPmt613	1,62	15	0,152	0,141	6,3	5,8
CubPmt5+NubPmt614	1,44	15	0,06	0,055	2,8	2,5
CubPmt5+NubPmt615	1,77	15	0,137	0,153	5,2	5,8
CubPmt5+2230	1,14	30	0,018	0,021	0,5	0,6
CubPmt5+NubWT	1,78	9	0,289	0,327	18,0	20,4
CubPmt5+NubPmt2su1	1,51	30	0,141	0,173	3,1	3,8
CubPmt5+NubPmt2su2	0,84	30	0,141	0,173	5,6	6,9
CubPmt5+NubPmt2su4	1,48	30	0,178	0,201	4,0	4,5
CubPmt5+NubPmt2su5	1,27	30	0,137	0,147	3,6	3,9
CubPmt5+NubPmt212	1,07	30	0,109	0,108	3,4	3,4
CubPmt5+NubPmt213	1,03	30	0,143	0,141	4,6	4,6
CubPmt5+NubPmt214	1,33	30	0,155	0,164	3,9	4,1
CubPmt5+NubPmt215	1,32	30	0,078	0,073	2,0	1,8
CubPmt5+2230	0,83	30	0,025	0,023	1,0	0,9
CubPmt5+NubWT	1,3	11	0,092	0,098	6,4	6,9

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt5+Nub4su-1	0,77	30	0,06	0,061	2,6	2,6
CubPmt5+Nub4su-4	0,84	30	0,026	0,024	1,0	1,0
CubPmt5+Nub4l-1	0,86	30	0,045	0,043	1,7	1,7
CubPmt5+Nub4l-2	0,94	30	0,047	0,039	1,7	1,4
CubPmt5+Nub4l3	0,73	30	0,032	0,027	1,5	1,2
CubPmt5+Nub4l-4	0,79	30	0,038	0,033	1,6	1,4
CubPmt5+Nub4l-5	1,46	30	0,055	0,045	1,3	1,0
CubPmt5+2230	1,57	30	0,023	0,027	0,5	0,6
CubPmt5+NubWT	2,13	13	0,095	0,097	3,4	3,5
CubPmt5+NubPmt5su3	2,12	13	0,047	0,05	1,7	1,8
CubPmt5+NubPmt5l1	2,42	30	0,067	0,075	0,9	1,0
CubPmt5+NubPmt5l3	1,98	13	0,055	0,058	2,1	2,3
CubPmt5+NubPmt5l4	1,79	13	0,05	0,061	2,1	2,6
CubPmt5+NubPmt5l5	1,61	5	0,302	0,355	37,5	44,1

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt6+2230	1	30	0,023	0,023	0,77	0,77
CubPmt6+NubWT	1,48	10	0,155	0,156	10,47	10,54
CubPmt6+NubPmt5su3	1	30	0,054	0,056	1,80	1,87
CubPmt6+NubPmt5l1	2,42	30	0,173	0,192	2,38	2,64
CubPmt6+NubPmt5l3	1,98	10	0,12	0,107	6,06	5,40
CubPmt6+NubPmt5l4	1,68	10	0,123	0,121	7,32	7,20
CubPmt6+NubPmt5l5	1,87	10	0,1	0,105	5,35	5,61
CubPmt6+2230	1	30	0,019	0,03	0,63	1,00
CubPmt6+NubWT	1,87	17	0,162	0,172	5,10	5,41
CubPmt6+Nub1su-1	0,9	30	0,047	0,045	1,74	1,67
CubPmt6+Nub1su-2	0,81	30	0,041	0,047	1,69	1,93
CubPmt6+Nub1su-4	0,59	30	0,027	0,034	1,53	1,92
CubPmt6+Nub1su-5	0,82	30	0,068	0,071	2,76	2,89
CubPmt6+Nub1l-2	0,88	30	0,057	0,062	2,16	2,35
CubPmt6+Nub1l-4	0,4	30	0,02	0,019	1,67	1,58
CubPmt6c+2230	2,42	12	0,024	0,02	0,83	0,69
CubPmt6c+NubWT	2,46	4	0,399	0,308	40,55	31,30
CubPmt6c+NubPmt2su1	1,92	12	0,075	0,063	3,26	2,73

