

**Thioredoxin Peroxidase des Humanpathogens
Candida albicans: Ein differenziell lokalisiertes
und multifunktionelles Enzym**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Constantin Urban

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. H. Brunner

Mitberichter: Prof. Dr. W. Seufert

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2004

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1 Zusammenfassung	8
2 Abstract	9
3 Einleitung	11
3.1 <i>Candida albicans</i>	12
3.2 Virulenz und Zellwand	14
3.3 Stressabwehr in der Zellwand	16
3.4 Antioxidant-Proteine	16
3.5 Zielsetzung der Arbeit	19
4 Material	20
4.1 Chemikalien	20
4.2 Enzyme	20
4.3 Reaktions-Kits	20
4.4 Pufferlösungen	20
4.5 Antikörper	21
4.6 Kulturmedien	21
4.7 <i>C. albicans</i> Stämme	23
4.8 Bakterienstämme	23
4.9 Plasmide und Vektoren	23
4.10 Oligonukleotide	24
4.11 Datenbanken und Datenverarbeitung	25
5 Methoden	27
5.1 Kultivierung von <i>C. albicans</i>	27
5.2 Transformation von <i>C. albicans</i>	27
5.3 Charakterisierung des genomischen Lokus von <i>TSA1</i>	27
5.4 Deletion durch sequentielle homologe Rekombination	28
5.5 Herstellung der Transformationskonstrukte	28
5.6 Herstellung der Deletionsstämme	29

5.7	Herstellung der rekonstituierten Deletionsstämmе -----	30
5.8	Biotinylierung -----	30
5.8.1	Analytischer Maßstab -----	30
5.8.2	Präparativer Maßstab -----	31
5.8.3	Aufreinigung -----	31
5.9	Proteinextraktion -----	32
5.9.1	Analytischer Maßstab -----	32
5.9.2	Präparativer Maßstab -----	32
5.9.3	Extraktion von Zellwand-Proteinen mittels Glukanase -----	33
5.10	Proteinfällung -----	33
5.11	Proteinfärbung -----	34
5.11.1	Silberfärbung -----	34
5.11.2	Coomassiefärbung -----	35
5.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese -----	35
5.12.1	1-dimensional -----	35
5.12.2	2-dimensional -----	35
5.13	Western Blot -----	36
5.14	Identifizierung der Proteine -----	37
5.15	Charakterisierung eines polyklonalen Anti-Tsa1p-Antikörpers -----	37
5.15.1	Auswahl der Peptide und Koppelung an KLH -----	37
5.15.2	Immunisierung der Kaninchen -----	38
5.15.3	Affinitätsreinigung -----	38
5.15.4	Charakterisierung -----	39
5.15.5	Immunpräzipitation -----	41
5.16	Bindungsstudien zytosolischer Proteine an der Zellwand intakter Zellen -----	42
5.17	Mikroskopie -----	43
5.18	Transkriptionsanalysen mittels genomweiter DNA-Mikroarrays -----	43
5.19	Funktionsanalyse von TSA1 durch Sensitivitäts-Tests -----	44
5.19.1	Resistenz gegenüber Peroxynitriten -----	45
5.19.2	Funktionen von TSA1 im Zellwandaufbau -----	45
5.19.3	Einfluss von TSA1 auf die Mutationsrate -----	45
5.20	Virulenztest -----	46
6	Ergebnisse -----	47

6.1	Identifizierung von löslichen Zellwand-Proteinen	47
6.1.1	Spezifität der Aufreinigung biotinylierter Proteine mittels Neutraavidin Sepharose	48
6.1.2	Identifizierung der löslichen Zellwand-Proteine	50
6.1.3	Untersuchung der Bindung zytosolischer Proteine an der Zelloberfläche intakter Zellen	53
6.2	Lokalisation von Tsa1p und Ebp1p	55
6.2.1	Lokalisation von Tsa1p auf der Zelloberfläche von Hyphen ist abhängig von Efg1p	58
6.2.2	Lokalisation von Tsa1p bei oxidativem Stress und Hitzeschock	60
6.2.3	Tsa1p ist kein sekretiertes Protein	62
6.3	Funktionelle Charakterisierung von Tsa1p	63
6.3.1	Regulation von <i>TSA1</i>	65
6.3.1.1	Regulation von <i>TSA1</i> unter Einfluss von Stress	65
6.3.1.2	<i>TSA1</i> wird nicht durch Hyphenbildung induziert	68
6.3.2	Charakterisierung des Gen-Lokus von <i>TSA1</i> in <i>C. albicans</i>	69
6.3.3	Deletion des Gens <i>TSA1</i>	70
6.3.4	Untersuchungen mit $\Delta tsa1$ -Stämmen	73
6.3.4.1	Virulenz in einem murinen Tiermodell für systemische Infektionen	73
6.3.4.2	Funktion als Peroxidase	75
6.3.4.3	Hitzeschock	76
6.3.4.4	Funktionen als Signalmolekül - Transkriptionelle Analysen mittels genomweiter DNA-Mikroarrays	77
6.3.4.5	Bestätigung der DNA-Mikroarray-Daten mittels Northern Blot	87
6.3.4.6	Funktion im Zellkern	89
6.3.4.7	Tsa1p interagiert mit Proteinen der Hyphenzellwand	91
7	Diskussion	94
7.1	Identifizierte Proteine	95
7.2	Funktionen von Tsa1p	97
7.2.1	Funktion als Peroxidase	97
7.2.2	Funktion im Zellkern	99
7.2.3	Unterschiede CaTsa1p zu ScTsa1p	99
7.2.3.1	Virulenz	100
7.2.3.2	Tsa1p im Hitzeschock	101
7.2.3.3	Funktion in der Hyphenzellwand	101
7.2.4	Verbindung der unterschiedlichen Funktionen	102
8	Literaturverzeichnis	104

Anhang	107
Sequenzierung des <i>TSA1</i>-Genlokus b	107
Abbildungsverzeichnis	111
Tabellenverzeichnis	113
Danksagung	114
Lebenslauf	115
Publikationen	116
Erklärung	117

Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
5-FOA	5-Fluoroorotsäure (<i>5-Fluoroorotic acid</i>)
α -MEM	Minimal Essential Medium Alpha nach Eagle
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxosulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CBB	"Coomassie Brilliant Blue"
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindole,dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMF	N,N-Dimethylformamid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRT	<i>FLP recognition target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HPLC	"High performance liquid chromatography"
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight
M	Molare Konzentration [mol / l]
mM	Millimolare Konzentration [mmol / l]
NP 40	Nonident P 40
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge

ORF	Offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphatpuffer mit Salz (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit 0,05 % Tween 20
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP	"Reversed Phase"
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>Sodium dodecylsulfate</i>)
Serum	fötales Kälberserum
Sulfo-NHS-	
LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCA	Trichloracetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA-Antikörper	polyklonaler Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureat
upm	Umdrehungen pro Minute
YPD	<i>Yeast extract / peptone / dextrose</i>
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight/volume</i>)
v/v	Volumenprozent (<i>volume/volume</i>)
WT	Wildtyp
YCB	<i>Yeast Carbon Base</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

1 Zusammenfassung

Die Zellwand und im Besonderen die Zellwand-Proteine nehmen bei der Etablierung von Infektionen der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* eine entscheidende Stellung ein, da sie z. B. für die Adhäsion und Penetration des Wirtsgewebes essenziell sind. Folglich stellen Zellwand-Proteine geeignete Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Antimykotika dar. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Dynamik zellwand-assoziiierter Proteine in *C. albicans*.

Zellwand-Proteine sind entweder kovalent oder nicht-kovalent an die unlöslichen Zuckerpolymeren (β -1,3- und β -1,6-Glukane, sowie Chitin) der Zellwandstruktur gebunden. Nicht-kovalent gebundene Zellwand-Proteine werden daher als lösliche Zellwand-Proteine bezeichnet. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnten durch Markierung mittels eines membranimpermeablen Biotinderivats und anschließender Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie insgesamt 29 unterschiedliche lösliche Zellwand-Proteine in *C. albicans* identifiziert werden. Neben der Analyse der löslichen Zellwand-Proteine aus Blastosporen wurde auch der Vergleich zu filamentösen Hyphen gezogen, da die Filamentierung für die Invasivität des Pathogens essenziell ist. Unter den identifizierten Proteinen von *C. albicans* befand sich ein Homolog der Thioredoxin Peroxidase 1 (Tsa1p) aus *S. cerevisiae*, das nur aus der Zellwand von Hyphen isoliert wurde.

In Stämmen, die Gfp-markiertes Tsa1p exprimierten, wurde Tsa1p ebenfalls ausschließlich in der Hyphenzellwand lokalisiert. Darüber hinaus wurde Tsa1p sowohl in Hyphen, als auch in Blastosporen im Zellkern und im Zytoplasma detektiert. Daher handelt es sich bei Tsa1p eher um ein differenziell lokalisiertes als um ein differenziell exprimiertes Protein. Hyphenbildung diente dabei als spezifisches Signal für die Translokation von Tsa1p an die Zellwand.

Anhand von Deletionsstudien wurde gezeigt, dass Tsa1p Funktionen als Peroxidase übernimmt, die Stabilität des *Candida*-Genoms erhöht und für die transkriptionelle Induktion hyphen-spezifischer Zellwand-Gene notwendig ist. Um den Einfluss von Tsa1p auf Zellwand-Gene im Detail zu untersuchen, wurden in Co-immunpräzipitationen mittels Anti-Tsa1p-Antikörper mit Tsa1p interagierende Zellwand-Proteine analysiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass in *C. albicans* die unterschiedlichen Funktionen von Tsa1p durch differenzielle Lokalisation ermöglicht werden.

2 Abstract

During the past years there has been an increase of fungal infections in humans predominantly caused by *Candida albicans* (1). This opportunistic pathogen coexists in the majority of the population as a commensal. But particularly in immunocompromised patients, the sensitive relationship of the host and the fungus is out of balance. This may result in life-threatening, systemic infections. Major virulence traits of *C. albicans* are the ability to switch from growth of singular budding cells (blastospores) to a filamentous growth form (hyphae), called the dimorphic transition, as well as adhesion to host tissues mediated by cell wall components (2,3).

The composition of fungal cell walls is highly dynamic. The cell wall has been implicated in several physiological processes, including the maintenance of cellular morphology and osmotic protection of the cell (4,5). In addition to these essential functions, the cell wall of fungal pathogens is crucial for virulence. Antigenic determinants which are involved in adhesion and therefore colonization and modulation of the immunological response by the host contribute to pathogenesis (1,6). Moreover, the absence of the cell wall in mammalian cells makes it an attractive target for the development of novel antifungal substances. In general, the cell wall is composed of complex polymers of glucose (β -1,3- and β -1,6-glucan), chitin and mannoproteins. These components interact to give rise to the overall architecture (7). Proteins either are covalently linked to the glucan network or are non-covalently incorporated into the cell wall (8,9). Covalently linked cell wall proteins can be released from walls by treatment with specific hydrolases. Non-covalently-linked or SDS-extractable cell surface proteins can be released by using detergents (5). Only little is known about the structure of non-covalent attachments of proteins to the cell wall.

In the course of my diploma thesis an approach using Sulfo-NHS-LC-Biotin has been established to specifically label these cell surface proteins of intact cells. Non-covalent cell wall proteins were extracted by detergent and purified by affinity chromatography using immobilized neutravidin. In total 29 different cell surface proteins from *C. albicans* under two distinct conditions have been identified.

Among these proteins was a homolog of Thiol-specific antioxidant like protein 1 (Tsa1p) which has been studied in more detail during this work. Tsa1p localized to the cell wall depending on the growth conditions as it was exclusively isolated from hyphally grown cells. A Tsa1p-GFP fusion revealed that depending on the conditions

applied the protein in blastospores is localized to the nucleus and the cytoplasm and can be found at the cell surface only in hyphal cells. Thus, Tsa1p is differentially localized rather than being differentially expressed depending on the growth conditions. Although Tsa1p has no apparent secretion signal sequence and is abundant, it could be demonstrated in binding experiments that Tsa1p did not stick unspecifically to the cell surface of growing cells as it might be artificially released from the cytoplasm for example by lysis of cells.

Deletion of four copies of Tsa1p in the *C. albicans* genome indicated a function of Tsa1p in maintenance of genetic stability and resistance to oxidative stress, which both could be shown phenotypically. The latter was confirmed by the findings that oxidative substances like hydrogen peroxid induce *TSA1* as has been shown in northern and western analysis. Moreover, transcriptional analysis revealed that genes implicated in oxidative stress response are upregulated in the *TSA1* deletion strain even under mild oxidative conditions. The decreased genetic stability was in good agreement with the nuclear localization of Tsa1p that was found under all conditions applied.

Furthermore, genes encoding for hyphal specific covalently linked cell wall proteins were found to be significantly repressed in a *TSA1* mutant strain exclusively under hyphae inducing conditions, indicating that Tsa1p might have other functions in the hyphal cell wall as it has in the cytoplasm and in the nucleus. Additionally, the translocation of Tsa1p to the cell wall was not mediated by hydrogen peroxid but in contrast by formation of filaments under two distinct hyphae inducing conditions. To address how Tsa1p is involved in cell wall biosynthesis potential interaction partners of Tsa1p were analysed using co-immune precipitation. The presented data indicate that different functions of Tsa1p in *C. albicans* might be regulated by differential localization.

3 Einleitung

Humanpathogene Pilze verursachen oberflächliche Infektionen der Haut und Schleimhäute. Abhängig vom Zustand des Immunsystems des Wirts können sie jedoch auch lebensbedrohliche systemische Mykosen hervorrufen. Die Hefe *Candida albicans* ist der häufigste Erreger von Pilzinfektionen im Menschen. Trifft der Pilz auf ein geschwächtes Immunsystem, kann er sich durch den Einsatz effizienter Virulenzfaktoren ausbreiten. Dazu gehören morphologische Flexibilität, Adhäsine und hydrolytische Enzyme.

Durch Aufklärung von Pathomechanismen mittels molekularbiologischer Methoden sollen neue Ansatzpunkte für bessere Antimykotika und zuverlässigere Diagnostika für die gezielte und schnelle Therapie solcher Erreger gefunden werden.

Ein hervorragendes Ziel neuer Antimykotika bildet die Zellwand von Pilzen, da zum einen die Zellwand für das Wachstum sowie die Virulenz des Pilzes essenziell und zum anderen in Säugerzellen keine vergleichbare Struktur vorhanden ist. Die Zellwand stellt kein starres Gebilde dar, sondern unterliegt ständiger Veränderung. Am stärksten beeinflusst durch diese dynamischen Prozesse sind Zellwand-Proteine, die dadurch für die jeweilige Anpassung an das entsprechende Habitat verantwortlich sind. Die Identifizierung dieser Proteine und die anschließende Aufklärung ihrer Funktionen eröffnet die Möglichkeit für ein tieferes Verständnis der Biologie von Infektionen und damit die Chance für die Entwicklung besserer Medikamente.

3.1 *Candida albicans*

Die Gattung *Candida* gehört zum Stamm der Ascomykota (Sprosspilze), der Klasse der Endomyzeten und der Ordnung der Saccharomycetales. *C. albicans* ist ein obligat diploider Hefepilz mit 2 x 8 Chromosomen, der sich ausschließlich asexuell vermehrt (10).

Als pleomorpher Organismus kann *C. albicans* entweder einzellige Blastosporen, Pseudohyphen oder Hyphen ausbilden. Die morphologischen Veränderungen sind reversibel. In der Hefeform proliferiert *C. albicans* durch apikale Sprossung und Teilung der Zellen. Die Zellen haben einen Durchmesser von 3 – 6 µm. Pseudohyphen entstehen durch unipolares Wachstum, wobei jede Zelle des Filaments durch Sprossung aus der vorherigen Zelle gebildet wird. Die Zellen trennen sich nicht mehr und bilden Ketten. Im Gegensatz zu Hyphen weisen Pseudohyphen Einschnürungen an den Septen auf. Hyphen werden durch kontinuierliches apikales Wachstum ausgehend von einzelnen Zellen gebildet. Die Filamente werden durch Septen ohne Konstriktionen in mononukleare Zellen geteilt und verzweigen (3).

Viele äußere Faktoren regulieren die Morphologie. Temperaturen über 30 °C, neutraler pH-Wert oder Serum induzieren beispielsweise hyphales Wachstum. Auch Stress-Situationen, wie z. B. Stickstofflimitierung können Hyphenbildung auslösen (11). Bei Nährstoffmangel und anderen lebensfeindlichen Bedingungen können als Überdauerungsform meist am Hyphenende Clamydosporen ausgebildet werden.

Als fakultatives Pathogen kolonisiert *C. albicans* kommensalisch mukosale Epithelien im oralen, gastrointestinalen und im urogenitalen Bereich sowie der Haut (3) und verursacht 50 % aller Kandidosen. Das Spektrum von Kandidosen reicht von leichten, oberflächlichen Infektionen der Haut und Schleimhäute hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen. Die Ausbreitung des Pilzes über das Blutgefäßsystem des Wirtes bis zur Besiedelung von Organen ist im Wesentlichen vom Status des Immunsystems abhängig. Immunsupprimierte Menschen sind besonders anfällig für systemische Kandidosen, die unbehandelt zur Sepsis führen. Mortalitätsraten von bis zu 40 % werden berichtet (12).

Einer Studie zufolge wird die Zahl der Risiko-Patienten für systemische Mykosen in den Jahren 2000 bis 2008 um 25 % steigen (13). Im Zusammenhang mit der steigenden Anzahl von immungeschwächten Patienten auf Intensivstationen avancierte

C. albicans als erster eukaryontischer unter bakteriellen Erregern auf Platz vier der häufigsten nosokomialen Blutbahninfektionen (*Center for Disease Control and Prevention*, www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/candidiasis_t.htm, Dezember 2003).

Zur Zeit stehen nur drei fungizide Wirkstoffgruppen für die Behandlung von Kandidosen zur Verfügung: Polyene, Triazole und Ekinokandine. Das Polyen Amphotericin B wird vorrangig zur Bekämpfung systemischer Kandidosen eingesetzt. Diese Substanz hat zum einen den Vorteil eines breiten fungiziden Wirkungsspektrums und zeigt zum anderen bis heute nur sehr wenige Resistenzbildungen bei *C. albicans*. Eine Behandlung mit Amphotericin B ruft allerdings unerwünschte Nebenwirkungen hervor, die in der Nephrotoxizität des Wirkstoffes begründet sind. Polyene wirken durch die hoch-affine Bindung an Ergosterol, einem Baustein der Pilzzellmembran. Diese Bindung destabilisiert die Zellmembran (14).

Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der Triazole sind Fluconazol, Ketoconazol und Itraconazol. Sie werden hauptsächlich bei lokal begrenzten Kandidosen eingesetzt. Die P450-abhängige Lanosterol-14- α -Demethylase, Erg2p, wird von diesen Triazolen inhibiert. Erg2p ist ein Schlüsselenzym im Biosyntheseweg des Ergosterols, deren Hemmung zur Verknappung von Ergosterol führt. Dieses steht somit nicht mehr für den Zellmembranaufbau zur Verfügung. Triazole wirken deshalb fungistatisch. Die Vorteile der Azole sind eine gute Verträglichkeit und Wasserlöslichkeit. Allerdings treten immer häufiger Resistenzen auf (15).

Die dritte Gruppe bilden die Ekinokandine. Sie wirken inhibierend auf den Glukansynthase-Komplex und führen zur Lyse der Zellen. Der erste Glukansynthasehemmer Caspofungin wurde 2002 als Medikament zugelassen.

Neue Therapieansätze stellen den Einsatz von Antikörpern und Kombinationstherapien aus Fungiziden und Immunmodulatoren dar (16). Antikörper gegen das lösliche Zellwand-Protein Hsp90p werden bereits in der klinischen Phase getestet (16).

3.2 Virulenz und Zellwand

Ein wesentlicher Virulenzfaktor, der *C. albicans* zu einem so erfolgreichen Pathogen macht, stellt die Fähigkeit dar, die Morphologie von einzelligen Blastosporen zu myzelartigen Hyphen zu wechseln (17). Die Zellwand krankheitserregender Pilze nimmt dabei eine entscheidende Stellung ein, da wesentliche Aspekte der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen von diesem Kompartiment abhängen: Die Adhäsion an das Wirtsgewebe, einem essenziellen Schritt bei Infektionen, wird vorwiegend durch Zellwand-Proteine vermittelt (18), sekretierte, lytische Enzyme zur Zerstörung des Wirtsgewebes passieren die Zellwand (19) und die Bestandteile Glukan, Chitin sowie vor allem Mannoproteine besitzen die Fähigkeit, die Immunantwort des Wirts zu modulieren (9).

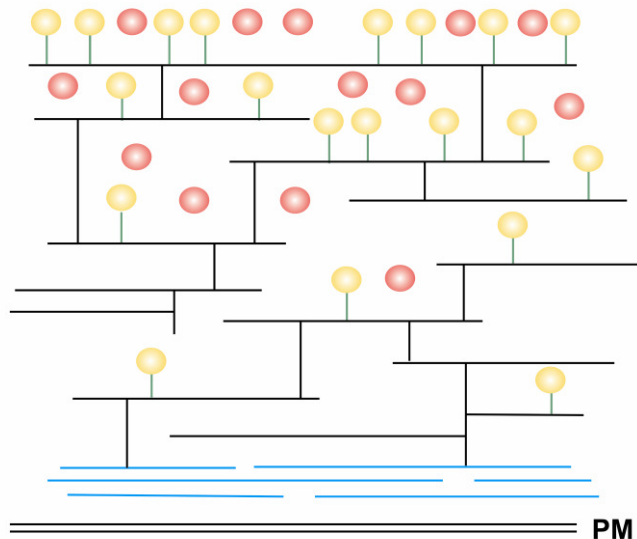


Abbildung 01: Architektur der Pilz-Zellwand.

Nahe der Plasmamembran (PM) liegen unverzweigte Schichten von Chitinketten (Blaue Linien), die mit dem dreidimensionalen β -1,3-Glukan-Netzwerk (schwarze Linien) verbunden sind. An dieses sind kovalent gebundene Zellwand-Proteine (gelbe Kugeln) über kurze β -1,6-Glukan-Brücken (grüne Linien) verankert. Lösliche Zellwand-Proteine (rote Kugeln) werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen gebunden. Diese Wechselwirkungen sind zugunsten der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Der Großteil der Zellwand-Proteine befindet sich in den äußeren Schichten der Zellwand und wird als Phosphomanno-Proteinkomplex bezeichnet.

Der Aufbau der Zellwand ist dem von *S. cerevisiae* sehr ähnlich (Abb. 01). Die einzelnen Komponenten der Zellwand geben durch Verbindungen untereinander die Architektur der Struktur vor. Bei den Grundkomponenten handelt es sich um β -Glukane (47 - 60 %), Chitin (0,6 - 9 %), Mannoproteine (6 - 25 %) und Lipide (1 - 7 %). Mannosepolymere sind entweder N-glykosidisch über Asparagin oder O-glykosidisch über Serin/Threonin mit Proteinen verknüpft. β -1,3-verknüpfte Glukane bilden ein stabiles dreidimensionales Netzwerk aus. Kürzere, stark verzweigte Ketten von β -1,6-Glukanen stellen die Verbindungsglieder zwischen β -1,3-Glukan, Chitin und Proteinen dar. Da β -1,6-Glukane hydrophil sind, erreichen sie eine hohe Flexibilität, die vor allem den gebundenen Proteinen den erforderlichen Funktionsradius verleiht (8,20).