Stamm	OD ₆₀₀	Zeit (min)	OD ₄₂₀	OD ₄₂₀	AktivitätA (Miller-Units)	AktivitätB (Miller-Units)
CubPmt6c+NubPmt2su2	1,24	12	0,124	0,112	8,33	7,53
CubPmt6c+NubPmt2su3	2,29	12	0,178	0,192	6,48	6,99
CubPmt6c+NubPmt2su4	1,95	12	0,055	0,048	2,35	2,05
CubPmt6c+NubPmt2su5	2,12	12	0,167	0,175	6,56	6,88
CubPmt6c+NubPmt2l2	1,17	12	0,09	0,083	6,41	5,91
CubPmt6c+NubPmt2l4	1,41	12	0,053	0,051	3,13	3,01
CubPmt6+2230	1,23	10	0,028	0,024	2,28	1,95
CubPmt6+NubWT	2,07	10	0,396	0,377	19,13	18,21
CubPmt6+NubPmt6su1	1,41	10	0,121	0,13	8,58	9,22
CubPmt6+NubPmt6su3	1,81	10	0,074	0,081	4,09	4,48
CubPmt6+NubPmt6l1	1,38	10	0,108	0,11	7,83	7,97
CubPmt6+NubPmt6l2	1,5	10	0,08	0,09	5,33	6,00
CubPmt6+NubPmt6l3	1,41	10	0,133	0,111	9,43	7,87
CubPmt6+NubPmt6l4	0,69	10	0,06	0,057	8,70	8,26
CubPmt6+NubPmt6l5	1,74	10	0,13	0,136	7,47	7,82
CubPmt6+2230	1,46	30	0,036	0,033	0,82	0,75
CubPmt6+NubWT	1	11	0,126	0,141	11,45	12,82
CubPmt6+Nub4su-1	0,77	11	0,055	0,055	6,5	6,5
CubPmt6+Nub4su-4	0,49	30	0,039	0,037	2,7	2,5
CubPmt6+Nub4l-1	0,87	20	0,083	0,082	4,8	4,7
CubPmt6+Nub4l-2	0,94	20	0,12	0,115	6,4	6,1
CubPmt6+Nub4l-3	0,69	20	0,089	0,085	6,4	6,2
CubPmt6+Nub4l-4	0,79	20	0,115	0,09	7,3	5,7
CubPmt6+Nub4l-5	1,15	20	0,113	0,118	4,9	5,1

9.1.3 Mutierte Pm6-Proteine

	Mittelwert der Doppelbestimmung (Miller-Units)	Standardabw.		Mittelwert der Doppelbestimmung (Miller-Units)	Standardabw.
Cub6+wt	20,8373645	2,50404413	Cub6Loop+wt	17,434	1,2301840
6+neg	0,35584	0,05949256	Cub6Loop+2230	0,30534351	0,0179925
6+R-E	0,57184	0,09756363	Cub6Loop+Pmt6LoopC	0,94564719	0,5954709
6+R-E	0,6122893		Cub6Loop+Pmt6LoopM	0,6556373	

	Mittelwert der Doppelbestimmung (Miller-Units)	Standardabw.
6+R-E	0,59762893	
6+Delta	1,34207	0,20577634
6+Delta	1,29622877	
6+Delta	1,3107654	
6+6	1,64017	0,30381895
6+6	1,57654	
6+6	1,6135464	

	Mittelwert der Doppelbestimmung (Miller-Units)	Standardabw.
Cub6Loop+Pmt6	1,24799977	
Cub6Loop+Pmt6c	1,4286372	0,8605304
Cub6Loop+Pmt6c	0,736452	
Cub6Loop+Pmt6c	1,5928334	

	Mittelwert der Doppelbestimmung (Miller-Units)	Standardabw.
Cub6E+wt	16,741573	2,8602072
Cub6E+2230	0,48449612	0,02740724
Cub6E+Pmt6E	0,59210711	0,11800633
Cub6E+Pmt6E	0,49641821	
Cub6E+Pmt6E	0,57321174	
Cub6E+Pmt6	0,51102839	0,06326671
Cub6E+Pmt6	0,48051287	
Cub6E+Pmt6	0,501426	