Proteine sind entweder kovalent oder durch nicht-kovalente Verbindungen am Zuckergerüst verankert. Daher werden die Zellwand-Proteine in lösliche (nicht-kovalente) und kovalente Zellwand-Proteine unterteilt. letztere werden entweder über einen GPI-Anker (GPI-Proteine) oder im Falle der PIR-Proteine durch eine alkalilabile, bisher nicht näher charakterisierte Verbindung verankert (8,21). Lösliche Zellwand-Proteine sind durch hydrophobe Kräfte, Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen und Disulfidbrücken an die Zellwandstruktur gebunden (9).

3.3 Stressabwehr in der Zellwand

Die Zellwand stellt einerseits eine Barriere, andererseits eine Kontaktstelle dar, die für die Etablierung der Infektion und die Ausbreitung des Pilzes essenziell ist. Durch Invasion in tiefere Gewebe des Wirtes, muss sich der Erreger auf immer neue Habitate einstellen können. Vor allem das Immunsystem des Wirtes erfordert besondere Fähigkeiten des Pathogens (1).

Immunzellen, wie Makrophagen oder Neutrophile, können *Candida*-Zellen phagozytieren und in bestimmte zelluläre Kompartimente transportieren, den sogenannten Phagolysosomen (22). In diese werden große Mengen reaktiver Sauerstoff-Verbindungen (ROS) und Proteasen ausgeschüttet, um die Keime abzutöten. Jedoch ist *C. albicans* z. B. in Makrophagen in der Lage, der Abtötung durch Ausbildung von Hyphen zu entgehen. Gebildete Filamente wachsen aus den phagozytierenden Zellen heraus, die schließlich absterben. Die Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, sind bisher noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass *C. albicans* zur Abwehr der ROS ein breites Spektrum an Enzymen besitzt. Da Hyphenbildung für die Abtötung phagozytierender Zellen essenziell ist, wurde angenommen, dass solche Enzyme auch in der Hyphenzellwand existieren. In einer genomweiten Identifizierung von GPI-Proteinen basierend auf Vergleichen von Konsensus-Sequenzen wurden bisher nur drei Superoxid-Dismutasen Pga2p, Pga3p und Pga9p als Zellwand-Proteine beschrieben. Deren Regulation und molekulare Funktionen sind noch weitgehend unbekannt (20).

3.4 Antioxidant-Proteine

Nach ihrer Funktionsweise werden die Antioxidant Proteine in vier Familien unterteilt:

1. Catalasen (*CAT*)
2. Superoxid-Dismutasen (*SOD*)
3. Gluthation-Peroxidasen (*GPX*)
4. Thiol-spezifische Antioxidant-Proteine (*TSA*)

CAT, ein Cu- oder Zn-haltiges Metalloenzym, dismutiert H_2O_2 in H_2O und $\text{OH}\cdot$ (Hydroxylradikal), *SOD* verwandelt $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Superoxid-Anion) in H_2O_2 und O_2 , *GPX* reduziert Peroxide unter Oxidation von Gluthathion und *TSA* reduziert Peroxide unter Oxidation von Thioredoxin und anderen Thiol-Verbindungen (23).

TSA-ähnliche Proteine kommen in allen eukaryontischen Organismen vor. Die bakteriellen Homologe sind die AhpC-Proteine. Bei Tsa1p in *C. albicans* handelt es sich um ein bisher nicht charakterisiertes Ortholog zu Tsa1p aus *S. cerevisiae* (76 % identisch und 88 % homolog auf Proteinebene, ClustAl W). ScTsa1p wurde ursprünglich aus einer Fraktion isoliert, die Glutamin Synthase (Gln1p) vor oxidativer Schädigung schützte (24). Diese Funktion war abhängig vom Vorhandensein von thiol-haltigen Substanzen (wie z. B. DTT oder Thioredoxin und NADPH), weshalb das Protein als thiol-spezifisches Antioxidant-Protein bezeichnet wurde (Tsa1p). Die Bezeichnungen Thioredoxin Peroxidase (Tpx) oder Peroxiredoxin (Prx) sind ebenfalls geläufig. In dieser Arbeit wird das *Candida*-Protein als Tsa1p bezeichnet. In *S. cerevisiae* existieren fünf verschiedene Vertreter der Familie der AhpC/TSA-Proteine, drei zytosolische, ein nukleäres und ein mitochondrielles Protein (25). In *C. albicans* dagegen wurden nur vier Vertreter dieser Familie mittels Homologievergleichen identifiziert, wobei in *C. albicans* kein Ortholog zu ScTsa2p existiert. Tsa1p zeigt die höchste Homologie zu ScTsa1p, einem zytosolisch lokalisierten Protein. Tsa1p gehört wie der Vertreter von *S. cerevisiae* zu den 2-Cys Peroxiredoxinen (23). Diese Proteine besitzen zwei hochkonservierte Cysteine. Im Tsa1p von *C. albicans* sitzen diese an den Positionen 47 und 168. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass durch Oxidation dieser Cysteine intermolekulare Disulfidbrücken mit Cysteinen eines zweiten Tsa1p-Moleküls ausgebildet werden (26). Die dabei möglichen Kombinationen sind in Abbildung 02 dargestellt. In Zellextrakten sind überwiegend die Dimere D1 und D2 zu finden (Abb 02 B). Die Fähigkeit zur Ausbildung dieser intermolekularen Disulfidbrücken verleiht TSA-ähnlichen Proteinen die antioxidativen Eigenschaften (26). Daher liegt Tsa1p hauptsächlich als Homodimer vor. Jedoch werden unter bestimmten Voraussetzungen auch Multimere gebildet (27,28).

Durch Oxidations-Prozesse wird in Tsa1p aus Cys⁴⁷ Cys⁴⁷-SOH gebildet (Sulfonsäure). Letztere kann nochmals zu Cys⁴⁷-SO₂H (Sulfinsäure) oxidiert werden. Diese Form wird nicht durch Thioredoxin, sondern durch Sulfiredoxin, einem Vertreter einer kürzlich in Hefe identifizierten Proteinfamilie, reduziert (29). Durch die zusätzliche Ladung in Cys⁴⁷-SO₂H ändert sich der isoelektrische Punkt von Tsa1p von 4,9 auf 4,7. Da beide Formen in der Zelle vorliegen, separiert die Gesamtmenge Tsa1p in einem 2D-SDS-PAGE in zwei unterschiedliche Protein-Spots (29).

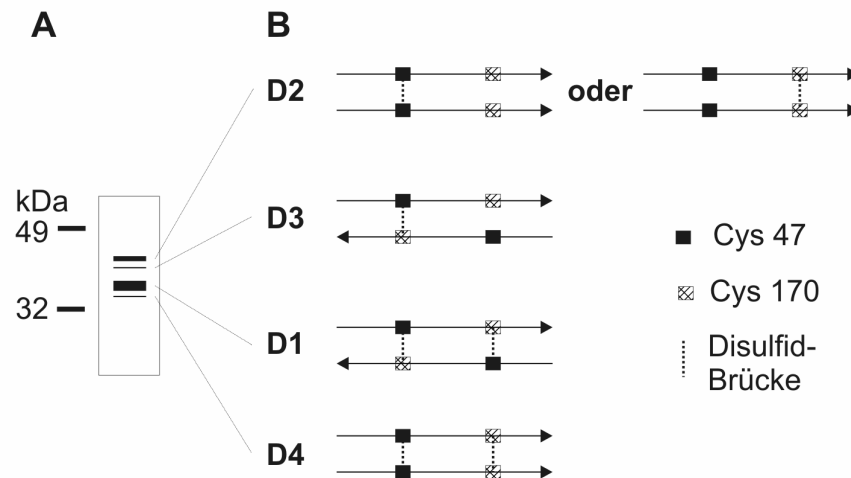


Abbildung 02: Schematische Darstellung der möglichen Tsa1p-Dimere in *S. cerevisiae*.

A: Schema eines nicht-reduzierenden Proteingels mit unterschiedlichen Formen von Tsa1p-Dimeren. Die Stärke der Banden repräsentiert die Häufigkeit der entsprechenden Form im Zellextrakt. B: Skizze der verschiedenen Möglichkeiten der Dimerbildung von Tsa1p über Disulfidbrücken. Die Pfeile stellen die Polypeptidkette von Tsa1p dar, wobei die Pfeilspitze in Richtung des C-Terminus weist (verändert nach (26)).

In verschiedenen eukaryontischen Organismen wurden TSA-ähnliche Proteine in sehr unterschiedlichen Zellkompartimenten identifiziert. Thioredoxin wurde unter bestimmten Voraussetzungen von stimulierten Zellen durch nicht-klassischen Export sekretiert (30). In *E. histolytica* wurde Tsa1p als Zelloberflächen-Antigen beschrieben (31), wohingegen in humanen Erythrozyten ein TSA-ähnliches Protein sowohl als freie intrazelluläre Form als auch als plasmamembran-assoziiertes Protein identifiziert wurde (32).

Parallel zu diesen Lokalisationen wurden den TSA-ähnlichen Proteinen verschiedener Organismen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. So wurde beispielsweise *HBP23* aus der Ratte als hämin-bindendes Protein charakterisiert (33), während ein murines Homolog *MER5* für die Differenzierung von bestimmten Zellen essenziell ist (34). In der Bäckerhefe wurde dieses Protein zytoplasmatisch lokalisiert (25,35) und sogar mehrere verschiedene Funktionen für Tsa1p vorgeschlagen. Neben der gut etablierten Peroxidase-Funktion (24), wurden Beteiligungen dieses Enzyms an der Abwehr von Hitzeschock beschrieben, wobei Tsa1p durch Oligomerisierung die Funktion eines Chaperons übernehmen kann (28,36). Ferner wurde berichtet, dass das Enzym an der Erhaltung der genetischen Stabilität (37) und an der transkriptionellen Aktivierung bestimmter Gene beteiligt ist (38).

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Zellwand von Pilzen war in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Insbesondere kovalent-verknüpfte Mannoproteine und deren Beitrag zur Biogenese und Funktion der Zellwand wurden intensiv untersucht. Zu diesem Zeitpunkt stehen jedoch nur sehr wenige Informationen über lösliche Zellwand-Proteine zur Verfügung. Die Dynamik dieser Proteine während der morphologischen Veränderungen des Humanpathogens *C. albicans* sind unbekannt.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde ein Ansatz für die Identifizierung löslicher Zellwand-Proteine entwickelt. Mittels eines membranimpermeablen Biotinderivats, das ausschließlich Zelloberflächen-Proteine markiert, und anschließender Affinitätsreinigung biotinylierter Proteine wurde die Identität von 29 verschiedenen Zelloberflächenproteinen bestimmt. Darunter befand sich Tsa1p, eine Thioredoxin Peroxidase, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte. Das Protein wurde ausschließlich von Hyphen-Zellwänden aufgereinigt. Die exakte Lokalisation von Tsa1p und anderen löslichen Zellwand-Proteinen sollte in verschiedenen morphologischen Wachstumsformen mittels Gfp-Fusionen bestimmt werden. Die spezifischen Signale, welche die Translokation von Tsa1p auf die Zelloberfläche steuern, waren dabei von besonderem Interesse. Ferner sollten die Funktionen von Tsa1p in *C. albicans* untersucht werden. Dabei sollten die differenzielle Lokalisation und die Rolle in der Pathogenität besondere Beachtung finden.

4 Material

4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe bezogen. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde deionisiertes Wasser aus einer Ionentauscher-Anlage verwendet (Millipore, Schwalbach).

4.2 Enzyme

Tabelle 01: Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme

Enzym	Firma/Referenz
cy3-/cy5-dUTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Amersham Biosciences, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	L. Schalwyk, ICRF, London*

* Die Taq-Polymerase wurde nach (39) isoliert.

4.3 Reaktions-Kits

Tabelle 02: Reaktions-Kits

Name	Firma
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Prime-It® II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam

4.4 Pufferlösungen

Allgemeine Puffer- und Stammlösungen wurden nach Standardmethoden hergestellt (40). Spezielle Pufferlösungen wurden im Abschnitt Methoden an entsprechender Stelle aufgeführt.

4.5 Antikörper

Tabelle 03: verwendete Antikörper

Name	Wirt	Hersteller
Monoklonaler Anti-Biotin IgG1 Klon BN-34	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-Gfp Serum, affinitätsgereinigt	Kaninchen	Clontech, Palo Alto
Anti-Maus IgG, POD-konjugiert	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert	Ziege	Jackson Immuno Research
Alexa Fluor 488 Anti-Maus IgG	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 Anti-Maus IgG	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 546 Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes

4.6 Kulturmedien

α -MEM: Minimalmedium für die Zellkultur mit L-Glutamin und Desoxyribo-/Ribonukleotiden ohne NaHCO₃, Pulver (Invitrogen, Karlsruhe)

Glukose 2 % (w/v)

SC-uri: synthetisches Selektionsmedium für Hefen ohne Uridin

Hefe Stickstoff Basis, YNB (Difco, Augsburg) 1,5 g/l

Ammoniumsulfat 5 g/l

AS-Mix (41) 2 g/l

Adenin 0,3 mM

Uracil 0,2 mM

Histidin 0,3 mM

Leucin 1,6 mM

Tryptophan 0,4 mM

Glukose 2 % (w/v)

YPD:	Vollmedium für Hefen	
	Hefeextrakt (Difco, Augsburg)	10 g/l
	Bacto Pepton (Difco, Augsburg)	20 g/l
	Glukose	2 % (w/v)
YNB:	Hefe Stickstoff Basis, YNB (Difco, Augsburg)	1,5 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
	Uridin	0,1 mM
YCB-BSA:	Induktion des SAP-Promotors, <i>URA3</i> -Flipper	
	Hefe Kohlenstoff Basis, YCB (Difco, Augsburg)	23,4 g/l
	Rinderserumalbumin (BSA)	4 g/l
	Uridin	0,1 mM
LB-Medium:	Vollmedium für Bakterien	
	Hefeextrakt	5 g/l
	Bacto Pepton (Difco, Augsburg)	10 g/l
	NaCl	10 g/l

Für Agarplatten wurde eine Endkonzentration von 2 % (w/v) Agarose eingestellt.

4.7 *C. albicans* Stämme

Tabelle 04: *C. albicans* Stämme

Name	Referenz-Name	Genotyp	Referenz
Wildtyp	SC5314	klinisches Isolat	(42)
CAI4	CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(43)
CAI4- <i>URA3</i>	Can100	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rpn10::URA3</i>	Nicola Saunders (Stamm- sammlung S. Rupp)
$\Delta tsa1$	Can312 Can314 Can297	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta tsa1$ - <i>TSA1</i>	Can313 Can315 Can298	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-URA3</i>	diese Arbeit
<i>TSA1-GFP</i>	Can257 / TG6 Can258 / TG13	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>TSA1/TSA1::GFP-URA3</i>	diese Arbeit
<i>EBP1-GFP</i>	Can259 Can260	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>EBP1/EBP1::GFP-URA3</i>	diese Arbeit
$\Delta cap1$	Can169 / MMY301	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>$\Delta cap1::hisG/\Delta cap1::hisG$</i> <i>URA3-hisG</i>	(44)
$\Delta cap1$ - <i>CAP1</i>	Can302	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>$\Delta cap1::hisG/\Delta cap1::hisG$</i> <i>ade2::CAP1-URA3</i>	(44)

* *FRT* bezeichnet die nach dem Ausschneiden der *URA3-FRT*-Flipper-Kassette am Locus der Insertion verbleibende FLP-Erkennungssequenz (45).

4.8 Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α (Genotyp: F- *supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 deoR lambda*-) wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

4.9 Plasmide und Vektoren

Tabelle 05: Plasmide und Vektoren

Plasmid, Vektor	Name des Bakterienstammes	Bezugsquelle, Referenz
pSFU1		(45)
pCaEXP		(46)
pSFU1- $\Delta tsa1$ -FR1/2	B2	diese Arbeit
pSFU1- $\Delta tsa1$ -FR1.2/2.2	C5, D5	diese Arbeit
pCaEXP-TSA1	RE5, RE3	diese Arbeit
pGEM 1506		(47)

4.10 Oligonukleotide

Alle hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

Tabelle 06: Primer für die Herstellung der Deletions-, Rekonstitutions- und GFP-Markierungskonstrukte.

Primer	Basensequenz*	Produkt
FR1TSA_apa	<u>GCTCGGGCCC</u> ACGTGTTGGATCTGAAGCAT	465 bp
FR1TSA_xho	CCGCTCGAGATCTAATTGGCCACCCAGT	
FR2TSA_not	<u>ATAAGAATGCGGCCG</u> CCAAGCTTTGTTTTGTGTTGCTC	446 bp
FR2TSA_sac1	<u>GCGAGCTCGGGCC</u> CATCTTGATTGCTA	
for1.2tsako_apa	<u>GCTCGGGCCC</u> ATTAGATCCACATCTTCATTAC	423 bp
rev1.2tsako_xho	CCGCTCGAGTGATTGAAATAAAATGCAATAG	
for2.2tsako_not	<u>ATAAGAATGCGGCCG</u> CAGATTGCATTTTAGACAAGC	332 bp
rev2.2tsako_sac	<u>TCCCCGCGG</u> ATTGGTACGCAAAGGAACCA	
fortsako-re_pst	<u>AAA</u> ACTGCAGTGGTGTGTAGATACCGATTAGG	
revtsako-re_bam	<u>CGGGATCC</u> TGTGGCTTTGTTTGTGAAG	
For 8577 GFP-tagging TSA1	TGGCACCCAGGTGATGAAACCATCAAGCCAAGCCCA-GAAGCATCCAAGGAATACTTCAACAAAGTCAACA-AAGGTGGTGGTTCTAAAGGTGAAGAATTATT	
Rev 8577	AAAATGCAATCTATTTGCTATGAAACCATAACGAAAAA-AAAAACGTACATATATATCTATAAATCCTGTTTATCTA-GAAGGACCACCTTTGATTG	
For 893 GFP-tagging EBP1	CACGAACACGGTGAATTGATGATGCTGCTCAAGAAGAATTCAACAAACACGATGAAAATGTTGAACACCAAGGTG-GTGGTTCTAAAGGTGAAGAATTATT	
Rev 893	AAAAGTACTAGCAAAAACCAATTGGTCAAAAATTTTTTTTAAAAAACAATATTATTCAATTAATTGAATTATCTA-GAAGGACCACCTTTGATTG	

* Die unterstrichen Sequenzen kennzeichnen jeweils die Schnittstellen für die Klonierung oder die komplementären Sequenzen von Plasmid pGEM 1506 (For und Rev 8577 sowie 893).

Tabelle 07: Primer für Northern- und Southern-Hybridisierungs-Sonden.

Genname	Primer	Basensequenz
<i>ACT1</i>	act1for	TTTCCAACGGGACGATA
	act1rev	TCTTGACAAATGGTTGG
<i>GDH3</i>	orf6.3152S	AGCAATGTTGGCACCTTTC
	orf6.3152R	CTTGGCTGGTGTCCGTC
<i>GLN1</i>	for_gln1_orf	CTCCAGGCCATGATTCTGAT
	rev_gln1_orf	GCACCATTCCAATCACCTTT
<i>HWP1</i>	2426for	CTAAACCAGCTGCTCCAAAAT
	2436rev	GTTGTTACCAGCACCTTCAA
<i>HYR1</i>	orf6.3143S	TCTGAAGCTGGTTCTGGA
	orf6.3143R	TCCATCAAAGCCAGTCAT
<i>RHR2</i>	orf6.8673S	ATTCTTGTAATAAATTGCTCATCA
	orf6.8673R	GGTCCGTTGAATTGGTAAAAT
<i>SUR2</i>	orf6.4041R	CCAGACACCACAGATTATATGT
	orf6.8673R	AAATCTCTTTCTTAGTTTCTTTGT

<i>TRR1</i>	orf6.5196S	AGAAGTAATGGCTTGTCTATAAA
	orf6.5196R	GACCAAATATGCTTCTAAAGTG
<i>TSA1</i>	thiol-for	GAAATTTGCCGAAAAGGATG
	thiol-rev	ATCACCTGGGTGCCAGTTAG
	tsa2_upstream_for	AAATACCAATTTCCCTGTCTG
	rev3tsa	GTCACCATAGCCGTCACCTT
<i>YWP1</i>	orf6.3288S	GAATCCGGTTCTGGTTCT
	orf6.3288R	CAACGGTGGTTTCTTGAC

Tabelle 08: Primer für die Sequenzierung des *TSA1*-Gen-Lokus in *C. albicans*.

Primer	Basensequenz
tsa2a 1F	AAATACCAATTTCCCTGTCTG
tsa2a 2F	CCCTAAGCCAAAGGTGTCTG
tsa2a 3F	TCTTTTCTTTTGCTCTATTGCATTT
tsa2a 4F	GAAGGTGTTGCCTTGAGAGG
tsa2a 3R	CTGGACAAGGAGTGGTTGGT
tsa2a 2R	GCATTTGTATCGGCATGAAA
rev3tsa	GTCACCATAGCCGTCACCTT

4.11 Datenbanken und Datenverarbeitung

Sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten Basensequenzen der offenen Leserahmen (ORFs) und Gene von *C. albicans* wurden der Datenbank des *Stanford Sequencing Center* der Stanford Universität in Kalifornien, USA oder der Galarfungail-Datenbank *Candida DB* entnommen (www-sequence.stanford.edu/group/candida/search.html und <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>).

Sequenzvergleiche und Homologieanalysen auf DNA- und Proteinebene wurden mittels verschiedener BLAST-Programme gemacht, die auf der Internetseite des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) zur Verfügung standen. Die verwendeten Programme werden in den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils aufgeführt.

Zur Proteinanalyse und zur Vorhersage von Signalpeptiden wurden verschiedene Algorithmen und Proteindatenbanken des Expasy-Protein-Servers genutzt (<http://us.expasy.org/>):

SignalP: Vorhersage von Signalpeptid-Schnittstellen

(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)

Zur Erstellung von Primer-Sequenzen wurde das Programm Primer3 des *Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT*,
(www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) verwendet.

Auswertungssoftware DNA-Mikrochip: AIDA Image Analyzer, Raytest GmbH

Quantifizierung von ^{32}P -Signalen: ImageQuant5.2

Bearbeitung von DNA-Sequenzen: Clonemanager 5

5 Methoden

Sofern in diesem Abschnitt nicht gesondert aufgeführt, wurden molekularbiologische und biochemische Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (40,48).

5.1 Kultivierung von *C. albicans*

Als Vorkulturen von *C. albicans* wurden 10 ml Kulturen verwendet, die aus Glycerin-Dauerkulturen angeimpft und in YPD oder YPD 0,1 mM Uridin über Nacht bei 30 °C inkubiert wurden. Um *C. albicans* in Hefeform, d. h. als einzelne, sprossende Zellen zu kultivieren, wurde im Vollmedium YPD bei 30 °C inkubiert. Hyphales Wachstum wurde durch einen Temperatur- und Medienwechsel induziert, wobei α -MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) mit 2 % Glukose oder YPD mit 10 % FCS bei 37 °C verwendet. Stets wurde aus einer Übernacht-Vorkultur entweder mit einer Verdünnung von 1:100 oder bei einer Optischen Dichte (600 nm) von 0,1 angeimpft. Alle Kultivierungen in Flüssigmedium wurden in temperierten Inkubationsschüttlern bei 180 upm durchgeführt. Für Kultivierungen auf Agarplatten wurde das jeweilige Medium mit 2 % Agarose versetzt.

5.2 Transformation von *C. albicans*

Linearisierte DNA von Plasmiden oder PCR-Produkten wurden in *C. albicans* Stämmen mit der Lithium Acetat Methode transformiert (49) und auf dem entsprechenden SC-Medium selektiert. 10 μ g Plasmid-DNA wurde pro Transformation eingesetzt. Je 10 PCR-Ansätze aus 100 μ l Amplifikationen wurden mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in 100 μ l H₂O resuspendiert.