9.1.4 Bank-Messungen

	Mittelwert (Miller- Units)	Standartabw.
Cub1+NubWT	5,6	0,03628447
Cub1+2230	0,17435897	0,00512821
Cub1+18	0,15923136	0,02161327
Cub1+20	0,2379285	0,07100865
Cub1+23	0,22770787	0,01174559
Cub1+43	0,12770787	0,01542327
Cub1+103	0,15797651	0,01287435
Cub4+WT	10,836278	0,47114252
Cub4+2230	0,22930108	0,02016129
Cub4+18	0,2750741	0,04890672
Cub4+20	0,21976178	0,04158662

	Mittelwert (Miller- Units)	Standartabw.
Cub2+NubWT	17,1052839	0,35528391
Cub2+2230	0,19118981	0,02570517
Cub2+18	0,2550429	0,09296481
Cub2+20	0,65454822	0,19307736
Cub2+23	0,22116769	0,07081219
Cub2+43	0,2421679	0,05790058
Cub2+103	0,233413799	0,05156922
Cub5+NubWT	7,77777778	0,14141414
Cub5+2230	0,23478261	0,04830918
Cub5+18	0,20879798	0,04164077
Cub5+20	0,10322612	0,06576818

	Mittelwert (Miller- Units)	Standartabw.		Mittelwert (Miller- Units)	Standartabw.
Cub4+23	0,29340498	0,05906406	Cub5+23	0,18435055	0,07720442
Cub4+43	0,27730552	0,06684294	Cub5+43	0,10838644	0,01319127
Cub4+103	0,47286165	0,06430409	Cub5+103	0,21852168	0,10291306
CubPmt6+NubWT	12,7586207	0,21551724			
CubPmt6+2230	0,3262159	0,07710558			
CubPmt6+18	2,04131143	0,40013409			
CubPmt6+Nub20	0,35995608	0,1611153			
CubPmt6+Nub23	1,3431955	0,04264398			
Cub6+43b	2,42543454	0,19251797			
CubPmt6+Nub103	0,31004542	0,10013409			

9.2 Sequenzen der Bank-Vektoren

Nukleotid-Sequenz Nr. 18, 23

ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATCCCCGGGGGATCCATCGAA
 TTGTACTGGATCAAGATATTCCTCTTCAGTGATGTCTTTAGAGTTATTGTCCTTGTCTTCCTCATCTT
 GATTCAAATTCGATGTGACCTGCAGAGATCCCTGCTCCAGCTGCCCATTTGGCTGTTCCAACCGCA
 GCTATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTGACCGGTAAAACCGGAACATTGGAAGTTGAATCTTCCGAT
 ACCATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCTGGTGGGTCGACCATGAG
 CGGCCGCTGCAGCCAAGCTAA

Protein-Sequenz Nr. 18, 23

MAAPAPALAAPATTEFPGGSIELYWIKIFLFSVDVFRVIVLVFLILIQIRCRPAEIPAPAAPLAVPTAAMQIFV
 KTLTGKTGTLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPGGSTMSGRLQPS

Nukleotid-Sequenz Nr. 103

ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATCCCCGGGGGATCCA
 TCGACGGTTTCTGCTCAAATGGTTTCTGTGTCTTCAATTGTTACATTTGACATCTACAAA
 AGATACTTTAAACCGGATGCTCAAATAAATCTATGATCAGAGTGTCTCATATTACTTGT
 ATTGTCTTTGGGTTTGGTATTGCTGGATTTCAGTATTATGTTACATTATGTTGGAATCAAT
 ATGACCTGGTATACTTACTTTTATCCTATTCTTATTGCCCCTGGTGTGATCCCTATTATA
 TTGACAGTGACTTGGGATAGACAACTTTTTGGGCTGCTTTTATTTCCCACTAGCAGGT
 TTTGCTGCTGGGTTAGCAGTATGGTTGCAACTGCTTACCATTTCTATGGAGAGGTCCT
 ATTGCATCAACTGGTGGTCAGTTACCTGCTTTGTACAGTTCTTTAACTGCATTGTTGTTG
 CCAGGTGTGTTGAGTATTATCATTTCATTTATCAAACCAAAAAAATTTGACTGGAATCAA
 TTGAAAAAAGCCGATTTGTTAGTCAAAAAGTGACGACTCATCTCAAGATGAACAAGTATCG
 GAACTGATAGAGAAAAGGTTGAAAAAATGATCAGGTTGAAGTCAACGTTGACTCCGAT
 CGACCTGCTCCAGCTGCCCATTTGGCTGTTCCAACCGCAGCTATGCAGATTTTCGTCAAG
 ACTTTGACCGGTAAAACCGGAACATTGGAAGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAACGTT
 AAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCTGGTGGGTCGACCATGAGCGGCCGCTG
 CAGCCAAGCTAA