5.3 Charakterisierung des genomischen Lokus von *TSA1*

Es wurde festgestellt, dass im *Candida*-Genom zwei unterschiedliche Genloki für *TSA1* existieren (www-sequence.stanford.edu/group/candida). Beide Loki (*TSA1*-Genlokus a und b, Abb. 19) liegen auf dem Sequenzierungsabschnitt Contig 19-2514. Jedoch endete dieser Sequenzierungsabschnitt vor dem Ende des *TSA1*-Genlokus b (Abb. 19). Somit war nicht bekannt, ob am Lokus b noch eine vollständige Kopie des *TSA1*-Gens vorhanden war. Um dies aufzuklären, wurde der *TSA1*-Genlokus b sequenziert. Dazu wurde folgende Tatsache ausgenutzt: Der Analyse des Genoms zufolge waren die Sequenzen der offenen Leserahmen von *TSA1* am

Lokus a sowie am Lokus b jeweils 630 bp in 5'-Richtung identisch (Anhang Sequenzierung). außerhalb dieses Bereichs unterschieden sich die Sequenzen. Daher konnte ein Primer erstellt werden, der spezifisch im nicht-homologen Bereich des TSA-Genlokus b hybridisierte (tsa2a 1F, Tabelle 08 und Abb 19). In Kombination mit einem anderen Primers, der am Gegenstrang in der Region jenseits des 3'-Endes des TSA-Genlokus a hybridisierte (rev3tsa, Tabelle 08 und Abb. 16), entstand ein spezifisches PCR-Produkt der Länge 2100 bp. Dieser Sequenzabschnitt wurde bei der Firma Biolux GmbH, Stuttgart sequenziert. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 08 zusammengefasst und in der resultierenden Sequenz gekennzeichnet (Anhang Sequenzierung).

5.4 Deletion durch sequentielle homologe Rekombination

Für die Deletion von *TSA1* in *C. albicans* wurde die in das Plasmid pSFU1 integrierte *URA3*-Flipper-Kassette eingesetzt , wobei die Integration der Flipper-Kassette in das *C. albicans* -Genom durch homologe Rekombination der flankierenden Regionen (FR) erfolgt (45). Das *URA3*-Gen dient als selektierbarer Marker des Deletionskonstrukts. Die Flipper-Kassette enthält zwei terminale FRT-Sequenzen (34 bp). Diese FRT-Sequenzen werden von der sequenzspezifischen FLP-Rekombinase aus *E. coli* erkannt. Die Expression der Rekombinase wird durch den SAP2-Promotor von *C. albicans* reguliert. Der Promotor ist durch hochmolekulare Stickstoffverbindungen und somit durch Medienwechsel induzierbar. Die Rekombinase schneidet den Selektionsmarker *URA3* zwischen den beiden FRT-Sequenzen aus dem Genom heraus, wobei eine FRT-Sequenz übrig bleibt. *URA3* kann folglich nach der Deletion eines Allels (Flip-in) und der Induktion der Rekombinase (Flip-out) erneut als Selektionsmarker verwendet werden.

5.5 Herstellung der Transformationskonstrukte

Mittels PCR (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research) wurden zwei unterschiedliche Paare flankierender Regionen aus genomischer DNA amplifiziert und in pSFU1 kloniert. Die flankierenden Regionen wurden FR1 und FR2 sowie FR1.2 und FR 2.2 genannt. Die Sequenz der verwendeten Primer ist in Tabelle 06 zu finden. FR1 lag in 5'-Richtung und FR2 in 3'-Richtung außerhalb des *TSA1*-ORFs. FR1.2 befand sich zwischen FR1 und dem *TSA1*-ORF und FR2.2 zwischen dem *TSA1*-ORF und FR2. Dadurch stand ein äußeres (FR1 und FR2) und ein inneres Konstrukt zur Verfügung

(FR1.2 und FR2.2). Um *TSA1* zu deletieren, wurde zuerst das äußere Konstrukt und anschließend das innere Konstrukt verwendet. Auf diese Weise konnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass die Deletionskassette in einen bisher nicht transformierten Genlokus von *TSA1* integriert. Bei Verwendung nur eines Paares von flankierenden Regionen ist die Wahrscheinlichkeit der Reintegration in einen bereits transformierten Locus zu groß, wodurch die Suche nach richtigen Transformanten ineffizient wird. Zur PCR-Amplifikation (30 Zyklen bei 94 °C, 50 °C und 72 °C, je 1 min) wurden Primer verwendet, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur gerichteten Ligation der FR in das Plasmid pSFU1 enthielten (Tabelle 7). Die PCR-Produkte FR1 und FR1.2 wurden nach *Apal*- und *XhoI*-Verdau in den identisch verdauten und mit SAP dephosphorylierten Vektor pSFU1 ligiert, die Fragmente FR2 and FR2.2 wurden über *NotI* und *SacI* bzw. *SacII* integriert. Daraus resultierten das Plasmid pSFU1- Δ *tsa1*-FR1/2 mit dem äußeren und das Plasmid pSFU1- Δ *tsa1*-FR1.1/2.2 mit dem inneren Deletionskonstrukt.

5.6 Herstellung der Deletionsstämme

Die Schwierigkeit bei der Deletion von *TSA1* bestand darin, dass vier identische Kopien im Genom von *C. albicans* vorhanden waren (Abschnitt 5.3 und Anhang Sequenzierung). Zunächst wurden die Flipper-Kassetten mit FR1 und FR2 zweimal für die Deletionen von *TSA1*, anschließend die Kassette mit FR1.2 und FR2.2 für die verbliebenen *TSA1*-Kopien verwendet. Zur Integration in das *C. albicans*-Genom wurden die Vektoren pSFU1- Δ *tsa1*-FR1/2 und pSFU1- Δ *tsa1*-FR1.1/2.2 mit den Endonukleasen *Apal* und *SacI* bzw. *SacII* verdaut. Der vollständige Verdauansatz (10 µg Plasmid in 100 µl Volumen) wurde für die Transformation eingesetzt. Das äußere Deletionskonstrukt wurde in den *URA3*-defizienten Stamm CAI4 transformiert und positive Transformanten auf uridin-freiem SC-Medium selektiert. Der Genotyp der Transformanten wurde mittels Southern Blot überprüft. Durch Inkubation in YCB-BSA-Medium mit 100 µg/ml Uridin bei 30 °C über Nacht wurde der *SAP2*-Promotor aktiviert, dadurch die FLP-Rekombinase im *URA3*-Flipper induziert und das an einem *TSA1*-Lokus integrierte Deletionskonstrukt zwischen den FRT-Sequenzen herausgeschnitten. Zur Selektion *URA3*-defizienter Kolonien wurden ca. 200 Zellen/100 µl auf YPD ausplattiert. Auf diesem Medium wachsen uridin-auxotrophe Klone langsamer als die prototrophen Elternstämme und bilden daher nach 24 h kleinere Kolo-

nien. Kleine Kolonien wurden vereinzelt und auf Uridinauxotrophie getestet. Die genotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten erfolgte mittels Southern Blot. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis homozygote $\Delta tsa1$ -Mutanten resultierten.

5.7 Herstellung der rekonstituierten Deletionsstämme

Die Reversion der $\Delta tsa1$ -Mutanten erfolgte mittels Transformation mit dem integrativen Expressionsvektor pCaEXP (46). Dieser Vektor trägt als Selektionsmarker *C. albicans* *URA3* unter seinem nativen Promotor, sowie homologe Sequenzen zur Integration in den *RP10*-Lokus von *C. albicans*.

Zur ektopischen Reintegration von *TSA1* in *URA3*-defiziente homozygote $\Delta tsa1$ -Stämme wurden 1000 bp der Promotorregion, der offene Leserahmen und 300 bp im 3'-Bereich (Terminator) von *TSA1* kloniert. Mittels PCR war diese Sequenz aus genomischer DNA amplifiziert und über *Pst*I- und *Bam*HI-Schnittstellen in den Vektor kloniert worden. Durch die Anordnung der Schnittstellen lag das *TSA1*-Gen nicht unter der Kontrolle des auf dem Plasmid vorhandenen MET3-Promotors, sondern wurde durch den eigenen Promotor reguliert. Unabhängige $\Delta tsa1$ -Mutante wurden sowohl mit dem resultierenden Vektor pCaEXP-*TSA1*, als auch mit dem leeren Vektor pCaEXP transformiert. Die Transformanten wurden auf SC-uri Medium selektiert und vereinzelt. Die Expression von *TSA1* in den rekonstituierten Stämmen wurde mittels Northern (Daten nicht gezeigt) und Western Blots überprüft (Abb. 04 B, Spur 4 und 11).

5.8 Biotinylierung

5.8.1 Analytischer Maßstab

Zellen von *C. albicans* aus Kulturen in YPD Medium und in α -MEM-Medium wurden mit Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert. Jeweils 25 ml Kultur wurden 5 min bei 3500 *g* (4300 upm, Rotor 2704, Biofuge 1.0R) bei 4 °C zentrifugiert und dreimal mit 40 ml PBS pH 7,4 gewaschen. Die Zellen wurden in 250 μ l Markierungspuffer 50 mM (NaHCO₃/Na₂CO₃ – HCl pH 8,5) welchem 10 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin zugegeben wurde, 2 h auf einem Überkopf-Rotierrad inkubiert. Um nach der Markierungsreaktion noch vorhandenes Sulfo-NHS-LC-Biotin zu inaktivieren, wurde zu den Ansätzen 0,5 ml Inaktivierungspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0) gegeben und wiederum auf dem Überkopf-Rotierrad für 1 h inkubiert. Die markierten Zellen wurden dreimal in

40 ml PBS gewaschen, bevor sie mechanisch mit Glasperlen in Aufschlusspuffer (PBS pH 7,4, 1 % Nonident P40, 0,1 % SDS) aufgeschlossen wurden. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4 °C ausgeführt.

5.8.2 Präparativer Maßstab

Die Zellwand-Proteine von *C. albicans* wurden aus Kulturen, die in YPD oder in α -MEM gewachsen waren, mit Biotin markiert. Jeweils 1800 ml Kultur wurde auf vier Zentrifugenbecher (500 ml) verteilt, 15 min bei 6400 g (6000 upm, Rotor JA-10, Beckman JS-21) zentrifugiert und dreimal mit ausreichend PBS pH 7,4 pro Zentrifugenbecher gewaschen. Beim drittenmal Waschen wurden die Zellen auf vier Zentrifugenröhrchen à 50 ml verteilt. Die Zellen wurden je nach Volumina der Zellpellets nach Zentrifugation in Markierungspuffer resuspendiert. Dazu wurden pro Milliliter Zellpellet 0,2 ml Markierungspuffer mit ebenfalls 10 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin gegeben und 2 h auf einem Überkopf-Rotiergerät inkubiert. Zur Inaktivierung des Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde jeweils die doppelte Menge Inaktivierungspuffer zugegeben und unter gleichen Bedingungen für 1 h inkubiert. Die markierten Zellen wurden dreimal in ausreichend PBS gewaschen, bevor sie mechanisch mittels French Press in Aufschlusspuffer (s. o.) aufgeschlossen wurden. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis oder bei 4 °C ausgeführt.

5.8.3 Aufreinigung

Um eine Reinigung und Konzentrierung der Zellwand-Proteine aus dem Protein-Extrakt zu erhalten, wurde der Rohextrakt über Neutravidinsepharose gereinigt. Das Protein Neutravidin bindet spezifisch Biotin, wobei die Aufreinigung biotinylierter Proteine durch die Immobilisierung des Neutravidins an unlösliche Sepharosekügelchen und anschließender Elution erfolgt. Bei Neutravidin handelt es sich um ein verkürztes Streptavidin. Durch die Verkürzung wurden unspezifische Wechselwirkungen herabgesetzt. Die Kapazität der hergestellten Neutravidinsepharose betrug 3–4 mg Neutravidin pro ml Matrix. Für die Herstellung von 5 ml Neutravidinsepharose wurden 20 mg Neutravidin in 10 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃ pH 8,3 mit 0,5 M NaCl) gelöst (4 mg/ml Gel). 1,45 g Sepharose (1 g ergibt ungefähr 3,5 ml Gel) wurde auf eine Glasfritte gegeben und durch Zugabe von 1 mM HCl hydratisiert und mehrmals mit insgesamt 400 ml 1 mM HCL gewaschen. Die gequollene Sepharose wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit Kopplungspuffer versetzt, der das

Neutravidin enthielt, und für 2 h bei RT überkopf-rotiert. Überschüssiges Neutravidin wurde zweimal mit je 12 ml Kopplungspuffer gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei RT mit 3500 g, 4300 upm, Rotor 2704, Biofuge 1.0R). Verbliebene aktivierte Gruppen der Sepharose wurden durch zweistündige Inkubation in 12 ml Blockierungspuffer bei RT auf dem Rotierrad geblockt. Das Produkt wurde jeweils dreimal alternierend mit je 40 ml 0,1 M Natriumacetat pH 4,0 mit 0,5 M NaCl und 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 mit 0,5 M NaCl gewaschen und bei 4 °C in 5 ml PBS pH 7,4 mit 0,02 % Natriumazid gelagert. Die biotinylierten Extrakte wurden zu 3 ml Neutravidinsepharose gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopf-Rotierrad. Anschließend wurde viermal in 40 ml kaltem Aufschlusspuffer (s. S. 31) gewaschen. (Zentrifugation: 5 min bei 4 °C mit 3500 g, entspricht 4300 upm, Rotor 2704, Biofuge 1.0R). Eluiert wurde zweimal mit 2,5 ml zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer unter den gleichen Bedingungen wie im analytischen Maßstab. Die Eluate wurden vereinigt.

5.9 Proteinextraktion

5.9.1 Analytischer Maßstab

Im analytischen Maßstab war die Ausbeute an extrahiertem Protein mittels mechanischem Glasperlenaufschluss ausreichend. Zu einem Volumen Zellpellet wurde das doppelte Volumen Glasperlen und das einfache Volumen Aufschlusspuffer (s. S. 31) gegeben. Der Ansatz wurde zweimal 7 min auf dem Vortex-Gerät gemischt, zwischen den Arbeitsschritten wurde der Ansatz 5 min auf Eis gestellt, da sich die Homogenate durch die mechanische Beanspruchung erwärmen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 5 min bei 4 °C und 3500 g (3000 upm, Rotor 2704, Biofuge 1.0R) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Homogenate wurden nochmals durch Zentrifugation 10 min bei 16000 g (13000 upm, Rotor 3325, Biofuge pico) bei 4 °C gereinigt.

5.9.2 Präparativer Maßstab

Die Ausbeute an extrahierten Proteinen musste für präparative Aufreinigungen so hoch wie möglich sein, weshalb der Aufschluss mittels French Press gewählt wurde. Das nach der Biotinylierung resultierende Zellpellet wurde in einem Volumen Aufschlusspuffer suspendiert und in 40 ml Aliquots geteilt. Die Zellen bzw. Hyphen wur-

den in je drei Zyklen mit $1,5 \cdot 10^6$ hPa (1500 bar) Arbeitsdruck aufgeschlossen (angezeigter Druck am Gerät: 1500 psi). Zwischen den Zyklen wurden die Homogenate 5 min auf Eis gekühlt, um Überhitzung vorzubeugen. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C mit 12100 g (10000 upm, Rotor JA-20, Beckman JS-21) nochmals gereinigt.

5.9.3 Extraktion von Zellwand-Proteinen mittels Glukanase

Hyphenzellen von SC 5314 (WT) und Can312 (*Atsa1*) wurden über Nacht in α -MEM bei 37 °C kultiviert und biotinyliert (Abschnitt 5.8). Anschließend wurden gleiche Zellmengen (0,2 - 0,3 g Biofeuchtmasse) in 500 μ l 50mM Tris-HCl pH7,5 resuspendiert und 500U β -1,3-Glukanase (Quantazym, QBiozyme) pro g Biofeuchtmasse zugegeben. Die Zellen wurden für 90 min im Heizblock bei 37 °C inkubiert und die resultierenden Glukanase-Extrakte 10 min bei 4 °C zentrifugiert (16000 g bzw. 13000 upm, Rotor 3325, Biofuge pico). Die Überstände wurden sofort für die Immunpräzipitation eingesetzt (Abschnitt 5.15.5).

5.10 Proteinfällung

Um im präparativen Maßstab sämtliches aufgereinigtes Protein mittels SDS-Gelelektrophorese auftrennen zu können, wurden Eluate durch Fällung des Protein mit Aceton aufkonzentriert. Neben einer Konzentrierung der Probe fand durch eine Proteinfällung eine starke Entsalzung der Proteine statt, da nur die Proteine präzipitiert wurden, Salze aber gelöst blieben.

Dazu wurde die fünffache Menge an 100 % Aceton (-20 °C) zu den Eluaten gegeben, kurz gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde in Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Nalgene, Rochester, USA) 20 min bei 4 °C mit 23 700 g (14000 upm, Rotor JA-20, Beckman JS-21) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne das Proteinpellet zu beschädigen. Das Pellet wurde einige Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 60 μ l SDS-Probenpuffer gelöst.

Eine TCA-Fällungsmethode wurde gewählt, um sezernierte Proteine im Kulturüberstand zu analysieren. Dazu wurden 10 – 20 ml des Kulturüberstandes mit 60 % TCA (-20 °C) zu einer Endkonzentration von 6 % versetzt. Als Fällungsadjuvanz wurde 0,02 % Natrium-Dioxycholat eingesetzt. Die Proteine wurden über Nacht auf Eis gefällt, bei 10 000 g zentrifugiert, zweimal mit eiskaltem Aceton gepuffert in 50 mM Tris-

HCl pH 7.5 gewaschen und in einer geringen Menge Wasser resuspendiert (ca. 1/25 des gefällten Kulturüberstandes). Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.11 Proteinfärbung

5.11.1 Silberfärbung

Die Isolate biotinylierter Proteine von analytischen Aufreinigungen wurden mittels ammoniakalischer Silbernitratlösung gefärbt.

Fixierlösung I:	Ethanol:Essigsäure:Wasser (40:10:50)
Fixierlösung II:	Ethanol:Essigsäure:Wasser (5:5:90)
Inkubationlösung I:	0,5 M Natriumacetat, 1 % Glutardaldehyd in H ₂ O
Inkubationslösung II:	0,05 % Naphtalindisulfonsäure in H ₂ O
Silbernitratlösung:	0,32 g AgNO ₃ , 8,5 ml H ₂ O, 0,5 ml Ammoniak (25 %) und 80 µl 10 N NaOH mit H ₂ O auf 40 ml auffüllen
Entwicklerlösung:	0,1 % Formaldehyd, 0,01 % Natriumcitrat in H ₂ O
Stopplösung:	5 % Tris, 2 % Essigsäure

Alle Inkubationen erfolgten bei RT auf einem Orbitalschüttler mit 30 - 40 upm.

Die Fixierung der Proteine im Gel erfolgte für eine Stunde in Fixierlösung I und anschließend für 2 h oder über Nacht in Fixierlösung II. Die Gele wurden 5 min in H₂O gewaschen und in Inkubationslösung I inkubiert. Anschließend wurde nochmals dreimal 10 min in H₂O gewaschen. Um eine homogene Färbung der Gele zu erreichen, wurden sie zweimal 30 min in Inkubationslösung II inkubiert. Überschüssige Naphtalindisulfonsäure wurde durch viermaliges Waschen mit H₂O für je 15 min entfernt. In einer frisch angesetzten ammoniakalischen Silbernitratlösung wurden die Gele 30 min gefärbt. Zur Herstellung dieser Lösung wurden in eine Lösung aus 8,5 ml H₂O, 0,5 ml Ammoniak (25 %) und 80 µl 10 N NaOH 0,32 g in 3 ml H₂O gelöstes Silbernitrat langsam hinzupipettiert und mit H₂O auf 40 ml aufgefüllt. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch dreimaliges Waschen mit H₂O für je 4 min entfernt. Die Gele wurden in Entwicklerlösung ca. 1 - 2 min

gegeben und sobald eine leichte Hintergrundfärbung auftrat, wurden die Gele in Stopplösung überführt. Die Gele wurden in H₂O gelagert oder in einem Vakuum-Trockner 1,5 h bei 65 °C zwischen Zellophanfolien getrocknet.

5.11.2 Coomassiefärbung

Die Isolate biotinylierter Proteine von präparativen Aufreinigungen sowie die Isolate präparativer Immunpräzipitationen mit Anti-TSA Antikörper wurden mittels Coomassie Blau (CBB) Färbung gefärbt.

Die Polyacrylamidgele wurden für 1 – 2 h in Färbelösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % CBB R 250) inkubiert und unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) 6 - 8 h der Hintergrund entfärbt. Anschließend wurden die Gele achtmal 30 min gewässert.

5.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5.12.1 1-dimensional

Für 1-dimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D SDS-PAGE) wurde das System „Mini Protean[®] Cell“ von BioRad, München eingesetzt (50), (40).

5.12.2 2-dimensional

Zur Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension wurden Immobilisierte pH Gradienten (IPG) Gele (Amersham-Pharmacia, Freiburg) verwendet. Es wurden Gele der Länge 7 cm mit einem linearen pH Bereich von 3 - 10 verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem IPGphorTM Isoelectric Focusing System (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Die Rehydratisierung, Beladung des Gels mit der Probe und die isoelektrische Fokussierung wurden in einem Schritt durchgeführt (51).

Die Probe wurde in Rehydratisierungspuffer (8 M Harnstoff, 4 % CHAPS, 2 % Pharmalyte 3-10 (Amersham)) auf das benötigte Volumen von 125 µl aufgefüllt und in die Gelhalterung eingefüllt. Nach Entfernen der Schutzfolie wurde das IPG-Gel mit der Gelseite nach unten unter Vermeidung von Luftblaseneinschluss in die Halterung gelegt. Um die Verdunstung der Probe zu minimieren und Kristallisation des Harnstoffs in der Probe zu verhindern, wurde das Gel mit 125 µl Paraffinöl überschichtet. Das saure Ende des Gels wurde mit der Anode, das basische Ende mit der Kathode

verbunden. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur, 20 °C; Stromstärke pro Gel, 50 µA; Rehydratisierung, 10 Stunden, 50 V; Spannungsverlauf, 1 Stunde, 500 V; 1 Stunde, 1500 V, 12 Stunden, 5000 V. Nach Erreichen von 15 KVh war die Fokussierung abgeschlossen.

Um die fokussierten Proteine zur Auftrennung in der zweiten Dimension zu solubilisieren, negativ zu laden und die vollständige Reduktion der denaturierten Proteine zu erhalten, wurden die Gele zunächst in 5 ml Equilibrierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerin 2 % SDS; Spatelspitze Bromphenolblau) mit 50 mg DTT bei RT mit leichter Agitation 15 min inkubiert. Um Oxidation der Proteine während der SDS-PAGE zu vermeiden, wurden die reduzierten SH-Gruppen mittels 150 mg Jodacetamid in 5 ml Equilibrierungspuffer 15 min inkubiert. Das equilibrierte Gel der isoelektrischen Fokussierung wurde auf ein Polyacrylamidgel gelegt, so dass das Plastikrückgrat am Glas der Gelkassette zu liegen kam. Das Gel der ersten Dimension wurde mit 1 %iger Agarose / H₂O Lösung fixiert.

5.13 Western Blot

Zur spezifischen Detektion biotinylierter Proteine, Gfp-Fusionen und TSA1p wurden Proteine mittels PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (Immobilin P, Millipore) transferiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Peroxidasekonjugate (POD). Durch die gebundene Peroxidase wurde Luminol (ECLplus Kit, Amersham-Pharmacia, Freiburg) umgesetzt und die entstehende Chemolumineszenz mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo). Freie Bindestellen der PVDF-Membranen wurden nach dem Transfer mit 5 % Magermilchpulver in PBS mit 0,05 % Tween 20 (PBST) 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln blockiert und nach jedem Inkubationsschritt dreimal 10 min in PBST gewaschen. Inkubation mit Streptavidin-POD oder Anti-TSA-Antikörpern erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

Streptavidin-POD (1 mg/ml): 1:2000 in PBST 1% BSA, 1 h RT

Anti-TSA-Serum oder affinitätsgereinigter Antikörper

Tier1: 1:5000 in PBST-BSA, 1 h RT

Tier 2: 1:10000 in PBST-BSA, 1 h RT

Anti-Kaninchen IgG-POD: 1:10000 in PBST-BSA, 30 min RT

Die Belichtungszeiten waren abhängig von der eingesetzten Probe. Sie lagen im Durchschnitt zwischen 5 bis 10 s, max. bis 30 s.