Protein-Sequenz Nr. 103

MAAPAPALAAPATTEFPGDPSTVSAQMVSVSSIVTFDIYKRYFKPDAQNKSMIRVSHITC
 IVFGFIAGFSIMLHYVGINMTWYTYFYPIILCPGVIPILTVTWDRQTFWAAFISPLAG
 FAAGLAVWLSTAYHFYGEVTIASTGGQLPALYSSLTALLPGVLSIIISLIKPKKFDWNQ
 LKKADLLVKSSDSSQDEQVSETDREKVEKNDQVEVNVSDSRPAPAAPLAVPTAAMQIFVK
 TLTGKTGTLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPGGSTMSGRLQPS

Nukleotid-Sequenz Nr. 43

ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATTCGGGGGATCCAT
 AACCACCACAGCCAGAGCCACGACTCCCTGGGTGAACGTGACGATACTGAAATTGAAGAC
 ATCATCCAAAAGACATCGAAACTTAATATTAATACCTCAACGTCAACCAAAAATAAAAAAC
 TTTTCTTCCAATCCTCCAATCGTCACGATTCGTCAAATTCACCATTGAGGGAAGTG
 TTTATCAAACCATTAACCCACTAATATTAACAGCAATTTCAAGTTTTGTTTCGTCTTTAT
 CGTATTGATGTGGCCAATAGTGTGCGTGGGATGAAGCGCATTTTGGGAAGTTGGCTCG
 CAGTATCTTAAACGCCAGTTTTATTTTATGATGCCACCCGCCATTGGGTAAATTATTAATA
 GGATTGTCGGGATACTTGGCCGATTATGATGGTAATTTTATTTTATTTGAGAGTTCAAATGTT
 TACCCAGACAATGTTAATTACGTATTTATGAGAATCTTCAATTGCTTTTTTCGGAATTCTT
 GTTACTCCGTTGGCCTACAAAACACTGCAGTAATATTAGGGTATAATCAGTTCACCTGTTGG
 TTGATCGCTTTCATGGTGATTTTTGAACAATTGTCATTGACATTATCCAAGTTTATTTTA
 TTGGATTCAATGCTACTATTTTTACAGTTTTAACAATGTATTGTTTGGTTAAGGTACAC
 ACTTTAGCCATAGCCCCTGTTGGTAGCAACTCCAAGACTCCACTAACAAAATTGGAAATC
 AAATGGTATATTTGACCCGTTATTTCAATAGGATGTGTGTGTTCTGTAAAGTGGGTAGGA
 TTATTTGTCACGGCTTAGTTGGATTTTACACAATTGTTGATTTATGGATCAAGTTTTAT
 CAACTTTTTGCTATTGACAAAAAGTCTCCTAAAAAATGTCGGTTGCAATTATTTAATC
 CATTGGGTTGTTAGAATTTTTACATTGATAATTATCCCATGACAATTTACGTTGCCACT
 TTCAAAGTCCATTTTATGGTGTGAATCATACTGGTCTGATGATGGTACTTTGTCTACT
 TTATTACAAGGTTGTTAATTGGAATGACCTACAATCCGGCCCCAGATCAGTAGCTTTT
 GGATCATTGGTACTATCAGATCGCAAGGTTTATCCCCTAATCTTATTATTACATCCT
 CATAATTATCCACAGGTTTACAAGAGCAACAAGTACTACGTATGGGTTAAGGACGAT
 AATAATGAATTTTTGTTTGAATTTGGTGTGATGCAAGGCTTACGTAACCAACACGCAACA
 TTAGAAAATGAAAATAGTACTAGAAAATGTTGGGAATGATGATGATTATTACATGTAATA
 ATTCATGATGGTGATACTGTGAGAATCAACCACAAAAACACTGGGTCTTATTTACGAGCC
 AATGCAGTAGGTGCTCCGATAACTTCAAGTAGTTATGAGGTGTCATGTTTCGGTGATGTT
 GAAAGCAATGACTGGGCAGATGAGTGGGTGATAGAAAATCCAATCACAGACCAATCACCA
 GATCCAATGTTCCAAGATGAAGACCCGCTGGAGATACATTCAGTTTCGACTAGTTTTCGA
 TTGAAACATAAAACAATTAGGGTGTATTTGGCCACTACTGGGAAATCGTACCCTGCATGG
 GGGTACCAGCAGGGTGAAGTTGTGTGCAAATATTCTGTTTTAGTTCGTGATAAGAATACA
 TGGTGGAACATTGAAAAACATGTTAATGATAAATTGCCATTACCTGCAACTGAGTATGTC
 CCACCGAAACCAAAATCTGGAAGGAGTTTATTCTTTTGAATTATGCCATGATGGCATCC
 AACAATGCCTTGATCCCCGATCCAGATCGATTTGATAAACTCAGTCTGAATGGTGGGAA
 TGGCCAATATTAATACTGGTCTCAGAATGAATAGTTGGGGTATGCAGATATTAATAT
 TTTCTTTTGGGTAATCCATTGATTACTTGGATGTCAACAATTGCGTTGATTGTTTGCCCC
 CTTTATTTGTTGGTTGTTGGCATCAAATATCAACGTCAATGGATATTGTTATCAGCAACA
 GACACTAGCAATGCCAACCCAGCAAACAGTCAATCATTATCGTTGTTAGCAGCTCGAGCA
 TTAATTTCCATTGGCGGGGTGGGTTTTGCATTATGTGCCATTTATTTAATGGGTAGAGTC
 AAGTATCTTCATCATTACGTCCCAGCATTATATTTTGGCATCTTTGTTGCTGGGTTTATT
 GTTGATGCCATTTTAAATTTGGATTTTTCATATCATAACAATAAATTTGTGACCTGCA
 GAGATCCCTGCTCCAGCTGCCCCATTGGCTGTTCCAACCGCAGCTATGCAGATTTTCGTC
 AAGACTTTGACCGGTAACCCGGAACATTGGAAGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAAC
 GTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCTGGTGGGTCGACCATGAGCGGCCG
 CTGCAGCCAAGCTAA