5.14 Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der Proteine wurden die coomassie-gefärbten Banden (Abb. 05) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und 6 h bei 37 °C mit Trypsin verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mit 0,1 % Trifluoressigsäure in 60 % Acetonitril eluiert, die eluierten Fraktionen vereinigt und lyophilisiert. Anschließend wurden die Peptide in 20 µl Ameisensäure und 80 µl H₂O aufgenommen. Im Falle von Tef1p, Gap1p and Adh1p wurden die Peptide mittels hydrophober HPLC (Smart System, Amersham Pharmacia, Freiburg) auf einer 2 X 100 mm RP 18/110/2 µm Chromatographie-Säule (TSK Super ODS) getrennt. Dabei wurde ein Gradient von 3 – 60 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure angewendet. Die Masse der separierten Peptide wurde mittels MALDI-TOF (GSG Future, Bruchsal) analysiert und die Aminosäuresequenz durch Mikrosequenzierung bestimmt (Top-Lab, München). Die anderen Proteine wurden ebenfalls mit Trypsin verdaut und massenspektroskopisch mittels der Peptid-Massen identifiziert (Top-Lab, München).

5.15 Charakterisierung eines polyklonalen Anti-Tsa1p-Antikörpers

Zur Untersuchung der Lokalisation und Regulation von Tsa1p auf Proteinebene sowie zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner wurde ein polyklonaler Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper (TSA-Antikörper) hergestellt.

5.15.1 Auswahl der Peptide und Koppelung an KLH

Anhand der 3D-Struktur eines hochhomologen TSA-ähnlichen Proteins der Ratte (52), wurden Sequenzbereiche des Moleküls ausgewählt, die für Antikörper zugänglich auf der Oberfläche lagen. Durch Sequenzanalysen wurde festgestellt, dass die gewählten Bereiche homolog, jedoch nicht identisch mit *C. albicans* Tsa1p waren. Aus diesem Bereich wurden zwei Peptidsequenzen der Länge 10 (Peptid 10) und 12 (Peptid 12) Aminosäuren gewählt und synthetisiert (je 20 mg, >70 % Reinheit; Thermo Electron Corporation, Ulm) (Abb. 03).

Je 3 mg der Peptide in 300 µl PBS wurde an 3 mg Keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma Aldrich, Taufkirchen) in 300 µl H₂O gekoppelt. Die Kopplung erfolgte zunächst bei RT durch fünfmalige Zugabe von je 2,4 µl 5 % Glutaraldehyd (Endkonzentration ca. 10 mM) in Abständen von 5 min. Der Reaktionsmix wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Blockierung erfolgte mit 24 µl 1 M Glycin pH 8,5. Die gekoppelten Peptide wurden vereinigt und je zur Hälfte pro Tier verwendet.

```
MAPVVQQPAPSFKKTAVVDGVFEEVTLEQYK GKWVLLAFIPLAFTFVCPS
EIIAYSEAVKKFAEKDAQVLFASTDSEYTWLAWTNVARKDGGIGKVDFPV
LADTNHSLSRDYGVLIEEEGVALRGIFLIDPKGVLRQITINDLPVGRSVE
ESLRLLEAFQFTEKYGEVCPANWHPGDETIKPSPEASKEYFNKVNK
```

Abbildung 03: Aminosäuresequenz von Tsa1p aus *C. albicans*.

Die Sequenzen, die für die Peptide ausgesucht wurden, sind unterstrichen.

5.15.2 Immunisierung der Kaninchen

Zwei Kaninchen wurden im Abstand von 30 Tagen insgesamt viermal immunisiert (Pineda, Berlin). Präimmunserum, Serum vom Immunisierungstag 61, 90 und 120 wurde charakterisiert (Abb. 04).

5.15.3 Affinitätsreinigung

Immobilisierte Peptide für die Affinitätsreinigung der TSA-Antikörper wurden mittels CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben der Firma hergestellt. 0,3 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in ein Röhrchen gegeben und 15 min in 1 mM HCl quellen gelassen, so dass die Kügelchen bedeckt waren. Anschließend wurde die Sepharose mehrmals mit insgesamt 300 ml 1 mM HCl und danach mit 7,5 ml 100 mM NaHCO₃ 0,5 M NaCl pH 8,3 (Bindungspuffer) gewaschen. Je 2,5 mg von Peptid 10 und Peptid 12 wurden in 2 ml Bindungspuffer gelöst, zu der gewaschenen Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotierad inkubiert. Überschüssiges Peptid wurde durch einmaliges Waschen mit 5 ml Bindungspuffer entfernt und die noch verbliebenen aktiven Gruppen mit 1 M Ethanolamin pH 8,0 für 2 h blockiert. Die Sepharose wurde abwechselnd jeweils mindestens dreimal mit dem fünffachen Gelvolumen mit 0,1 M Na-Acetat 0,5 M NaCl pH4 und 0,1 M Tris-HCl 0,5 M NaCl pH 8,0 gewaschen. Die Affinitätsmatrix wurde noch zweimal in PBS pH 7,4 gewaschen und bei 4 °C mit 0,02 % (w/v) Azid gelagert.

Pro Aufreinigung wurden 3 ml Serum der TSA-Antikörper verwendet. Inkubation erfolgte rotierend über Nacht bei 4 °C, dreimal wurde mit PBS pH 7,4 gewaschen, zuerst mit 0,1 M Glycin pH 2,8 und anschließend mit 0,1 M Triethylamin pH 11,5 eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen je 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8,8 (für 0,1 M Glycin pH 2,8) oder 50 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8 (für 0,1 M Triethylamin pH 11) vorgelegt wurde. Insgesamt wurden jeweils zehn Fraktionen gesammelt. Diese wurden bei 280 nm in einer Quarz-Küvette vermessen und die Fraktionen mit den höchsten Extinktionen vereinigt und gegen PBS pH 7,4 dialysiert. Die Dialyse erfolgte einmal für 2 h und einmal über Nacht bei 4 °C in je 2 l PBS. In allen Aufreinigungen wurden Fraktionen 1-3 der Elutionen mit 0,1 M Glycin pH 2,8 vereinigt und dialysiert. Die Elutionen mit 0,1 M Triethylamin pH 11,5 enthielten keinen Antikörper. Die affinitätsgereinigten und dialysierten TSA-Antikörper wurden mit 0,02 % (w/v) Azid versetzt und bei 4 °C gelagert.

5.15.4 Charakterisierung

TSA-Antikörper im Serum und die affinitätsgereinigten TSA-Antikörper (Abschnitt 5.15.3) wurden bezüglich ihrer Spezifität getestet. Mittels Western Blot wurde ein geeigneter Titer der Antiseren der Tiere 1 und 2 ermittelt, der auch für die jeweiligen affinitätsgereinigten Antikörper eingesetzt wurde (Abb. 04 A). Pro Spur wurde 10 µg Protein aus Zellextrakten YPD 30 °C aufgetragen. TSA-Antikörper Tier 1 wurde in den folgenden Experimenten 1:5000 und TSA-Antikörper Tier 2 1:10000 verdünnt eingesetzt. TSA-Antikörper Tier 1 detektiert eine Doppelbande (Abb. 04 A, Spur 4 und 5). Dabei könnte es sich um die oxidierte und reduzierte Form von Tsa1p handeln (29). Der TSA-Antikörper Tier 1 erkennt möglicherweise die oxidierte Form besser als der TSA-Antikörper Tier 2. Dennoch erkennt auch der TSA-Antikörper Tier 2 die oxidierte Form, wie durch Immunpräzipitation und anschließender coomassiegefärbter 2D-PAGE gezeigt wurde (zwei Protein-Spots, Abb. 15).

Im folgenden wurden die TSA-Antikörper von Tier 1 und Tier 2 als TSA-Antikörper 1 und 2 bezeichnet. Mittels Präimmunsereen konnten in Proteinextrakten keine prominenten Banden identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden affinitätsgereinigte TSA-Antikörper untersucht. Die ermittelten Verdünnungen wurden eingesetzt. Das Signal ließ sich durch Überschuss an Peptid vollständig kompetitieren (Abb. 04 B, Spur 2 und 8) und die Tsa1p-Bande fehlt im Extrakt der *Δtsa1-*

Mutante Can312 (Abb. 04 B, Spur 3 und 10), erscheint jedoch in rekonstituierten $\Delta tsa1$ -Mutante Can313 wieder (Abb. 04 B, Spur 4 und 11). Durch nicht-reduzierende Auftragung ohne β -Mercaptoethanol (Abb. 04 B, Spur 6 und 13) werden durch beide Antiseren wahrscheinlich dimere Komplexe von Tsa1p vergleichbar mit Tsa1p-Dimeren in *S. cerevisiae* erkannt (siehe Ergebnisse).

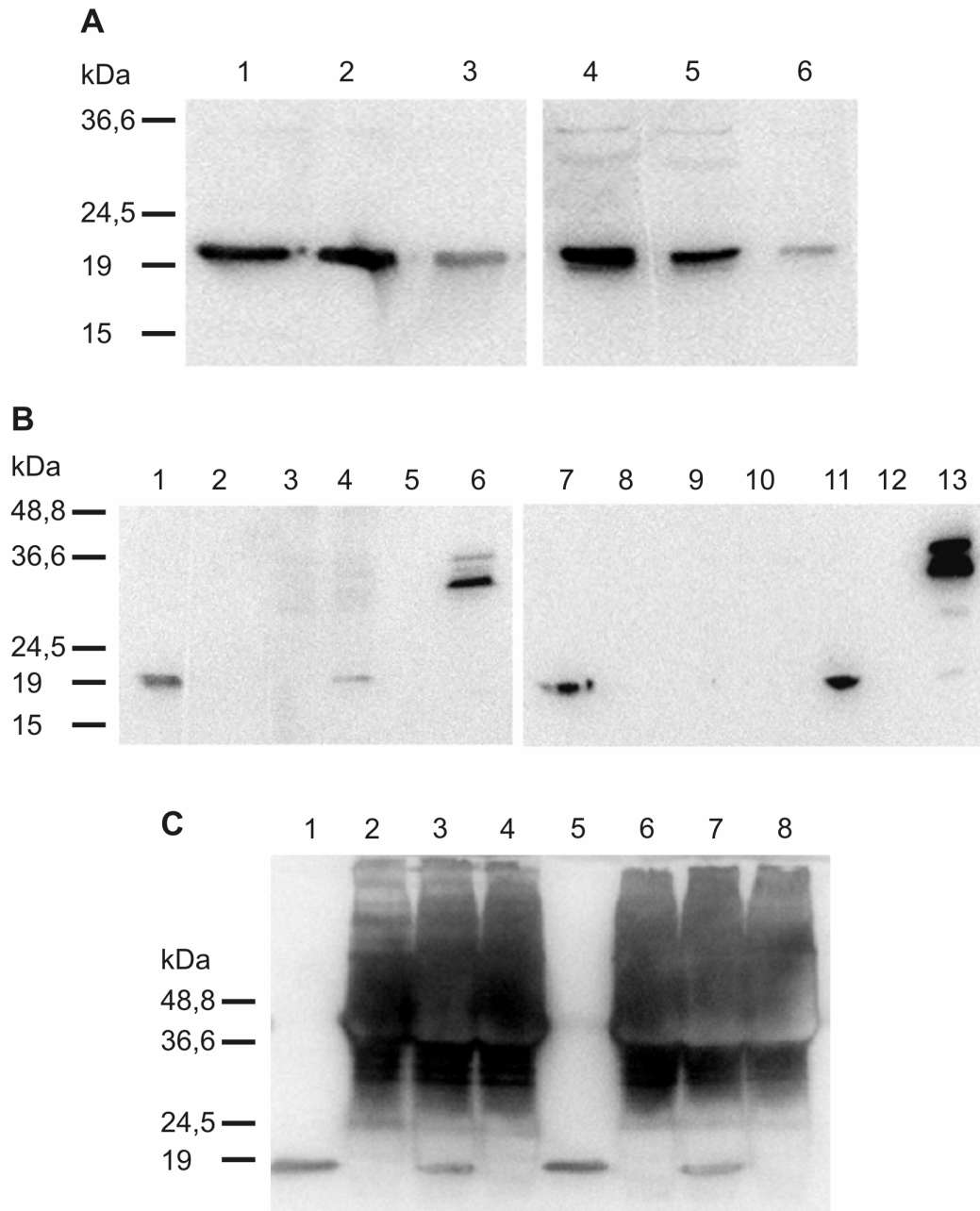


Abbildung 04: Charakterisierung der polyklonalen Anti-TSA-Antikörper.

A: Ermittlung der geeigneten Verdünnung der TSA-Antikörper (Tier 1 und 2) mittels Western Blot. 10 µg Gesamtprotein aus Proteinextrakten von SC 5314 (WT) wurden pro Spur eingesetzt. Tier 2, Spur 1 - 3. Tier 1; Spur 4 - 6. Verdünnungen: Spur 1 und 4: 1:5000; Spur 2 und 5: 1:10000; Spur 3 und 6: 1:20000.

B: Kontrolle der Spezifität der affinitätsgereinigten TSA-Antikörper 1 und 2. Tier 1, Spur 1 - 6, 1:5000. Tier 2, Spur 7 - 13, 1:10000. Spur 5,9,12 sind leer; sonst jeweils 10 µg Proteinextrakt. Spur 1,2 und 6 sowie 7,8 und 13 SC 5314 (WT); Spur 2 und 8: Konkurrenz mit je 20 µg Peptid 10 und Peptid 12 (ca. 2000fach molarer Überschuss); Spur 3 und 10 *Δtsa1* (Can312); Spur 4 und 11 *Δtsa*-pCaExp-TSA1 (Can313). Spur 1 - 4 und 7 - 11: reduzierender Probenpuffer (β-Mercaptoethanol); Spur 6 und 13: nicht-reduzierender Probenpuffer. Antikörper beider Tiere sind spezifisch für Tsa1p. Das Signal lässt sich durch Überschuss an Peptid vollständig kompetieren und die spezifische Bande fehlt im Extrakt der *Δtsa1* (Can312), erscheint jedoch in der Revertante (Can313) wieder. Durch nicht-reduzierende Auftragung wurden wahrscheinlich dimere Komplexe von Tsa1p vergleichbar mit Tsa1p-Dimeren in *S. cerevisiae* detektiert.

C: Immunpräzipitation (IP) mit TSA-Antikörper 1 und 2. Detektion mit affinitätsgereinigtem TSA-Antikörper 2 (1:10000). Spur 1 und 5: 10 µg Proteinextrakt SC 5314. Spur 2 - 4 und Spur 6 - 8: Je 10 µl Eluat von Immunpräzipitationen mit Proteinextrakten aus SC 5314 (Spur 2,3,6 und 7) und aus *Δtsa1* Can312 (Spur 4 und 8); IP mit Präimmunserum 1 und 2 (Spur 2 und 6), IP mit Antikörper 1 (Spur 3 und 4) und Antikörper 2 (Spur 7 und 8). Beide Antikörper präzipitieren Tsa1p mit Wildtyp- nicht jedoch mit *Δtsa1*-Proteinextrakten. Die Präimmunseren präzipitieren Tsa1p ebenfalls nicht. Die Kaninchen-IgGs der Präzipitationen werden durch den Zweit-Antikörper (Anti-Kaninchen) erkannt, Hauptbande bei ca 50 kDa (schwere Kette) und 25 kDa (leichte Kette).

5.15.5 Immunpräzipitation

Die Fähigkeit der TSA-Antikörper Tsa1p zu präzipitieren, wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden für analytische Zwecke je 15 µl affinitätsgereinigter TSA-Antikörper an 10 µl Protein-A-Sepharose (Amersham Pharmacia, Freiburg) und in präparativen Ansätzen 1 ml affinitätsgereinigter TSA-Antikörper an 200 µl Protein-A-Sepharose gebunden. Die entsprechende Menge affinitätsgereinigter TSA-Antikörper wurde in 100 µl PBS, 0,5 % Milchpulver aufgenommen und zu Protein-A-Sepharose gegeben, die zuvor zweimal in PBS gewaschen wurde. Die Inkubation erfolgte 2 h bei 4 °C auf dem Rotiergerät. Anschließend wurde in PBS pH 7,4, 1 % Nonidet P40, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl (IP-Puffer) gewaschen und je 100 µg Protein aus Extrakt eingesetzt. Für den Zellaufschluss mittels Glasperlen und für die Präzipitation wurde IP-Puffer verwendet. Nach 2 h Rotiergerät bei 4 °C wurde die Protein-A-Sepharose viermal mit IP-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Der letzte Waschschrift diente zur Entfer-

nung der Detergenzien. Eluiert wurden die Präzipitate zweimal mit SDS-Probenpuffer. Die Eluate wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um zu überprüfen, ob Tsa1p tatsächlich gefällt wurde. Für die Immunpräzipitationen wurden stets frisch hergestellte Proteinextrakte verwendet, die zuvor nicht bei -20 °C gelagert wurden.

Sowohl TSA-Antikörper 1 als auch TSA-Antikörper 2 waren für Immunpräzipitationen geeignet (Abb. 04 C). Tsa1p wurde in den Western Blots mittels affinitätsgereinigtem TSA-Antikörper 1 und anschließend mittels Anti-Kaninchen IgG detektiert. Somit wurden die in den Präzipitationen eingesetzten TSA-Antikörper ebenfalls durch die sekundären Anti-Kaninchen IgGs detektiert (Hauptbande ca. 50 kDa, schwere Kette und 25 kDa, leichte Kette). Beide Antikörper präzipitieren Tsa1p mit Extrakten aus Wildtypzellen (Abb 04 C, Spur 3 und 7) nicht jedoch aus $\Delta tsa1$ -Mutanten (Abb. 04 C, Spur 4 und 8). Die Präimmunseren dagegen präzipitierten Tsa1p nicht (Abb. 04 C, Spur 2 und 6).

Für die folgenden Experimente wurde des besseren Titers wegen affinitätsgereinigter TSA-Antikörper 2 verwendet. Dennoch waren beide TSA-Antikörper für Untersuchungen mittels Western Blot und Immunpräzipitation geeignet.

5.16 Bindungsstudien zytosolischer Proteine an der Zellwand intakter Zellen

Zytosolische Proteinextrakte wurden von Wildtypzellen (SC 5314) und vom Stamm TG6 (Can257), der Tsa1p-Gfp exprimiert, hergestellt.

Gleiche Mengen hyphaler Wildtypzellen wurden eingesetzt (0,3 g Biofeuchtmasse). Die Zellen wurden in zytosolischem Extrakt von TG6, der in Bindungspuffer (50 mM NaHCO₃ pH 8,5) angefertigt wurde, für 3 h bei 4 °C auf dem Rotierrad inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge Zellen nur in Bindungspuffer ohne Proteinextrakt unter den selben Bedingungen inkubiert. Nach drei Waschschritten in kaltem PBS pH 7,4 wurden die Zellen biotinyliert, Protein extrahiert und die markierten Proteine mittels Neutravidin-Sepharose gereinigt. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Um die Proteinbandenmuster der Präparationen der Zelloberflächenproteine sowie der zytosolischen Extrakte vergleichen zu können, wurden die zytosolischen Extrakte biotinyliert und auf die gleiche Weise analysiert. Eine Präparation der Zelloberflächenproteine von TG 6 wurde durchgeführt, wobei ebenfalls 0,3 g

Biofeuchtmasse von Hyphen eingesetzt wurden. 1/50 des zytosolischen Extrakts und je 1/6 der gesamten Präparationen der Zelloberflächenproteine wurden im Gel analysiert. Gele wurden auch auf PVDF-Membran transferiert und mit polyklonalem Anti-Gfp Serum detektiert. Um die Proteinmenge der unterschiedlichen Ansätze abschätzen zu können, wurden die Blots mit Streptavidin-POD entwickelt.

Blastosporen wurden ebenfalls in zytosolischen Extrakten von Wildtypzellen in Bindungspuffer inkubiert und anschließend biotinyliert. Präparationen der Zelloberflächenproteine wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Abschnitt 5.7).

5.17 Mikroskopie

Zellen wurden nach Kultivierung geerntet, entweder einmal in PBS pH 7,4 gewaschen oder direkt im jeweiligen Medium mittels Formaldehyd (3,7 % Endkonzentration) für 10 min bei RT fixiert. Fixierte Zellen wurden bei 380 g (2000 upm, Eppifuge) zentrifugiert und in PBS pH 7,4 mit 1 mg ml⁻¹ BSA (PBS/BSA) resuspendiert und für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Biotinylierung wurde mittels Anti-Biotin IgG (Klon BN 34) detektiert, wobei der Antikörper für 1 h bei einer Konzentration von 43 µg ml⁻¹ in PBS/BSA eingesetzt wurde. Es folgten drei Waschschritte in PBS/BSA und Inkubation mit Alexa Fluor 546 Anti-Maus IgG für 1 h bei 20 µg ml⁻¹. Die Zellen wurden nochmals dreimal in PBS/BSA gewaschen und auf polylysin-beschichteten Objektträgern immobilisiert. Die Einstellungen für die Anregungswellenlänge des Lasers und die Filterexitation lag bei 488 nm und 506 - 515 nm (nach(47)). Die Präparate wurde an einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP2) untersucht.

5.18 Transkriptionsanalysen mittels genomweiter DNA-Mikroarrays

Zur vergleichenden Analyse der Transkription wurde die *Δtsa1*-Deletionsmutante Can315 mit dem Wildtypstamm SC5314 verglichen. Gesamt-RNA beider Stämme wurde nach Kultivierung unter identischen Bedingungen isoliert. Die Kulturen wurden jeweils mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Drei Bedingungen wurden gewählt, unter welchen besondere Funktionen von *TSA1* vermutet wurden:

1. Referenzkultur
2. Oxidativer Stress
3. Hyphenbildung

Um eine Referenzkultur zu erhalten, wurden die Zellen für 6 h in YPD bei 30 °C kultiviert. Unter dieser Bedingung wachsen Wildtypzellen als Blastosporen. Oxidativer Stress wurde durch Zugabe von H₂O₂ (Endkonzentration 5 mM) erzeugt. Zellen wurden 5 h in YPD bei 30 °C inkubiert, mit H₂O₂ versetzt und nach einer weiteren Stunde die Gesamt-RNA isoliert. Hyphenbildung wurde durch sechsstündige Inkubation in α -MEM-Medium bei 37 °C erzielt.

Genomweite *C. albicans* DNA-Mikroarrays der Firma Eurogentec wurden verwendet, die freundlicherweise von Dr. Piet de Groot, Universität Amsterdam, zur Verfügung gestellt wurden.

Die Herstellung und Markierung von cDNA sowie die Hybridisierung der DNA-Mikroarrays wurde nach dem Standard-Protokol des Galar Fungail Konsortiums durchgeführt (Galar Fungail – Standard Operating Procedures 14/05/02, http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/). Die DNA-Mikroarrays wurden durch Zentrifugation getrocknet und mit einem Fluoreszenzscanner (GMS 418, Applied Precision) ausgelesen.

5.19 Funktionsanalyse von *TSA1* durch Sensitivitäts-Tests

Mittels Plattenassays wurden die Auswirkungen des Genverlusts von *TSA1* untersucht. Dazu wurden Δ *tsa1*-Mutanten (Can297, Can312 und Can314), rekonstituierte Δ *tsa1*-Mutanten (Can298, Can313 und Can315) und Wildtyp SC 5314 verglichen. Vorkulturen der zu vergleichenden Stämme wurden in YPD über Nacht bei 30 °C angezogen. Für die Berechnung von Verdünnungen wurde angenommen, dass ungefähr $3 \cdot 10^7$ Zellen eine OD₆₀₀ von 1 ergeben (Analog zu *S. cerevisiae*). Unter Berücksichtigung dieser Relation wurden die Vorkulturen in YPD so verdünnt, dass in 5 μ l 10⁶ Zellen vorhanden waren. Ausgehend von dieser Verdünnung wurde eine Verdünnungsreihe in YPD angelegt, wobei stets 1:5 verdünnt wurde. Jeweils 5 μ l der Verdünnungen wurden auf die entsprechenden Platten pipettiert, die mit den zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt waren (H₂O₂, DTT,

Menadion (Sigma, Taufkirchen), Diamid (Sigma, Taufkirchen) und CaCl_2). Die Platten wurden 1 bis 7 d bei 30 °C inkubiert.

5.19.1 Resistenz gegenüber Peroxynitriten

Um zu überprüfen, ob *Tsa1p* eine Rolle in der Beseitigung von Peroxynitriten zukommt, wurde zu vergleichende Stämme auf natruimnitrit-haltigen Agarplatten getestet. Dazu wurden 1 mM Natriumnitrit (NaNO_2) in YNB-Platten (2 % Glucose, pH 4,0, gepuffert durch 40 mM Bernsteinsäure) eingesetzt. Durch den niedrigen pH-Wert werden aus Nitriten Peroxynitrite freigesetzt.

5.19.2 Funktionen von *TSA1* im Zellwandaufbau

Der Einfluß von *TSA1* auf die Stabilität der Hyphenzellwand wurde durch den Einsatz von Agentien untersucht, welche die Zellwandarchitektur stören (Calcofluor White und Congo Red, Sigma, Taufkirchen). α -MEM-Agarplatten wurden verwendet, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calcofluor White und Congo Red versetzt waren und bei 37 °C inkubiert wurden. Verdünnungen von 10^8 Zellen wurden ausplattiert.

5.19.3 Einfluss von *TSA1* auf die Mutationsrate

Der Einfluss von *TSA1* auf die genetische Stabilität bzw. die Mutationsrate in *C. albicans* wurden in Plattenassays untersucht. Dazu wurden Δ *tsa1*-Mutanten (Can297 und Can312), rekonstituierte Δ *tsa1*-Mutanten (Can298 und Can313) und ein CAI4-Stamm (Can100), der ein *URA3*-Gen enthielt, verglichen. Da die genannten Stämme jeweils mit nur einer Kopie des *URA3*-Gens ausgestattet waren, konnte die Mutationshäufigkeit in diesem Gen festgestellt werden. Dazu wurde die positive Selektion mittels des Pyrimidin-Analogs 5-Fluoroorotsäure (5-FOA) gewählt (53). Stämme, die Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase (*URA3*) exprimieren, können in Medium mit 5-FOA nicht wachsen. Dahingegen wachsen *URA3*-defiziente Stämme normal. Die Stämme wurden über Nacht bei 30 °C in uridin-freiem SC-Medium kultiviert und in das gleiche Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Uridin mit einer OD_{600} 0,1 überführt, bis die Zellen ungefähr bis OD_{600} 1 gewachsen waren. Anschließend wurden gleiche Zellzahlen ($5 \cdot 10^6$) auf Platten mit SC-Medium, das 100 $\mu\text{g/ml}$ Uridin und 5-FOA enthielt, ausplattiert. Jeweils zwei Platten wurden ausplattiert und das Experiment mit zwei unabhängigen Δ *tsa1*-Mutanten durchgeführt (siehe oben). Der Mittelwert aus allen Expe-

rimenten wurde zur Berechnung der Mutationsrate herangezogen. Zur Kontrolle wurden Verdünnungen der Kulturen in Doppelbestimmungen auf YPD ausplattiert, so dass rechnerisch 50 Kolonien pro Platte entstehen sollten. In sämtlichen Experimenten lagen die Koloniezahlen zwischen 34 und 41. Die ausplattierte Gesamt-Zellzahl war somit zwischen 32 % und 18 % niedriger als die errechnete Zellzahl.

5.20 Virulenztest

Um die Fähigkeit zur Manifestation einer systemischen Kandidose von *Candida*-Stämmen *in vivo* zu testen, wurden Virulenzstudien am Versuchstier in Kooperation mit Dr. Klaus Schröppel an der Universität Erlangen durchgeführt. Es wurden Mäuse des Stammes Balb/c (Charles River) verwendet. Je fünf Mäusen wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen einer $\Delta tsa1$ -Mutante (Can312) über die Schwanzvene appliziert. Als Kontrollstamm diente die rekonstituierte $\Delta tsa1$ -Mutante (Can313). Die eingesetzte Anzahl von Zellen des Wildtypstammes führt in Balb/c-Mäusen in der Regel innerhalb von 14 Tagen zum Tod durch systemische Kandidose. Der Infektionsverlauf wurde anhand der Mortalitätsrate der infizierten Versuchstiere dokumentiert und gegen die Versuchsdauer aufgetragen.

6 Ergebnisse

6.1 Identifizierung von löslichen Zellwand-Proteinen

Die Zellwand von *C. albicans* und im besonderen Oberflächen-Proteine spielen eine essenzielle Rolle in der Pathogenität und Morphogenese (1). In zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass GPI-Proteine ein wichtiger Bestandteil der Virulenzmechanismen sind, die *C. albicans* zum erfolgreichsten krankheitserregenden Pilz machen (54,55). Darunter fällt z. B. Hwp1p – *Hyphal Wall Protein* – ein Protein, das über eine Isopeptid-Bindung eine kovalente Verbindung zum Wirtsgewebe herstellt und so die Adhäsion des Erregers an die Epithelzellen des Wirtes vermittelt (54). Die Zusammensetzung von GPI-Proteinen der Zellwand von Hyphen und Blastosporen unterscheiden sich stark (56).

Im Gegensatz zu den GPI-Proteinen wurden die löslichen Zellwand-Proteine und insbesondere ihre Regulation während der morphologischen Transition kaum untersucht. Für lösliche Zellwand-Proteine bietet sich die Analyse auf Proteinebene an. GPI-Proteine sind biochemisch schwer zugänglich, da sie kovalent an das unlösliche Zuckerpolymergerüst verankert und stark glykosyliert sind. Die löslichen Zellwand-Proteine hingegen können mittels Detergenz aus der unlöslichen Zellwandstruktur extrahiert werden und sind weniger stark posttranslational modifiziert (9). Zudem ist bereits bekannt, dass manche lösliche Zellwand-Proteine sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen. (57,58). Daher können z. B. durch Transkriptionsanalysen keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, unter welchen Bedingungen lösliche Zellwand-Proteine auf der Zelloberfläche lokalisieren.

Um einen Überblick über die Regulation und die Zusammensetzung der löslichen Zellwand-Proteine in den verschiedenen Wachstumsformen von *C. albicans* zu erhalten, wurde ein biochemischer Ansatz entwickelt. Der neue Ansatz unterschied sich insofern von vorhergehenden Untersuchungen (59), dass die Oberflächen-Proteine mittels eines aktivierten Biotinderivats spezifisch markiert wurden, welches aufgrund einer Sulfongruppe nicht die Plasmamembran durchdringt (60). Daher konnten mit Hilfe dieses Verfahrens extra- von intrazellulären Komponenten unterschieden werden. In vorhergehenden Studien wurde meist die Zellwand isoliert und die nicht-kovalenten Zellwand-Proteine daraus extrahiert (59). Durch diese Vorgehensweise kann nicht entschieden werden, ob die identifizierten Proteine tatsächlich extrazellu-

lär lokalisiert sind oder erst nach dem Aufschluss der Zellen an die Struktur der Zellwand gebunden haben (61). In dem hier beschriebenen Ansatz wurden die markierten löslichen Zellwand-Proteine mittels Detergenz aus der Zellwand mechanisch aufgeschlossener Zellen extrahiert und durch Affinitäts-Chromatographie vom nicht markierten Rest abgetrennt. Dafür wurde an Sepharosepartikel immobilisiertes Neutravidin verwendet. Das Biotin/Avidin System ist hochspezifisch und daher für diesen Zweck bestens geeignet (62). Somit konnten die biotinylierten Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und analysiert werden.

Ferner wurde die Methode im Rahmen meiner Diplomarbeit soweit optimiert und angepasst, dass lösliche Zellwand-Proteine aus beiden Wachstumsformen in solchen Mengen isoliert werden konnten, die deren Identifizierung ermöglichten.

6.1.1 Spezifität der Aufreinigung biotinylierter Proteine mittels Neutravidin Sepharose

Die Qualität der Aufreinigung der biotinylierten Proteine war in diesem Ansatz für deren Identifizierung entscheidend. Daher wurde die Spezifität unter den hier angewendeten Bedingungen experimentell überprüft. Dazu wurden Blastosporen biotinyliert, die Proteine extrahiert und die markierten Proteine isoliert. Im Vergleich dazu wurden Blastosporen der gleichen Prozedur unterzogen, jedoch ohne die Anwendung von Sulfo-Biotin.

Nach Aufreinigung mittels Neutravidin-Sepharose wurden gebundene Proteine entweder mit freiem d-Biotin im Überschuss oder mit SDS-Probenpuffer von der Affinitätsmatrix eluiert. Die eingesetzten Protein-Extrakte und die Eluate wurden jeweils mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 05). Die Eluate des biotinylierten Ansatzes wiesen im silbergefärbten Proteingel ein reproduzierbares Bandenmuster für Isolate von Wildtyp-Blastosporen auf (Abb. 05 A, Spur 5 und 6). Mittels d-Biotin konnte nicht quantitativ eluiert werden (Spur 5). Qualitativ ergab sich jedoch das gleiche Proteinmuster, wie bei der vollständigen Elution mit SDS-Probenpuffer. Die Eluate des nicht-biotinylierten Ansatzes hingegen enthielten kaum Proteine (Abb. 05 A, Spur 2 und 3).

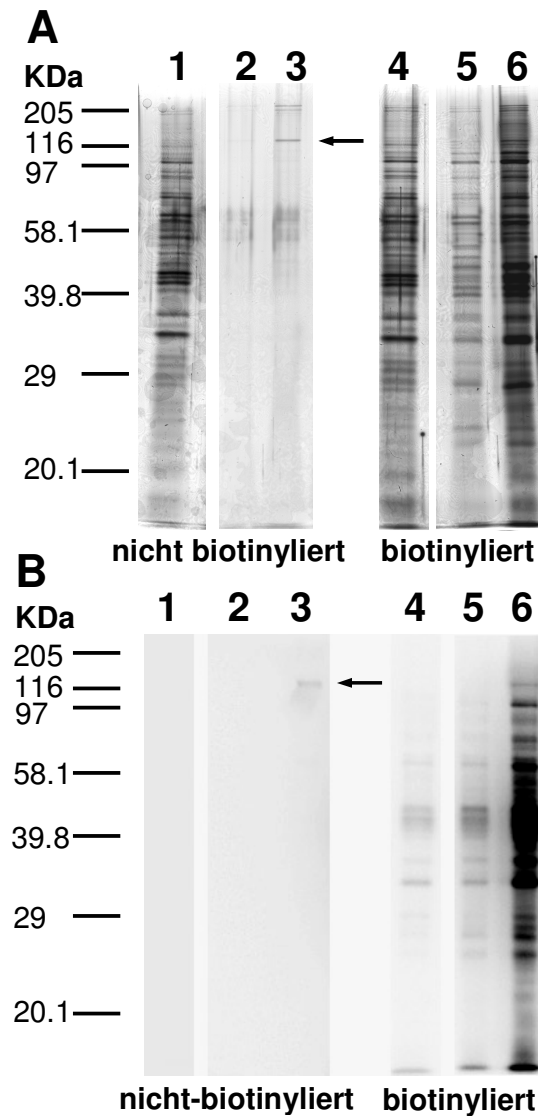


Abbildung 05: Anreicherung biotinylierter Proteine.

Wildtypzellen SC 5314 wurden mit Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert oder in Puffer inkubiert. Lösliche Zellwand-Proteine wurden extrahiert und mittels Neutravidin-Sepharose isoliert. Gebundene Proteine wurden mit einem Überschuss an d-Biotin oder mit SDS-Probenpuffer eluiert und mit SDS-PAGE analysiert, das entweder silbergefärbt (A) oder geblottet (B) wurde. Der Blot wurde mit Streptavidin-POD detektiert. Proteine stammen entweder von nicht-biotinylierten Zellen (Spur 1-3), oder von biotinylierten Zellen (Spur 4-6). Extrakte (Spur 1 und 4), Elution mit d-Biotin (Spur 2 und 5) und Elution mit SDS-Probenpuffer (Spur 3 und 6).

Der Western Blot (Abb. 05 B) entsprach den Ergebnissen der silbergefärbten Proteingele. Auch hier lieferten die Elutionen des biotinylierten Ansatzes das charakteristische Bandenmuster (Abb. 05 B, Spur 5 und 6), während im nicht-biotinylierten Ansatz nur sehr wenige Proteine detektiert wurden (Abb. 05 B, Spur 2 und 3). Wie sich

nach Identifizierung der Proteine herausstellte, handelte es sich bei einem dieser Proteine um Pyruvat Carboxylase Pyc2p, das Biotin als prosthetische Gruppe enthält (Abb 05, Pfeil).

Da die Elutionen mittels d-Biotin und SDS-Probenpuffer sowohl im silbergefärbten Polyacrylamidgel als auch im Western Blot qualitativ identische und reproduzierbare Bandenmuster ergaben, führte die Biotinylierung und Affinitätsreinigung zur spezifischen Anreicherung biotinylierter Proteine. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Wildtyp Hyphen erzielt (Daten nicht gezeigt).

6.1.2 Identifizierung der löslichen Zellwand-Proteine

Da die morphologische Flexibilität ein wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* darstellt, bieten Kenntnisse über die Zusammensetzung der löslichen Zellwand-Proteine in den unterschiedlichen Wachstumsformen eventuell die Möglichkeit zur Identifizierung neuer Angriffsziele für bessere Therapeutika. Daher wurden lösliche Zellwand-Proteine sowohl in Blastosporen als auch in hyphalen Zellen untersucht. Proteinbanden wurden aus präparativen Polyacrylamidgelen mit einem Skalpell ausgeschnitten, enzymatisch verdaut und die Peptide massenspektrometrisch mittels Peptide Mass Fingerprint oder durch Mikrosequenzierung interner Peptide identifiziert (Adh1p, Gap1p and Tef1p). In Abbildung 06 sind representative, präparative Aufreinigungen löslicher Zellwand-Proteine dargestellt. Die Zusammensetzung der Proteine in beiden Wachstumsformen war unterschiedlich.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 09 zusammengefasst. Es wurden insgesamt 39 verschiedene Proteinbanden analysiert. 17 verschiedene Proteine wurden in Blastosporen in YPD 30 °C (Tab. 09, linke Spalte) und ebenfalls 17 aus hyphalen Zellen in α -MEM 37 °C (Tab. 09, rechte Spalte) identifiziert. Pyc2p wurde in beiden Aufreinigungen identifiziert. Da dieses Protein Biotin als prosthetische Gruppe enthält wurde angenommen, dass dessen Aufreinigung eher über diese endogene Biotinylierung als über die Oberflächen-Biotinylierung stattgefunden hat. In dieser Studie konnten zwölf Proteine identifiziert werden, deren Zellwand-Lokalisation bisher völlig unbekannt war. Die übrigen löslichen Zellwand-Proteine wurden bereits als Oberflächen-Proteine in *C. albicans* beschrieben. Die entsprechenden Publikationen sind hinter der Funktionsbeschreibung angegeben. Die Untersuchung bestätigt somit bereits erfolgte Identifikationen und führte darüber hinaus zur Entdeckung neuer löslicher Zellwand-Proteine.

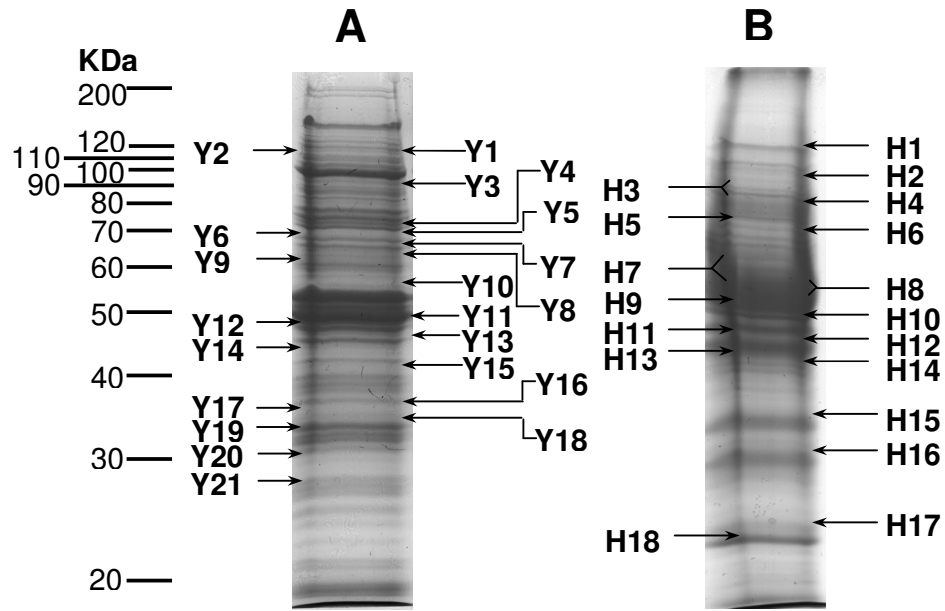


Abbildung 06: Präparative Aufreinigungen löslicher Zellwand-Proteine von *C. albicans*.

Wildtypzellen (SC 5314) aus Blastosporen (A) und Hyphen (B). Proteine wurde wie beschrieben aufgereinigt, mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Blau gefärbt. Jedes Protein, das durch einen Pfeil und eine Nummer markiert ist, wurde aus dem Gel ausgeschnitten, verdaut und identifiziert, entweder durch Peptide Mass Fingerprint oder Mikrosequenzierung (Identitäten der Proteine siehe Tabelle 09).

Die identifizierten Proteine können in Gruppen eingeteilt werden:

Zwei Zellwand-Mannoproteine (mit Sekretionssignalsequenz und GPI-Anker), sechs glykolytische Enzyme, fünf Hitzeschock-Proteine, drei Phosphorylasen, drei Translations-Elongationsfaktoren und zehn weitere Proteine, die keiner der funktionellen Gruppen innerhalb dieser Aufreinigung zugeordnet werden können. Drei der Proteine wurden in beiden Wachstumsformen gefunden: Hitzeschock-Protein Hsp70p, Translations-Elongationsfaktor 1 (Tef1p) und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Gap1p).

Tabelle 09: Identität der löslichen Zellwand-Proteine.

Identifizierte Proteine YPD 30 °C				Identifizierte Proteine α -MEM 37 °C			
Bande ^a	Swiss-Prot/ TrEMBL Id- Nr. ORF ^b	kDa	Funktion/ Homolog ^c	Bande ^a	Swiss-Prot/ TrEMBL Id-Nr. ORF ^b	kDa	Funktion/ Homolog ^c
Y1	CA1463	109	Pyruvat Carboxylase (Pyc2p)	H1	CA1463	109	Pyc2p
Y2	P25997	117	Translations-Elongationsfaktor 3 (Eft3p) (59)	H2	19.7021	103	Glykogen Phosphorylase (Gph1p) Homolog
Y3	O13430	92	Translations-Elongationsfaktor 2 (Eft2p) (59)	H3	P43076	60	pH responsives Protein (Phr1p) (63)
Y4	O94039	74	Transketolase (Tkt1p)	H4	P46598	80	Hitzeschock-Protein Hsp90p (57)
Y5	P41797	70	Hitzeschock-Protein Hsp70 (64)	H5	U25718	70	Hitzeschock-Protein Ssa2p (64)
Y6	CA4474	70	Hitzeschock-Protein Ssc1p	H6	P41797	70	Hitzeschock-Protein Hsp70p (64)
Y7	19.6367	66	Hitzeschock-Protein Ssb1p Homolog (59)	H7	P87020	34	pH reguliertes Antigen (Pra1p) (55)
Y8	CA4474	63	Hitzeschock-Protein Ssc1p		19.2877	63	Pyruvat Decarboxylase (Pdc11p) Homolog (59)
Y9	P46614	56	Pyruvat Kinase (Pyk1p) (65)	H8	19.7367	55	Ubiquitin Carboxyl-Terminale Hydrolase (Ubp1p) Homolog
Y10	19.1738	53	UTP-Glukose-1-Phosphaturidyl transferase (Ugp1p), Homolog	H9	19.6854	49	ATPase (Atp1p) Homolog
Y11	P16017	50	Translations-Elongationsfaktor 1 alpha (Tef1p) (59)	H10	P16017	50	Tef1p (59)
Y12	P16017	50	Tef1p (59)	H11	Q9P842	42	S-Adenosylmethionin Synthetase (Sam2p)
Y13	P16017	50	Tef1p (59)	H12	P46273	42	Phosphoglycerat Kinase (Pgc1p) (66)
Y14	P16017	50	Tef1p (59)	H13	19.3149	35	Ekinokandin-bindendes Protein (Ebp1p)
Y15	O93827	40	GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (Srb1p) (59)	H14	19.778	38	Zelloberflächen-Hydrophobizität Protein (Csh1p) (58)
	P43067	40	Alkohol Dehydrogenase (Adh1p) (65)	H15	Q92211	37	Gap1p (67)
Y16	19.2803	37	Coprogen Oxidase (Hem13p) Homolog	H16	P16017	50	Tef1p (59)
Y17	P16017	50	Tef1p (59)	H17	Q9Y7F0	22	Thiol-spezifisches Antioxidant protein (Tsa1p) Homolog
Y18	Q92211	37	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Gap1p) (67)	H18	Q9Y7F0	22	Tsa1p
Y19	AAB96910	30	14-3-3 Protein (Bmh1p) (59)				
Y20	19.4660	23	S10 ribosomales Protein (Rps6p) Homolog				
Y21	Q9P835	31	Succinat Dehydrogenase (Sdh2p)				

^a Zuordnung der entsprechenden Banden in Abbildung 06. ^b Aufgelistet sind entweder die Swissprot / TREMBL-Nummer, Genbank Nummer (Id-Nr.) oder die Nummer der offenen Leserahmen nach der „*Candida Genome Database*“

(<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>). ^c Homolog in anderen Organismen. Fettgedruckte Proteine wurden zum ersten Mal in dieser Untersuchung auf der Zelloberfläche identifiziert. Die anderen Proteine wurden bereits mittels Zellwandisolationen oder Immunhistochemie als Oberflächenmoleküle von *C. albicans* veröffentlicht (zugehörige Publikationen in Klammer).

Ausschließlich unter hypheninduzierenden Bedingungen wurden pH reguliertes Antigen (Pra1p) und pH responsives Protein (Phr1p) gefunden. Dies war in Einklang mit bereits publizierten Daten, welchen zufolge Phr1p nur in neutralem bis alkalischem pH-Wert exprimiert wird und Pra1p ein abundantes Protein in hyphalen Kulturen ist (55,63). Unter den Proteinen, die keiner Gruppe angehörten, befanden sich Tsa1p, ein thiol-spezifisches Antioxidant-Protein, und Ebp1p, ein ekinokandin-bindendes, membran-assoziiertes Protein (68). Beide Proteine werden in der folgenden Studie näher beschrieben. Die Lokalisation von Tsa1p in der Hyphenzellwand von *C. albicans* war bisher nicht bekannt.