Protein-Sequenz Nr. 43

MAAPAPALAAPATTEFRGIHNHHSQSHDSLGERDDTEIEDIIQKTSKLNINTSTSTKIKN
 FFFQSSNRHDSNSPLREVFIIKTINPLILTAISSFVRLYRIDVANSVWVDEAHFGKFGS
 QYLKRQFYFDVHPPLGKLLIGLSGYLADYDGNDFESSNVYPDNVNYVFMRFNCFGGIL
 VTPLAYKTAVILGYNQFTCWLIAFMVIFEQLSLTLSKFILLDSMLLFFTVLTMVCLVKVH
 TLAIARVGSNSKTPLTKLEIKWYILTGISIGCVCSVKWVGLFVTALVGFYTIIVDLWIKFY
 QTFAIDKKSPKMSVVNYLIHWVVRIFTLIIPMTIYVATFKVHFMVLNHTGPDDGTLST
 LLQGLIGNDLQSGPRSVAFGSLVTIRSQGLSPNLIHSHPHNYPQGSQEQQVTTYGFKDD
 NNEFLFEFGVDAGLRNQHATLENENSTRNGGNDDDYHVIHDGDTVRINHKNTGSYLRA
 NAVGAPITSSSYEVSCFGDVESNDWADEWVIEIQSQDQSPDPMFQDEDPLEIHSVSTSR
 LKHKQLGCYLATTGKSYPAWGYQQGEVVCKYSVFSRDKNTWWNIEKHNKDLPLPATEYV
 PPKPKFWKEFILLNYAMMASNNALIPDPDRFDKLSSEWWEWPILNTGLRMNSWGDADIKY
 FLLGNPLITWMSTIALIVCPLYLLVVGIKYQRQWILLSATDTSNANPANSQSLSLLAARA

LLPLAGWVLHYVPFILMGRVKYLHHYVPALYFAIFVAGFIVDAILNLDFSYHNNKFCRPA
EIPAPAAPLAVPTAAMQIFVKTLTGKTGTLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPGGSTMSGR
LQPS

Nukleotid-Sequenz Nr. 20

ATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATCCGGGGGATCCAT
CGAAATTTTGGGAAGCAAACATGGGAATACTCCCCGAGTACAAAATCCGTTCATATGCT
TATCTCATTCCGTA CTTTATTCTTGAAAGGTGTGTCAACTTTTTGATTTTCAACCAGCA
ACAGTCTTCTTTATTATTCGTA CTTTGGGGATAGTTGGATTCACGTGTTACTGTGAGTGG
AAATTGTTCTGTTGCTCCGACGTTATTCAGCATCTATTGCCAATTGGTTCCTATTGTTG
AACACTATTGCACCCGGTATGAGTCACGCAGGAGTGGCATTATTGCCTTCGTCATTGGCT
ATGCAAACCACGATGTTGGCCAACTCCTTTATTCTTGAAGCGATCAAATCAAAGAACCAC
CAGGAAAAACAAACCAGCATATTAAGGGCAACATTTTGGTACTTTATTGGTGGAAATATTA
GGATGGCCATTGCGTTGGCTTTGGGATTACCAGTTGGATTTTACACCATTTATCAATCA
GTTGTTATCGGCAATCTTCCATTGACAGCTTGTTCGATGTCGACCTGCAGAGATCCCT
GCTCCAGCTGCCCCATTGGCTGTTCCAACCGCAGCTATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTG
ACCGGTAAAACCGGAACATTGGAAGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAACGTTAAGTCG
AAAATTCAAGACAAGGAAGGAATCCCTGGTGGGTCGACCATGAGCGGCCCGCTGCAGCCA
AGCTAA

Protein-Sequenz Nr. 20

MAAPAPALAAPATTEFRGIHRNFGKQTWEYSPEYKIRSYAYLIPYFILGKVCQLDFDQPATVFFIIRTLGI
VGFTCYCEWKLFCSLRRYSASIANWFLLLNTIAPGMSHAGVALLPSSLAMQTTMLANSFILEAIKSKNH
QEKQTSILRATFWYFIGGILGWPFALALGLPVGFYTIYQSVVIGNLPLTALFRCPAEIPAPAAPLAVPTA
MQIFVKTLTGKTGTLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPGGSTMSGRLQP

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die Unterstützung und Betreuung während der gesamten Doktorarbeit herzlich danken. Vielen Dank auch für die Möglichkeit viele interessante Meetings besuchen zu können.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Bott für die sehr spontane Übernahme des Koreferats danken!

Vielen Dank natürlich auch an das gesamte Institut, nicht nur für die schöne Arbeitsatmosphäre, sondern auch für diverse Freizeit-K's wie Karneval, Kirmes, Kegeln und Kneipe! Ein besonderer Dank geht an Catrin, die die letzten Monate ganz alleine die Laborfahne hochhalten musste. Ich komme wieder!

Der guten Seele Anna möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz für uns alle danken. Ohne Dich läuft im Institut gar nichts!

Meinen Eltern danke ich für die vorbehaltlose Unterstützung während meiner kompletten Ausbildung und natürlich für die zahlreichen Carepakete.

Meiner WG muss gedankt werden, dass sie meine (eventuellen) Launen ertragen hat und sich immer alle Probleme brav angehört hat. Georg, Dir danke ich für deinen tollen Drucker und diverse Computerproblem-Lösungen! Und meinem Leidensgenossen Sebastian danke ich für diverse gemeinsame Mittagessen und ablenkende Mittagspausen, aber nicht für den Noro-Virus!

Meiner besten Freundin Ute danke ich, dass sie mir (noch) nicht den Hals umgedreht hat, weil ich sie nun doch überholt habe... Dafür komme ich bestimmt zu Deiner Promotionsparty nach Tübingen!

Ganz besonders danke ich Carsten, der immer für mich da ist und während meiner Schreibzeit nicht nur für mein seelisches, sondern auch für mein leibliches Wohl gesorgt hat! Hoffentlich hast Du bald wieder mehr von mir!

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 22.11.2007

(Inga Schmidt)