6.1.3 Untersuchung der Bindung zytosolischer Proteine an der Zelloberfläche intakter Zellen

Ein Großteil der in dieser Untersuchung identifizierten Proteine besaß keine erkennbare N-terminale Signalsequenz und hat bekannte Funktionen im Zytoplasma. Daher wurde überprüft, ob intrazelluläre Proteine unspezifisch an die Oberfläche von intakten *Candida*-Zellen binden (z. B. durch Zell-Lyse) und auf diese Weise mit Biotin markiert wurden. Dafür wurde zum einen ein zytosolischer Extrakt von *C. albicans* Blastosporen hergestellt und eine lebende Kultur von *C. albicans* Zellen in diesem Extrakt mehrere Stunden schüttelnd auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die löslichen Zellwand-Proteine markiert und isoliert (Abschnitt 5.8). Zur Kontrolle wurden Zellen statt im zytosolischen Extrakt in Puffer inkubiert. Der zytosolische Extrakt sowie die Aufreinigungen der löslichen Zellwand-Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 07 A). Die Aufreinigungen der löslichen Zellwand-Proteine, die in zytosolischem Extrakt bzw. in Puffer inkubiert wurden, unterschieden sich weder qualitativ noch quantitativ (Spur 2 und 3). Dagegen war das Proteinbandenmuster des zytoplasmatischen Extrakts völlig unterschiedlich (Spur 1). Daraus wurde geschlossen, dass intrazelluläre Proteine nicht an die Zelloberfläche wachsender Zellen binden.

Dies wurde durch ein Experiment bestätigt, in dem Tsa1p direkt untersucht wurde. Aus dem Stamm TG6, der das Fusionsprotein Tsa1p-Gfp exprimiert, wurde ein zytosolischer Extrakt von Hyphenzellen hergestellt. Hyphenzellen des Wildtypstamms wurden wie oben beschrieben in diesem Extrakt inkubiert, anschließend gewaschen, biotinyliert und die markierten Proteine affinitätsgereinigt. In dieser Aufreinigung konnte im Western Blot, der mit Anti-Gfp-Antikörper inkubiert wurde, kein Tsa1p-Gfp

detektiert werden. Das gleiche galt für eine Aufreinigung, die von puffer-inkubierten Zellen stammte. Im Gegensatz dazu wurde von einer Aufreinigung von löslichen Zellwand-Proteinen des Tsa1p-Gfp exprimierenden Stammes unter hypheninduzierenden Bedingungen mittels Western Blot Tsa1p-Gfp detektiert. Somit wurde bestätigt, dass Tsa1p-Gfp nicht unspezifisch an die Oberfläche von Hyphenzellen bindet.

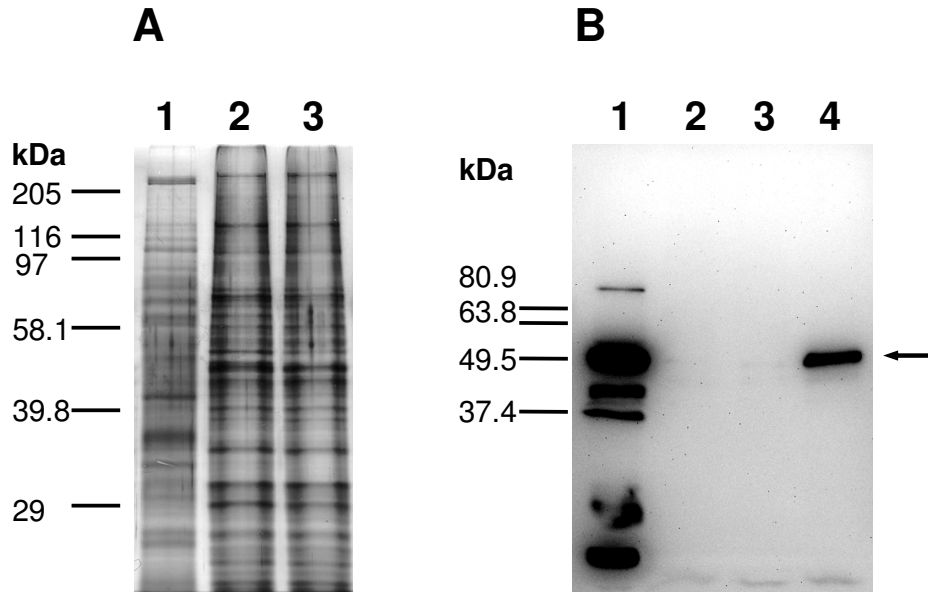


Abbildung 07: Bindungsexperimente mit intakten Zellen von *C. albicans*.

A: Blastosporen von Wildtypzellen wurden entweder in zytosolischem Extrakt (Spur 2) oder in Bindungspuffer inkubiert (Spur 3). Nach Biotinylierung, Extrahierung und Affinitätsreinigung der Proteine, wurden die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und silbergefärbt. Aliquots des zytosolischen Extrakts wurden ebenfalls biotinyliert und analysiert (Spur 1). B: Aufreinigung löslicher Zellwand-Proteine hyphaler Wildtypzellen, die zuvor entweder in Bindungspuffer (Spur 2) oder in zytosolischem Extrakt von TG6 inkubiert wurden, einem Stamm, der das Tsa1p-Gfp Fusionsprotein exprimiert (Spur 3). Aufreinigung löslicher Zellwand-Proteine von hyphalen Zellen des Stammes TG6 (Spur 4). Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und biotinyliert. Biotinylierte Proteine wurden extrahiert, aufgereinigt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Blot wurde mittels polyklonaler Anti-Gfp-Antikörper analysiert. Der für die Inkubation verwendete zytosolische Extrakt wurde ebenfalls biotinyliert, aufgereinigt und analysiert (Spur 1: 10 µg Gesamtprotein eingesetzt). Banden mit niedrigeren Molekulargewichten stellen Degradationsprodukte von Tsa1p-Gfp oder zytosolische Proteine dar, mit denen der Antikörper kreuzreagiert. Diejenige Bande, die dem vollständigen Tsa1p-Gfp entspricht, wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

6.2 Lokalisation von Tsa1p und Ebp1p

Um die Lokalisation zweier identifizierter Proteine in der Zelle detailliert zu untersuchen, wurde Gfp C-terminal an Tsa1p und Ebp1p fusioniert. Dies erfolgte durch PCR-Amplifizierung einer Transformationskassette mit Primern, die eine 70 bp lange homologe Sequenz direkt vor (in 5'-Richtung) und direkt nach (in 3-Richtung) dem Stop Codon von *TSA1* sowie komplementäre Sequenzen des Vektors pGM1506 (47) enthielten. Der Vektor diente als *Template* der Reaktion. Das entstehende PCR-Produkt trug somit am 5'- und am 3'-Ende eine für die homologe Rekombination im *TSA1*-Lokus erforderliche Sequenz, *GFP*, einen Terminator und als selektiven Marker *URA3* (47). Der *URA3*-negative Stamm CAI 4 (43) wurde für die Fusion verwendet. Die Expression der Fusionsproteine konnte mittels konfokaler Mikroskopie sowie im Western Blot (Anti-Gfp-Antikörper) nachgewiesen werden.

Die Stämme wurden als Blastosporen (YPD 30 °C) und als Hyphen (MEM 37 °C) kultiviert, mit Formalin fixiert und analysiert. Tsa1-Gfp konnte in beiden Kulturen detektiert werden, jedoch lokalisierte Tsa1p-Gfp nur in Hyphen auf der Zelloberfläche (Abb. 08 A). Dies wurde durch zusätzliche Oberflächenfärbung verdeutlicht. Die Zellen wurden zuvor mit Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert und diese Markierung mittels Anti-Biotin-Antikörper nachgewiesen (Abb. 08 B und G). In Hyphen fielen die Biotinylierung und das Gfp-Signal nach Überlagerung aufeinander (Abb 08 D). Das entsprechende Profil verdeutlichte die Kolo-kalisation (Abb. 08 E). Tsa1p-Gfp wurde zusätzlich im Zytoplasma und im Nukleus von Hyphen lokalisiert. In Blastosporen befand sich das Fusionsprotein größtenteils im Nukleus und ebenfalls zu geringeren Mengen im Zytoplasma (Abb 08 F). Die Kernlokalisation wurde durch DAPI-Markierungen an einem Videomikroskop bestätigt (Abb 09). Unter den gewählten Bedingungen war das Fusionsprotein immer im Nukleus zu finden. Tsa1p ist folglich eher ein differenziell lokalisiertes als ein differenziell exprimiertes Protein.

Im selben Medium (α -MEM) jedoch bei 25 °C kultiviert, bildet *C. albicans* keine Hyphen sondern überwiegend Blastosporen. Unter dieser Bedingung konnte Tsa1p-Gfp dagegen nicht auf der Zelloberfläche lokalisiert werden. Daher wurde vermutet, dass Tsa1p-Gfp nicht aufgrund von medienspezifischen Bedingungen in α -MEM in der Hyphenzellwand lokalisierte (Daten nicht gezeigt).

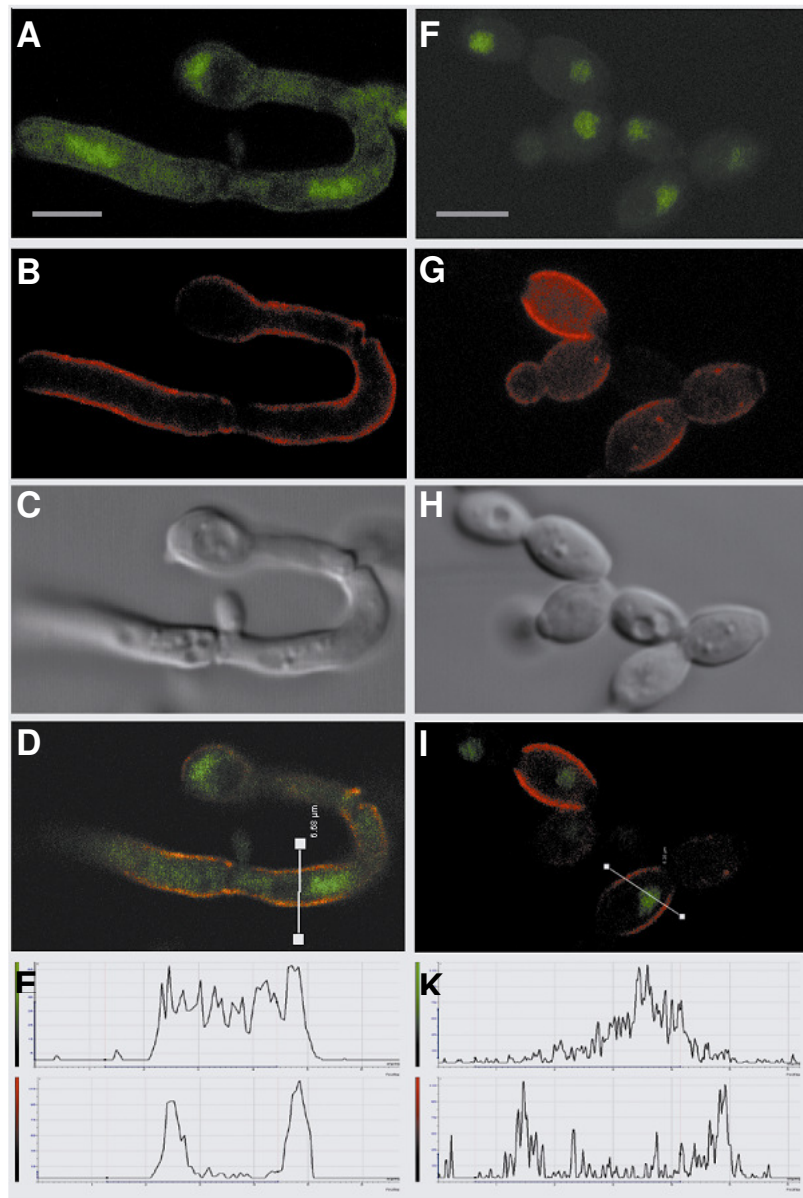


Abbildung 08: Subzelluläre Lokalisation von Tsa1-Gfp in Blastosporen und Hyphen von *C. albicans* mittels konfokaler Mikroskopie.

GFP wurde an den C-Terminus von *TSA1* fusioniert, so dass die Expression von *TSA1-GFP* vom nativen Promotor aus erfolgte. A-H: Hyphales Wachstum wurde 24 h in α -MEM 37 °C induziert. F-I: Blastosporen wurden 24 h in YPD 30 °C kultiviert. A, F: Gfp-Signal; B, G: Oberflächen-Biotinylierung wurde visualisiert mit Anti-Biotin-Antikörper (Klon BN34) und sekundärem Anti-Maus IgG gekoppelt an Cy3. C, H: Transmissionsbilder. D, I: Überlagerung des Gfp- und des Cy3-Signals und die entsprechenden Emissionsprofile von Hyphen (E) und Blastosporen (K). Oberes Diagramm: Gfp-Signal. Unteres Diagramm: Cy3-Signal. Die X-Achse stellt die weiße Linie dar, die in der Überlagerung abgebildet ist (D, I). Graue Linien entsprechen 5 μ m.

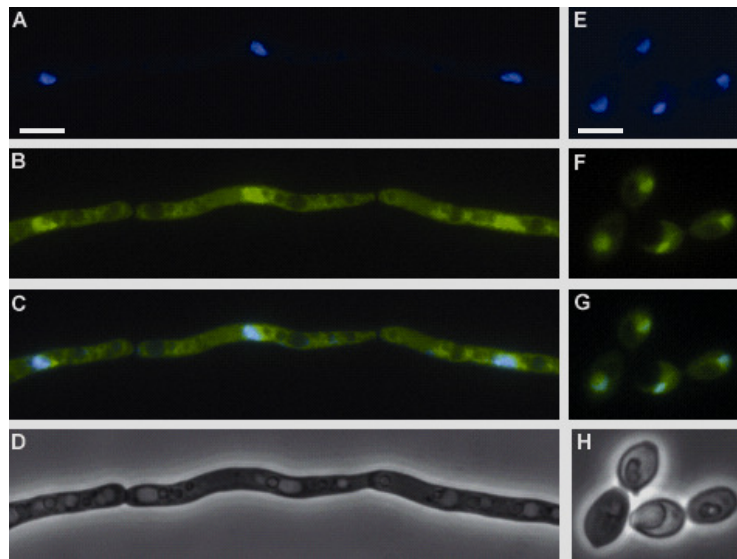


Abbildung 09: Tsa1p-Gfp lokalisiert im Nukleus.

DAPI-Färbung. A-D: Hyphenzellen von TG6, α -MEM 37 °C. E-H: Blastosporen, YPD 30 °C. DAPI-Färbung wurde an lebenden Zellen durchgeführt, 10 min 1 μ g/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid), anschließend wurden Zellen formalin-fixiert und mittels eines Videomikroskops untersucht. Graue Linien entsprechen 5 μ m.

Ebp1-Gfp wurde ebenfalls sowohl in Hyphen als auch in Blastosporen detektiert (Abb. 10), wobei es in beiden Formen an der Zellperipherie lokalisierte (Abb. 10 A, C und E). Jedoch überlagerten sich die Signale der Biotinylierung und des Ebp1p-Gfp im Gegensatz zu Tsa1p-Gfp nicht (Abb. 10 E). Dies stimmt sehr gut mit Ergebnissen aus einer anderen Untersuchung überein, der zufolge Ebp1p aus Membran-Aufreinigungen isoliert wurde (68). Möglicherweise kann der Anti-Biotin-Antikörper nicht so tief in die Zellwandstruktur vordringen, dass membran-assoziierte Bereiche markiert werden. Tsa1p-Gfp lokalisierte somit eher nahe der Zelloberfläche oder in der gesamten Zellwandstruktur, während Ebp1p-Gfp eher nahe der Membran zu finden war. Im Gegensatz zu Tsa1p ist Ebp1p nicht differenziell lokalisiert. Im Weiteren wurden die Funktionen von Tsa1p untersucht, da Ebp1p bereits als ekinokandin-bindendes Protein beschrieben wurde (68).

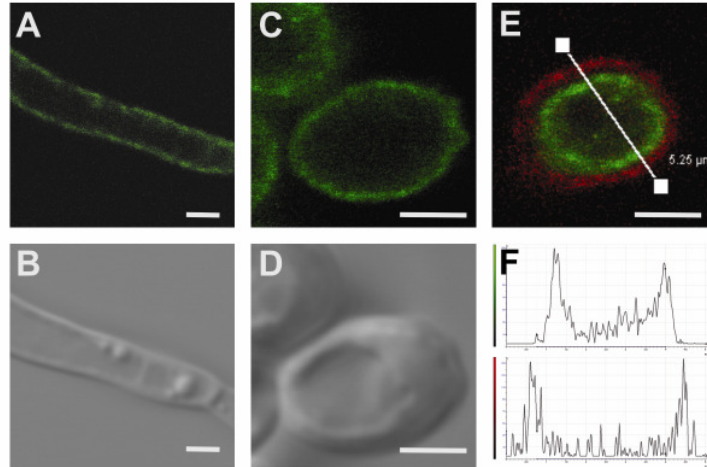


Abbildung 10: Lokalisation von Ebp1p-Gfp in Hyphen und Blastosporen.

Mittels konfokaler Mikroskopie wurde der Stamm EG4 untersucht, der analog zu TG6 Ebp1p-Gfp vom nativen Promotor exprimiert. Blastosporen in D wurden biotinyliert und die Oberflächen-Biotinylierung wie beschrieben visualisiert. A, C: Gfp-Signal. B, D: Transmissionsbilder. E: Überlagerung des Gfp- mit dem Cy3-Signal. F: Dazugehöriges Emissionsprofil, oberes Diagramm Gfp, unteres Cy3. Waagrechte weiße Linien entsprechen 2 µm, schräge weiße Linie stellt die X-Achse der Profile dar.

6.2.1 Lokalisation von Tsa1p auf der Zelloberfläche von Hyphen ist abhängig von Efg1p

Ob die Oberflächenlokalisierung von Tsa1p an die Morphologie gekoppelt war, wurde biochemisch mittels Detektion von Tsa1p an der Zellwand von $\Delta efg1$ - und Wildtyp-Stämmen (SC 5314) durch polyklonalen Antipeptid-Anti-TSA1-Antikörper (TSA-Antikörper) untersucht. Stämme ohne *EFG1* bilden unter den hier verwendeten hypheninduzierenden Bedingungen (α -MEM, 37 °C) keine Hyphen (56). Somit konnte die Lokalisation von Tsa1p unter den selben Kultivierungsbedingungen (α -MEM, 37 °C) und zugleich bei unterschiedlicher Morphologie untersucht werden, wobei der $\Delta efg1$ -Stamm vorwiegend Blastosporen und Wildtypzellen hauptsächlich Hyphen bildeten. Daher konnte durch den Vergleich der Lokalisation von Tsa1p in diesen beiden Stämmen festgestellt werden, ob die Oberflächenlokalisierung von Tsa1p abhängig vom Medium oder vom morphologischen Zustand der Zelle war. Dafür wurden *C. albicans* Stämme kultiviert, gewaschen, mit Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert und anschließend mittels Glasperlen in detergentenhaltigem Puffer aufgeschlossen. Tsa1p wurde mittels affinitätsgereinigtem TSA-Antikörper (Abschnitt 5.15) immunpräzipitiert und die Biotinylierung mittels Streptavidin-POD im Western Blot detektiert.

Auf diese Weise wurde ausschließlich zellwand-assoziiertes Tsa1p visualisiert. Zwei unterschiedliche hypheninduzierende Bedingungen (α -MEM und YPD-Serum bei jeweils 37 °C) und eine Bedingung, unter der *C. albicans* als Blastosporen wächst (YPD 30 °C), wurden gewählt.

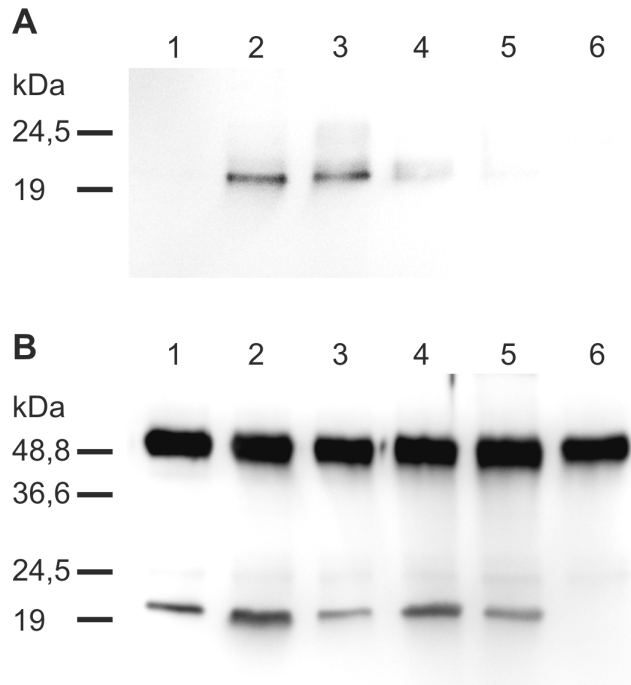


Abbildung 11: Hyphenbildung ist ein Signal für die Translokation von Tsa1p an die Zellwand.

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD (A) und TSA-Antikörper (B). Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, biotinyliert, Proteinextrakte hergestellt und jeweils 100 μ g Extrakt mit TSA-Antikörper immunpräzipitiert. Spur 1-3: Wildtypzellen. Spur 4 und 5: Δ *efg1*-Mutante. Spur 6: Δ *tsa1*-Mutante. Spur 1: YPD, 30 °C, Spur 2 und 4: α -MEM, 37 °C, Spur 3,5 und 6: YPD-Serum, 37 °C.

Jeweils gleiche Mengen Extrakt wurden für die Präzipitationen eingesetzt (je 100 μ g). Die Mengen an biotinyliertem Zellwand-Tsa1p variierten stark (Abb. 11). Biotinyliertes Zellwand-Tsa1p wurde eindeutig in SC 5314 in α -MEM bei 37 °C (Abb. 11 A Spur 2) und in YPD-Serum bei 37 °C detektiert (Abb. 11 A Spur 3). Sehr geringe Mengen oder gar kein biotinyliertes Zellwand-Tsa1p wurde unter den exakt gleichen Bedingungen in der nicht hyphal wachsenden Δ *efg1*-Mutante in α -MEM bei 37 °C (Abb. 11 A Spur 4) und in YPD-Serum bei 37 °C (Abb. 11 A Spur 5) detektiert. Ebenfalls kein biotinyliertes, in der Zellwand lokalisiertes Tsa1p konnte im Wildtyp in YPD

bei 30 °C nachgewiesen werden (Abb. 11 A Spur 1). Im Gegensatz dazu konnte Tsa1p nach Immunpräzipitation mittels TSA-Antikörper in allen hier verwendeten Stämmen unter allen Wachstumsbedingungen im Western Blot mittels TSA-Antikörper detektiert werden (Abb. 11 B, Bande bei 21 kDa). Unterschiedliche Mengen immunpräzipitierten Tsa1ps resultierten wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Bei der starken Bande um 50 kDa (Abb. 11 B) handelt es sich um die schwere Kette des TSA-Antikörpers, die ebenfalls durch den Zweitantikörper gebunden wird. In der $\Delta tsa1$ -Mutante war die Proteinbande bei 21 kDa nicht vorhanden (Abb. 11 B, Spur 6). Da die Gesamtmenge von Tsa1p unter den selben Bedingungen im Wildtyp und in der $\Delta efg1$ -Mutante gleich blieb (Abb. 11 B, Spur 2 und 4; Spur 3 und 5), wurde vermutet, dass unter diesen Bedingungen *TSA1* nicht durch *EFG1* reguliert wird. Die Intensität der biotinylierten, zellwand-assoziierten Tsa1p-Banden war folglich nicht von der Gesamtmenge von Tsa1p, sondern von der Oberflächenlokalisierung des Proteins abhängig. Für die Translokation von Tsa1p auf die Zelloberfläche ist entweder die Hyphenform, *EFG1* oder beides notwendig.

6.2.2 Lokalisation von Tsa1p bei oxidativem Stress und Hitzeschock

Wichtige Faktoren bei Pathogenen sind die Widerstandsfähigkeit gegen Temperaturen über 40 °C und gegen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS). Deshalb wurde der Einfluss von Wasserstoffperoxid und von Hitzeschock auf die Lokalisation von Tsa1p untersucht.

Im Tsa1p-Gfp exprimierenden Stamm TG6 wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, ob Tsa1p durch oxidativen Stress (5 mM H₂O₂) aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert wird. In Übereinstimmung mit den Daten aus den RNA- und Proteinblots (Abb. 16) nahm die Menge von Tsa1p-Gfp nach 60-minütiger Inkubation in 5 mM H₂O₂ zu. Deutlich mehr Tsa1p-Gfp wurde im Zytoplasma detektiert, jedoch nahm in ähnlichem Maße auch die Menge im Nukleus zu (Abb. 12 C). Nach zwei Stunden war die Induktion wieder rückläufig (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt ebenfalls gut mit den Transkriptions- und Translationsdaten überein (Abb. 16). Weitere mikroskopische Untersuchungen des Stammes TG6 zeigten, dass unter dem Einfluss von DTT und bei spontaner Temperaturänderung von 25 °C auf 37 °C Tsa1p-Gfp ebenfalls nicht auf der Zelloberfläche lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Tsa1p wird

folglich wahrscheinlich weder durch oxidativen Stress noch durch Temperaturerhöhung in andere Zellkompartimente transportiert. Bei höheren Temperaturen als 37 °C nahm die Intensität der Fluoreszenz von Gfp möglicherweise aufgrund von Denaturierung des Proteins stark ab.

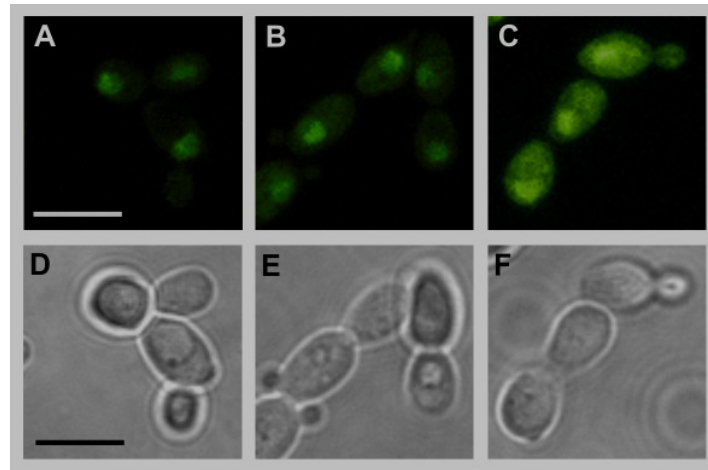


Abbildung 12: Die Lokalisation von Tsa1-Gfp bleibt unverändert bei Zugabe von Wasserstoffperoxid.

Konfokale Mikroskopie: Gfp-Signal A-C, Transmission D-F; 5 mM H₂O₂: 0 min A und D, 30 min B und E, 60 min C und F. Die Laserintensität am Mikroskop wurde für alle Aufnahmen gleich belassen. Graue und schwarze Linie entsprechen 5 µm.

Daher wurde zusätzlich biochemisch untersucht, ob oxidativer Stress (5 mM H₂O₂) und Hitzeschock (43 °C) zur Translokation von Tsa1p an die Zellwand führt. Die Oberflächen-Biotinylierung stellte ein geeignetes Werkzeug dar, um Lokalisation in der Zellwand zu überprüfen. *C. albicans* Wildtypzellen wurden mit H₂O₂ behandelt oder in ein bei 43 °C vorgewärmtes Medium gegeben und nach den unten angegebenen Inkubationszeiten sofort auf Eis biotinyliert. Proteinextrakte wurden hergestellt, die mittels affinitätsgereinigtem TSA-Antikörper immunpräzipitiert wurden. Präzipitiertes Tsa1p wurde mittels SDS-PAGE separiert, anschließend auf PVDF-Membran transferiert und in der Zellwand lokalisiertes und deshalb biotinyliertes Tsa1p mittels Streptavidin-POD detektiert. Nach 60 min bei 5 mM H₂O₂ (Abb. 13 A, Spur 3) sowie nach 30 min (Spur 4) bzw. 60 min (Spur 5) bei 43 °C lokalisierte Tsa1p im Vergleich zu einer Referenzkultur bei YPD 30 °C (Spur 2) nicht vermehrt in der Zellwand. Im Gegensatz dazu war Tsa1p auf der Hyphenzelloberfläche in α -MEM bei 37 °C zu finden (Abb. 13 A, Spur 1). In allen Ansätzen war Tsa1p vorhanden, wie durch Entwicklung der PVDF-Membran mit TSA-Antikörper gezeigt wurde (Abb. 13 B).

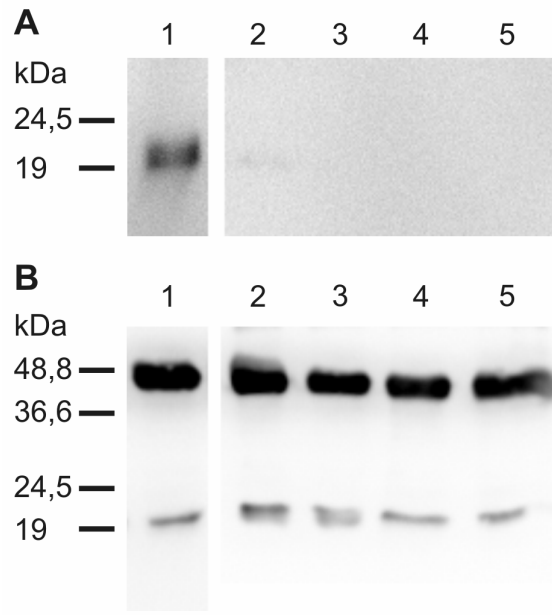


Abbildung 13: Wasserstoffperoxid und Hitzeschock führen nicht zur Translokation von Tsa1p an die Zellwand.

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD (A) und TSA-Antikörper (B). Wildtypzellen (SC 5314) wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, biotinyliert, Gesamtprotein extrahiert und jeweils 100 µg Extrakt immunpräzipitiert. Spur 1: α-MEM, 37 °C. Spur 2: YPD, 30 °C. Spur 3: 60 min, 5 mM H₂O₂, YPD, 30 °C. Spur 4: 30 min; Spur 5: 60 min, YPD, 43 °C.

6.2.3 Tsa1p ist kein sekretiertes Protein

Um zu untersuchen, ob es sich bei Tsa1p um ein sezerniertes Protein handelt, wurde das Protein aus Kulturüberständen präzipitiert und anschließend mittels TSA-Antikörper im Western Blot detektiert. Dazu wurden Wildtypzellen als Blastosporen und als Hyphen kultiviert und die Kulturüberstände durch Zentrifugation abgetrennt. Die darin befindlichen Proteine wurden mittels TCA-Fällung präzipitiert (Abschnitt 5.9). Die Zellen wurden gewaschen und zell-assoziiertes Tsa1p mittels Glasperlen-aufschluss extrahiert. Die Proteine aus den Kulturüberständen wurden mit den Zell-extrakten mittels TSA-Antikörper im Western Blot analysiert (Abb. 14). Die entstehenden Banden wurden quantifiziert (AIDA Version 2.1). Die Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen ermittelt. Jeweils 1/12 des Präzipitats (Abb. 14, Spur 1 und 3) bezogen auf den Gesamtansatz (50 ml Kultur) und jeweils 10 µg Protein der Zellextrakte (Spur 2 und 4) wurde eingesetzt (das entspricht bei Blastosporen 1/1200 und bei Hyphen 1/360 der gesamten Proteinmenge). Zur Quantifizierung

wurden die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten herangezogen. Somit ergab sich, dass ca. 0,3 % der Gesamtmenge zell-assoziierten Tsa1ps aus Hyphen und ca. 0,1 % aus Blastosporen im Kulturüberstand zu finden waren. Folglich wurde unter keiner dieser Bedingungen Tsa1p in signifikanten Mengen sezerniert. Die geringe Menge von Tsa1p im Überstand rührt wahrscheinlich von der Lyse einiger weniger Zellen oder vom Auswaschen von Tsa1p aus der Zellwand her. In Präzipitaten aus sterilen Medien (YPD und α -MEM) konnte kein Tsa1p detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

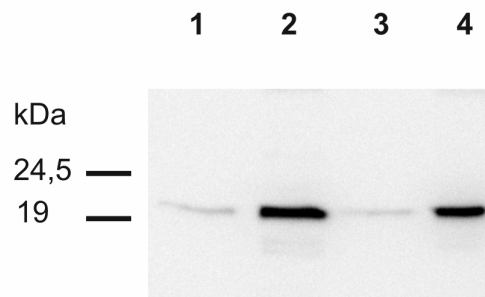


Abbildung 14: Tsa1p wird nicht in das Medium sezerniert.

Western Blot detektiert mit TSA-Antikörper. Proteine aus den Kulturüberständen wurden mittels TCA präzipitiert Spur 1, Kulturüberstand Hyphen 1/12 (MEM, 37 °C); Spur 2, Zellextrakt Hyphen 1/360 (α -MEM, 37 °C); Spur 3, Kulturüberstand Blastosporen 1/12 (YPD 30 °C); Spur 4 Zellextrakt 1/1200 (YPD, 30 °C).

6.3 Funktionelle Charakterisierung von Tsa1p

Das Thiolspezifische Antioxidant-Protein (Tsa1p) gehört zu der Familie der TSA/AhpC-Proteine. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass ScTsa1p durch Dimerisierung Funktionen als Antioxidant-Protein übernehmen kann ((26) und Abschnitt 3.4). Mittels Western Blot konnte Tsa1p in *C. albicans* als Homodimer detektiert werden (Abb. 15 A). Die Bildung von Tsa1p-Dimeren wurde unter folgenden Bedingungen überprüft: YPD bei 30 °C (Blastosporen), 60 min 5 mM H₂O₂ in YPD (Blastosporen unter oxidativem Stress), α -MEM und YPD-Serum bei 37 °C (Hyphenbildung). Aus diesen Kulturen wurden Proteinextrakte hergestellt, diese einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE unterzogen, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels TSA-Antikörper detektiert. Im Bereich zwischen 30 und 40 kDa waren drei Proteinbanden zu erkennen (Abb. 15 A, Pfeil b, c und d sowie Abb. 04, Spur 6 und 13). Diese waren vergleichbar mit Proteinbanden aus Zellextrakten von *S. cerevisiae*, die

als Tsa1p-Dimere identifiziert wurden (26,29). Dies deutete darauf hin, dass unter den untersuchten Bedingungen Tsa1p auch in *C. albicans* überwiegend als Homodimer vorliegt. Wahrscheinlich handelte es sich bei Bande b und d um die Dimere D1 und D2, die in *S. cerevisiae* ebenfalls die häufigsten Formen darstellen (Abb 02 A und B). Die Bande c könnte dem selteneren Dimer D3 entsprechen und Dimer D4 konnte nicht detektiert werden. Durch Zugabe von Reduktionsmittel verschwanden diese Banden und es verblieb eine Bande im Bereich von 21 kDa, welche die reduzierte Form von Tsa1p darstellte (Daten nicht gezeigt). Reduziertes Tsa1p konnte auch in nicht-reduzierenden Gelen detektiert werden, da die Dimere wahrscheinlich partiell oxidiert waren (Abb 15 A, Spur 1,2 und 4, Pfeil a). In $\Delta tsa1$ -Stämmen erschienen keine dieser Banden (Daten nicht gezeigt). In α -MEM bei 37 °C wurde eine weitere Bande im Bereich von 50 kDa detektiert, die nur in diesem Medium auftrat (Spur 4). Es könnte sich um eine weitere Multimer-Form von Tsa1p handeln. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen heteromeren Komplex von Tsa1p mit einem oder mehreren anderen Proteinen handelt. Ebenfalls ausschließlich in α -MEM-Medium exprimiert *C. albicans* ein mit dem spezifischen TSA-Antikörper kreuzreaktives Protein der Größe 62 kDa (Abb. 15 A, gestrichelter Pfeil e). Die Intensität der Bande ist deutlich schwächer als die von Tsa1p. Da die Bande auch in der Deletionsmutante vorhanden ist, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Multimer von Tsa1p-Molekülen und eventuell anderen Proteinen handelt (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten bei der Dimerbildung verschiebt sich der isoelektrische Punkt von ScTsa1p in der überoxidierten Form von Cys⁴⁷ (SO₂H) von 4,9 auf 4,7, da eine zusätzliche Ladung im Molekül entsteht (29). Da beide Formen in der Zelle vorliegen, können in einem 2D-Gel zwei Spots ausgemacht werden. Diese Verschiebung wurde auch für Tsa1p in *C. albicans* beobachtet (Abb. 15 B). Nach einer Immunpräzipitation mittels TSA-Antikörper wurden in 2D-SDS-PAGE zwei Protein-Spots des Molekulargewichtes 21 kDa mittels Coomassie Blau angefärbt. In $\Delta tsa1$ -Stämmen war dieser Doppel-Spot nicht vorhanden (Daten nicht gezeigt).

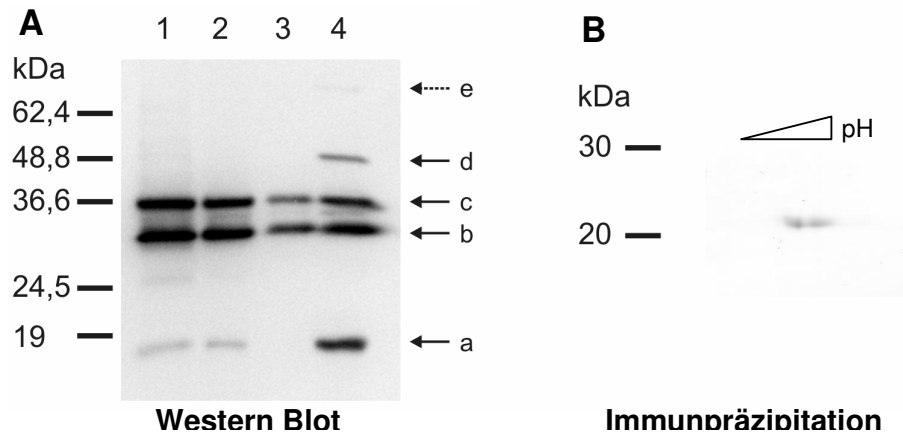


Abbildung 15: Tsa1p als Dimer und in einer überoxidierten Form.

A: Western Blot detektiert mit TSA-Antikörper. Auftragung erfolgte nicht reduzierend (ohne β -Mercaptoethanol), wodurch Disulfidbrücken erhalten blieben. Spur 1-4: Wildtypzellen (SC 5314). Spur 1: 5 mM H_2O_2 , YPD, 30 °C. Spur 2: YPD, 30 °C. Spur 3: YPD-Serum, 37 °C. Spur 4: α -MEM, 37 °C. Dimere / multimere Formen von Tsa1p (Pfeile b – e, siehe Abb. 02). Vollständig reduziertes Tsa1p (Pfeil a). Unbekanntes Protein, das in α -MEM exprimiert wird und mit dem der TSA-Antikörper kreuzreagiert (Pfeil f). B: Coomassie-gefärbtes 2D-Proteingel einer Immunpräzipitation aus Blastosporen (SC 5314) mittels TSA-Antikörper, die zusätzliche Ladung in der überoxidierten Form des Cystein⁴⁷, führt zu einer Verschiebung des Isoelektrischen Punkt hin zu geringerem pH-Wert (linker Spot).

6.3.1 Regulation von *TSA1*

6.3.1.1 Regulation von *TSA1* unter Einfluss von Stress

Gene, die Antioxidant-Proteine kodieren, werden durch oxidierende Substanzen, wie z. B. H_2O_2 induziert. Auch in *C. albicans* wurde *TSA1* unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene induziert (Abb. 16 A und B). Die Proteinmenge änderte sich im Vergleich zur RNA-Menge in geringerem Maße. Die Substanz Menadion, die in der Zelle durch ein 1-Elektronen-Transfer die Bildung von Superoxid-Radikalen hervorruft, führte ebenfalls zur Induktion der Transkription von *TSA1* (Abb. 16 A). Auch Thiol-Verbindungen können durch Bildung des Thiyl-Radikals ähnliche Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA verursachen, wie Hydroxylradikale oder andere reaktive Sauerstoffverbindungen (69). Daher wurden die Auswirkungen der Thiol-Verbindung Dithiothreitol (DTT) auf die Regulation von *TSA1* untersucht. 20 mM DTT verursachte nur eine geringe transkriptionelle Induktion von *TSA1* (Abb. 16 A). Im Gegensatz dazu wird *ScTSA1* in *S. cerevi-*

siae unter dem Einfluss von DTT ungefähr dreifach stärker transkribiert (www.yeastgenome.org).

In *S. cerevisiae* wird die Expression von *ScTSA1* ebenfalls durch H_2O_2 induziert. Diese Induktion ist abhängig von *YAP1* (70). Der Transkriptionsfaktor *YAP1* ist ein zentraler Regulator von Stress-Genen, der unter anderem auch *ScTSA1* und *ScTSA2* reguliert (70). Analog dazu war *CAP1*, das Ortholog zu *YAP1* in *C. albicans*, für die Induktion der Expression von *TSA1* unter oxidativem Stress notwendig (Abb. 17). Die H_2O_2 -abhängige Induktion von *TSA1* bei 5 mM H_2O_2 in der homozygoten $\Delta cap1$ -Mutante blieb aus (Abb. 17). Die basale Expression von *TSA1* in YPD war dagegen nicht betroffen.

TSA1 wurde folglich unter oxidativem Stress verstärkt exprimiert und diese Induktion war von *CAP1* abhängig.

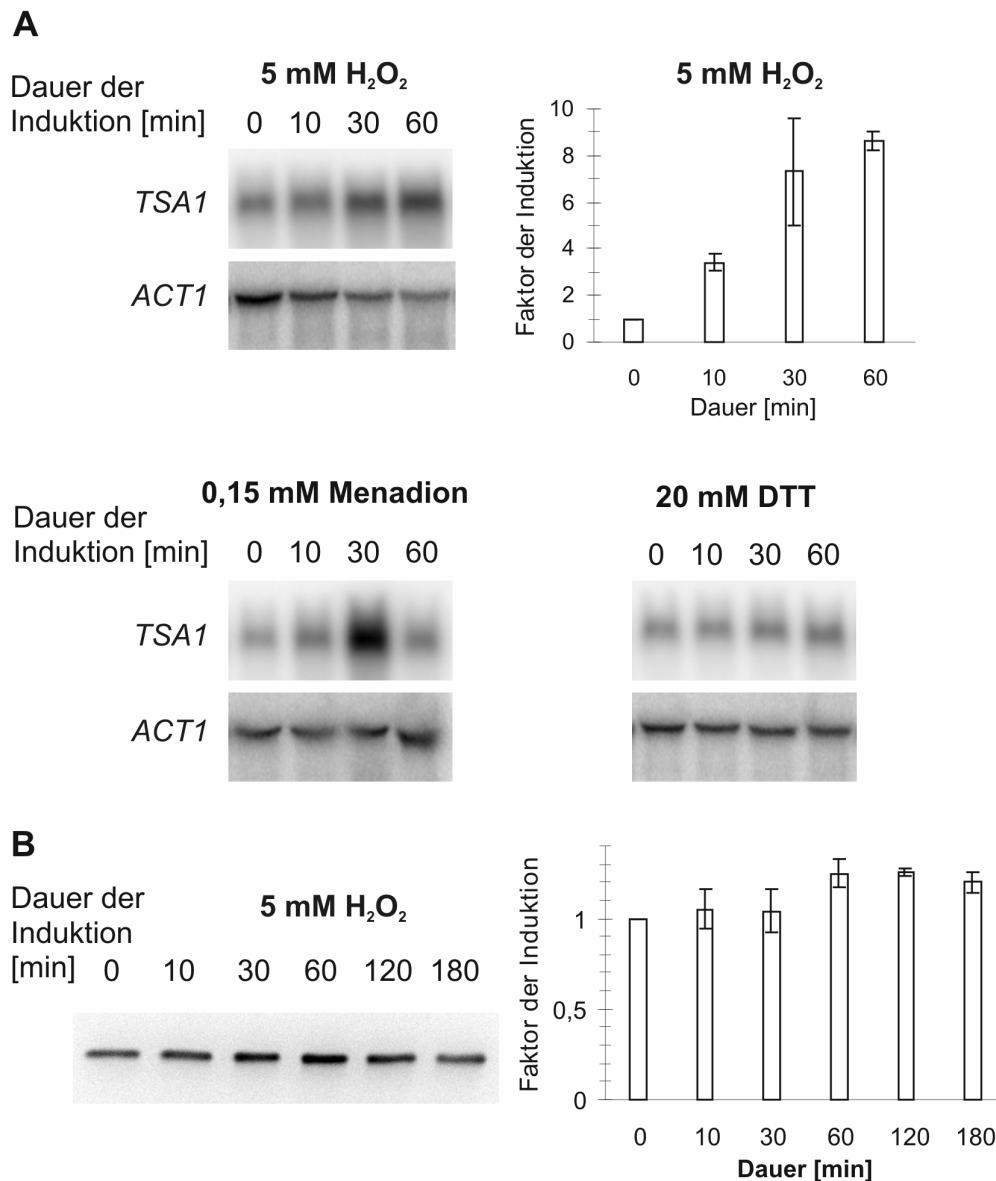


Abbildung 16: Induktion von *TSA1* durch oxidierende und reduzierende Substanzen.

Transkriptionsanalysen (A) und Western Blot (B). A: Wildtypzellen wurde in YPD 30 °C kultiviert und mit der jeweiligen Substanz in der angegebenen Konzentration versetzt. Zu den angeführten Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und daraus RNA bzw. Protein isoliert. RNA Blots wurden mit spezifischer Sonde für *TSA1* und *ACT1* für die Normalisierung hybridisiert. B: Pro Zeitpunkt wurde 10 µg Gesamtprotein aufgetragen und mit TSA-Antikörper detektiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Doppelbestimmungen verwendet. Die Diagramme wurden aus Daten zweier unabhängiger Experimente angefertigt. Der Fehlerbalken stellen die mittlere Abweichungen dar.

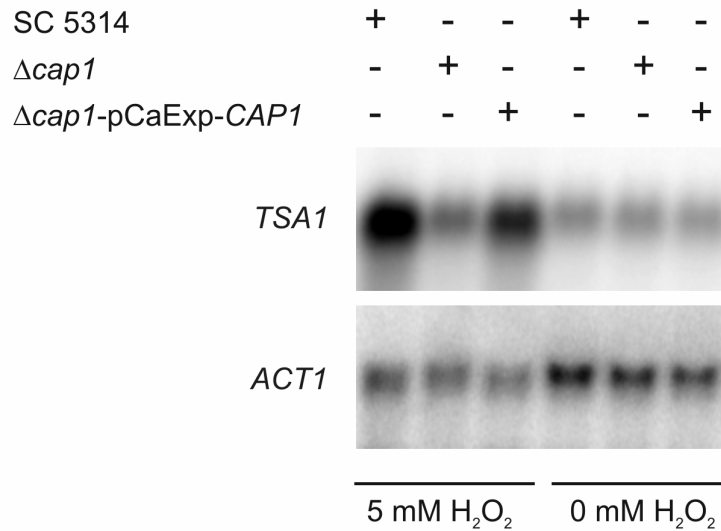


Abbildung 17: *TSA1* wird durch *CAP1* reguliert.

Wildtypzellen, $\Delta cap1$ -Mutante und rekonstituierte $\Delta cap1$ -CAP1-Mutante wurden in YPD 30 °C kultiviert, für 60 min mit H₂O₂ versetzt oder in YPD weiterkultiviert, geerntet und die RNA für Northern Hybridisierungen isoliert.

6.3.1.2 *TSA1* wird nicht durch Hyphenbildung induziert

Im folgenden wurde überprüft, ob sich bei der Entstehung von Hyphen neben der Lokalisation von Tsa1p auch die Expression von *TSA1* ändert. Dazu wurde Hyphenbildung von Wildtypzellen (SC 5314) in YPD-Serum und in α -MEM bei 37 °C induziert. Als Referenz diente eine Blastosporen-Kultur in YPD bei 30 °C. Aus den drei Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und Gesamt-RNA bzw. Protein isoliert. RNA wurde mittels Northern und die Proteinextrakte mittels Western Blot analysiert (Abb. 18, A und B). Die Transkription und Translation von *TSA1* wurde während der Hyphenbildung nur geringfügig beeinflusst. Die Quantifizierung der Transkriptionsanalyse ergab, dass nach zwei Stunden Inkubation die Transkription von *TSA1* sowohl in YPD-Serum als auch in α -MEM ungefähr das 1,5-fache des Wertes der Blastosporen-Kultur betrug (Daten nicht gezeigt). Die Proteinmenge von Tsa1p dagegen blieb in α -MEM annähernd gleich und nahm in YPD-Serum nach einer Stunde sogar leicht ab (Abb. 18 B). Folglich wird durch Hyphenbildung die Lokalisation von Tsa1p an die Zellwand, nicht jedoch die Expression induziert.

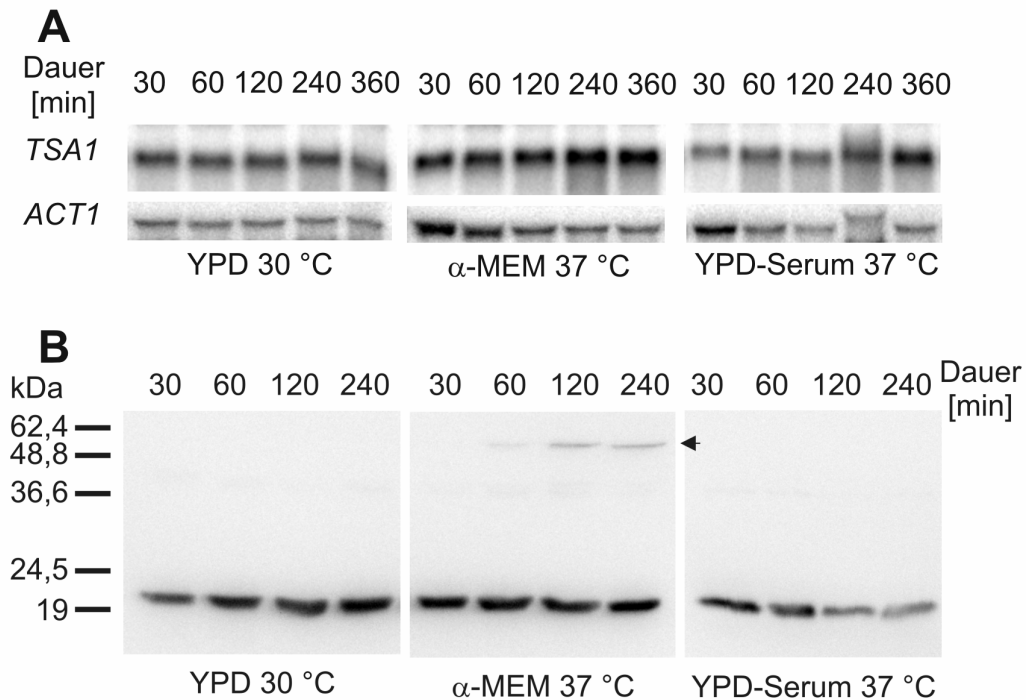


Abbildung 18: *TSA1* ist kein hyphal induziertes Gen.

Northern Blot (A) und Western Blot (C). Wildtypzellen wurden in MEM 37 °C, YPD-Serum 37 °C und YPD 30 °C kultiviert. Zu den gekennzeichneten Zeiten wurden Proben entnommen und RNA bzw. Protein isoliert, mittels Gelelektrophorese separiert und auf die entsprechende Membran transferiert. Die RNA Blots wurden mit spezifischer *TSA1*- und *ACT1*-Sonde hybridisiert. Die Protein Blots wurden mit TSA-Antikörper detektiert. Pro Spur wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Der Pfeil (C) markiert ein Protein, mit dem der Antikörper kreuzreagiert und das nur in α-MEM exprimiert wird (siehe auch Abb. 15).

6.3.2 Charakterisierung des Gen-Lokus von *TSA1* in *C. albicans*

In *C. albicans* existieren vier identische Kopien von *TSA1*, Je zwei Genloki mit je zwei Allelen (Anhang Sequenzierung). Sie befinden sich auf Contig 19-2514, wobei einer der beiden Loci nicht vollständig auf diesem Abschnitt liegt. Nur 357 Basenpaare des 5'-Endes (Abb. 19) sind darauf zu finden. Durch Sequenzierung eines spezifischen PCR-Produkts wurde gezeigt, dass am 5' Ende des Contigs 19-2514 (*TSA1*-Genlokus b) tatsächlich noch ein vollständiger offener Leserahmen von *TSA1* folgt. Dazu wurde ein Oligonukleotid (*tSa2a1F*) synthetisiert, das komplementär zu einer Region außerhalb des offenen Leserahmens war, die nicht homolog zu Regionen um den *TSA1*-Genlokus a waren. Ein Oligonukleotid (*rev3tsa*) identisch zu dem komplementären Strang jenseits des 3'-Endes des *TSA1*-Genlokus a wurde als zweiter Primer für eine PCR-Amplifikation verwendet. Es entstand ein spezifisches Produkt mit einer Länge von 2100 Basenpaaren (Daten nicht gezeigt). Da der Primer *tSa2a1F*

nicht am *TSA1*-Genlokus a binden konnte, deutet die Entstehung des PCR-Produkts darauf hin, dass tatsächlich eine vollständige Kopie des offenen Leserahmens am 5'-Ende des Contigs-19-2514 liegt und dass auch der 3'-Bereich (ca. 560 bp) nach den ORFs identisch ist.

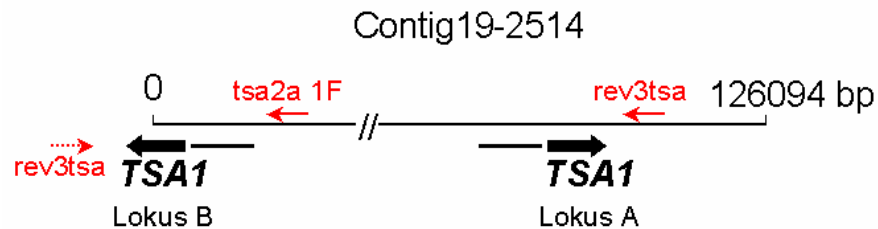


Abbildung 19: Schema der verschiedenen *TSA1*-Genloki im Genom von *C. albicans*.

Alle vier Allele lagen auf dem selben Contig. Sequenzierung mittels spezifischer Oligonukleotide ergab, dass am 5'-Ende des Contigs noch ein vollständiger offener Leserahmen von *TSA1* vorhanden war. Schwarze Linie in 5'-Richtung vor den ORFs markiert die hoch homologe Region.

Jeweils ca. 600 bp in 5'-Richtung der offenen Leserahmen lag eine hoch homologe Sequenz (99 % identisch laut Datenbank, 100 % identisch laut Sequenzierergebnis dieser Arbeit). Diese Sequenz wurde mittels der Promotorbindestellen-Analyse Software MALT-Inspector von Genomatx untersucht. Für die Transkriptionsfaktoren Hap1p und Hap2p/3p/5p wurden potentielle Bindestellen im *TSA1*-Promotor erkannt. Diese „*in silico*“ Daten stimmen gut mit bisherigen Erkenntnissen aus Promotorstudien von *S. cerevisiae* überein. ScTsa2p wird durch die Transkriptionsfaktoren Yap1p, Skn7p, Msn2p/Msn4p, Hap1p und Hap2p/3p/5p reguliert. Sc*TSA1* wird ebenfalls durch Yap1p und Skn7p reguliert und beide Proteine binden direkt an den Promotor von Sc*TSA1* (70). Bisher wurden jedoch keine Konsensussequenzen für Bindestellen dieser Transkriptionsfaktoren identifiziert.

6.3.3 Deletion des Gens *TSA1*

Um eindeutige Aussagen über die Funktion von *TSA1* in *C. albicans* machen zu können, wurde das Gen deletiert. Die Tatsache, dass bis heute noch keine Sporulation des Pilzes nachgewiesen werden konnte, erforderte die sequentielle Deletion aller vorhandenen Kopien des Gens in diesem diploiden Organismus. Die Deletion erfolgte nach einer Methode (45), die es erlaubt, den Selektionsmarker durch eine induzierbare FRT-spezifische Rekombinase aus *E. coli* wieder zu gewinnen (Abschnitt 5.4,

5.5 und 5.6). Mitotische Rekombination wird dabei minimiert, weil kein negatives Selektionsschema für den genetischen Marker benötigt wird. Die einzelnen Transformationsschritte wurden mittels Southern Blot überprüft. Durch Verdau genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym *PstI* konnten die zwei verschiedenen Loci für *TSA1* unterschieden werden (Abb. 20). Für die Rekonstitution des *URA3*-Gens wurde der Expressionsvektor pCaExp verwendet, der ektopisch in das Genom integriert (46). Die Rekonstitution des deletierten *TSA1*-Gens wurde ebenfalls mittels Integration dieses Vektors erreicht, der neben *URA3* zusätzlich eine vollständige Kopie des *TSA1*-Gens enthielt (nativer Promotor, 1000 bp; offener Leserahmen, 591 bp; Terminator; 210 bp; insgesamt: 1,8 kb). Auf diese Weise sind sowohl die Deletions- als auch die Reversionsstämme am selben Locus mit *URA3* oder *TSA1* und *URA3* rekonstituiert.

Für die in Abbildung 20 A, B und D dargestellten Blots wurde eine Sonde verwendet, die mit den letzten 300 bp im *TSA1*-ORF und bis 200 bp nach dem Stop-Codon im 3'-Bereich des *TSA1*-Gens hybridisierte. Für die Mutante in Spur 9 ($\Delta tsa1a::FRT/\Delta tsa1a::FRT$ *TSA1b/TSA1b*) musste für weitere Deletionen eine andere Strategie verfolgt werden, da durch Restriktionsverdau mit *PstI* nicht erkannt werden konnte, ob eines der beiden noch verbliebenen Allele am *TSA1*-Genlocus b transformiert worden war (Abb. 19). Daher wurde eine Sonde verwendet, die spezifisch im 5'-Bereich des *TSA1* im Genlocus b bindet. Dadurch wurden im Southern Blot nur dann zusätzliche DNA-Fragmente detektiert, falls die Transformationskassette im *TSA1*-Genlocus b integriert hatte. Die vierte Transformationsrunde konnte anschließend durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* überprüft werden, da in diesem Fall, alle Wildtyp-Allele verschwanden. Für *EcoRI* existierten keine Restriktionspolymorphismen an den beiden Genloki.

Die Expression des *TSA1* Gens in Deletions- und rekonstituierten Stämmen wurde mittels Northern und Western Blot überprüft (Daten nicht gezeigt).

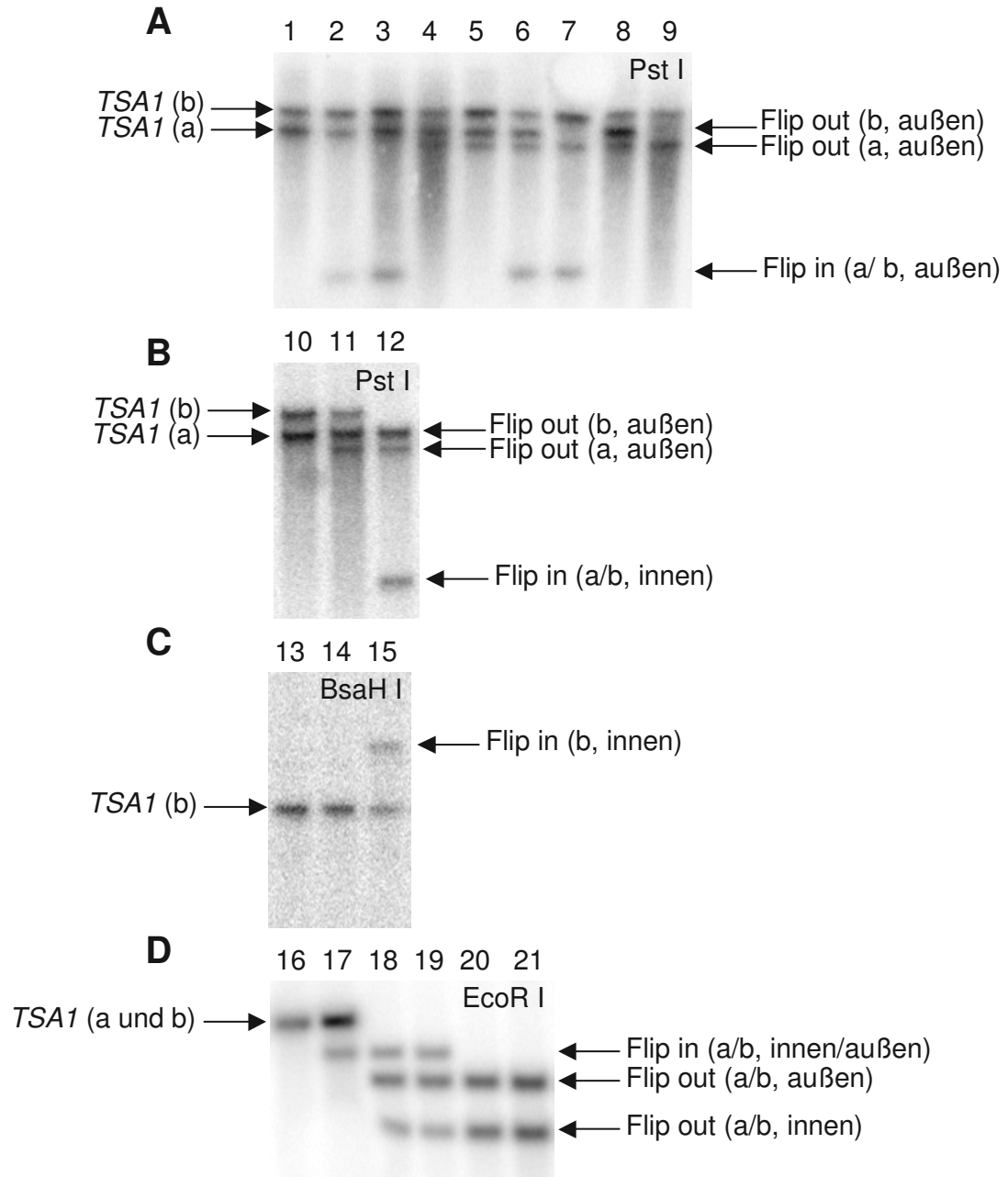


Abbildung 20: Deletion der vier Allele von *TSA1*.

Überprüft mittels Southern Blot. Im folgenden sind die pro Spur dargestellten Stämme aufgelistet: CAI 4 (1, 10, 13, 16); *TSA1a/Δtsa1a::URA3-FRT TSA1b/TSA1b* (2,3,17); *TSA1a/Δtsa1a::FRT TSA1b/TSA1b* (4,5); *TSA1a/Δtsa1a::FRT TSA1b/Δtsa1b::URA3-FRT* (6); *Δtsa1a:: FRT/Δtsa1a::URA3-FRT TSA1b/TSA1b* (7); *TSA1a/Δtsa1a:: FRT TSA1b/Δtsa1b::FRT* (8, 11); *Δtsa1a:: FRT/Δtsa1a:: FRT TSA1b/ TSA1b* (9, 14); *TSA1a/Δtsa1a:: FRT Δtsa1b::URA3-FRT/Δtsa1b::FRT* (12), *Δtsa1a::FRT/Δtsa1a::FRT TSA1b/Δtsa1b::URA3-FRT* (15), *Δtsa1a::URA3-FRT /Δtsa1a::FRT Δtsa1b::FRT/Δtsa1b::FRT* (18), *Δtsa1a::FRT/Δtsa1a::FRT Δtsa1b::URA3-FRT/Δtsa1b::FRT* (19), *Δtsa1a::FRT/Δtsa1a::FRT Δtsa1b::FRT/Δtsa1b::FRT* (20,21). PstI, BsaHI und EcoRI kennzeichnen die verwendeten Restriktionsendonukleasen. Flip-in: Transformationskassette mit Selektionsmarker, Flip-out: Transformationskassette durch Aktivierung der FRT-spezifischen Rekombinase entfernt. Der resultierende Stamm ist daher ohne Selektionsmarker (Abschnitt 5.4). Außen: Transformationskassette mit flankierenden Regionen außerhalb des ORFs von *TSA1*. Innen: Transformationskassette mit flankierenden Regionen, die zwischen den äußeren flankierenden Regionen und dem *TSA1*-ORF liegen (Abschnitt 5.5).

6.3.4 Untersuchungen mit *Δtsa1*-Stämmen

In verschiedenen eukaryontischen Organismen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen für TSA-ähnliche Proteine beschrieben (Abschnitt 3.4).

Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob Tsa1p in *C. albicans* aufgrund der differenziellen Lokalisation mehrere verschiedene Funktionen in der Zelle wahrnimmt und ob eine dieser Funktionen zur Pathogenität dieses Pilzes beiträgt. Als Leitfaden dienten dabei Erkenntnisse über Tsa1p aus *S. cerevisiae*. In erster Linie wurde Tsa1p der Bäckerhefe als Peroxidase charakterisiert (24). Zusätzlich wurde beschrieben, dass *Δtsa1*-Mutanten deutlich weniger resistent gegenüber Hitzeschock sind (28,36), dem Protein eine Funktion bei der Erhaltung der genetischen Stabilität zukommt (37) und *TSA1* für die Induktion von Antioxidant-Genen benötigt wird (38).

6.3.4.1 Virulenz in einem murinen Tiermodell für systemische Infektionen

Für Thioredoxin Peroxidasen aus dem pathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* wurde bereits gezeigt, dass sie für dessen Pathogenität essenziell sind (71). Dabei wurden für diese Enzyme Funktionen in der Abwehr reaktiver Sauerstoffverbindungen vorgeschlagen, die von phagozytierenden Zellen des Immunsystems des Wirtes gebildet werden. (Abschnitt 3.3). In einem Tiermodell der Maus für eine systemische Infektion wurde der Einfluss von *TSA1* auf die Virulenz von *C. albicans* untersucht.

Dazu wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen des $\Delta tsa1$ -Stammes Can312 und der entsprechenden rekonstituierten Mutante Can313 in die Schwanzvene von mehreren Mäusen injiziert (Abschnitt 5.20). Die Sterblichkeit der Mäuse wurde über mehrere Wochen verfolgt (Abb. 21). Unterschiede der Sterblichkeiten der Mäuse, die mit den beiden Stämmen infiziert wurden, konnten nicht beobachtet werden. Etwa 15 Tage nach der Infektion waren in beiden Fällen sämtliche Mäuse tot. Auch die Untersuchung mit einem anderen Stämme-Paar (Can314 und Can315) führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Daher war *TSA1* wahrscheinlich nicht essenziell für die Etablierung einer systemischen Infektion. Diese Untersuchungen wurden in der Gruppe von Dr. K. Schröppel an der Universität Nürnberg-Erlangen durchgeführt. Auch in Adhäsions- und Invasions-Assays mittels Zellkultursystemen (72) wurden keine Unterschiede der Stämme festgestellt (Daten nicht gezeigt). Folglich war *TSA1* in diesen Modellen weder für die Adhäsion an Wirtsgewebe noch für dessen Penetration zwingend notwendig.

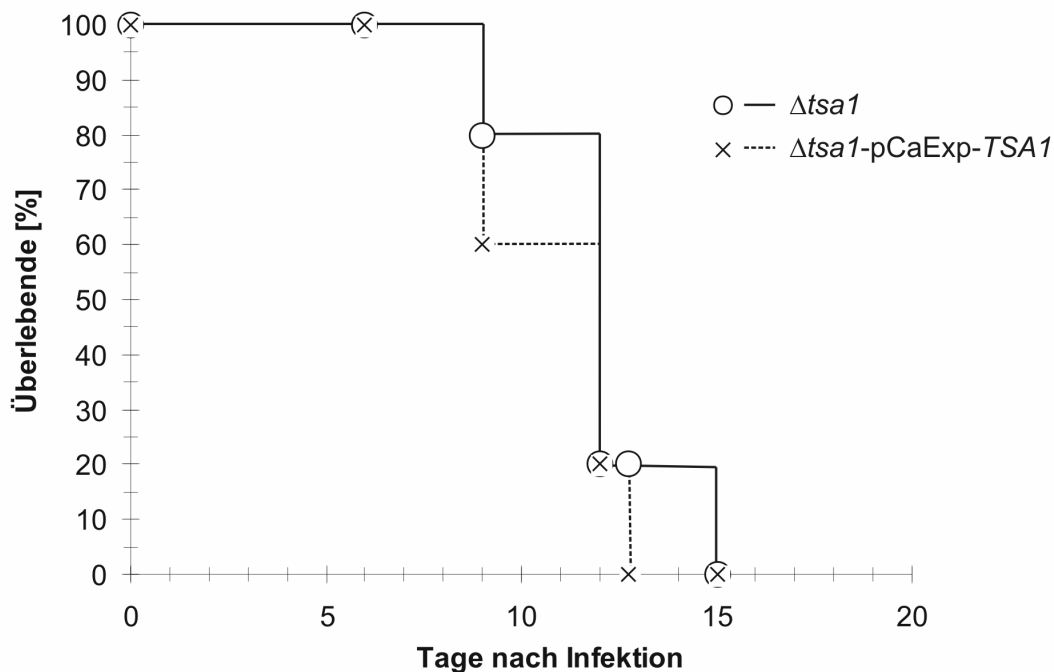


Abbildung 21: Infektionsmodell einer systemischen Kandidose in Mäusen.

Die $\Delta tsa1$ -Mutante Can312 war nicht attenuiert im Vergleich zur rekonstituierten Mutante Can313. $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in die Schwanzvene von je fünf Mäusen injiziert und die Sterblichkeitsrate aufgezeichnet.

6.3.4.2 Funktion als Peroxidase

Das Ortholog von *TSA1* in *S. cerevisiae* wurde als eine thioispezifische Peroxidase charakterisiert, die Wasserstoffperoxid und Alkylperoxide unter Verwendung von Thioredoxin als Kofaktor reduzieren kann (73). Diese Funktion wurde auch TSA-ähnlichen Proteinen anderer Organismen zugeordnet. Auch Thiol-Verbindungen können durch Bildung des Thiyl-Radikals ähnliche Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA verursachen, wie Hydroxyl-Radikale oder andere reaktive Sauerstoffverbindungen (69). Thiol-abhängige Peroxidasen, wie ScTsa1p, sind in der Lage, Thiyl-Radikale unschädlich zu machen (73). Daher wurden In Platten-Assays die $\Delta tsa1$ -Mutante Can313 und die dazugehörige rekonstituierte Mutante Can314 nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 und der Thiol-Verbindung DTT getestet.

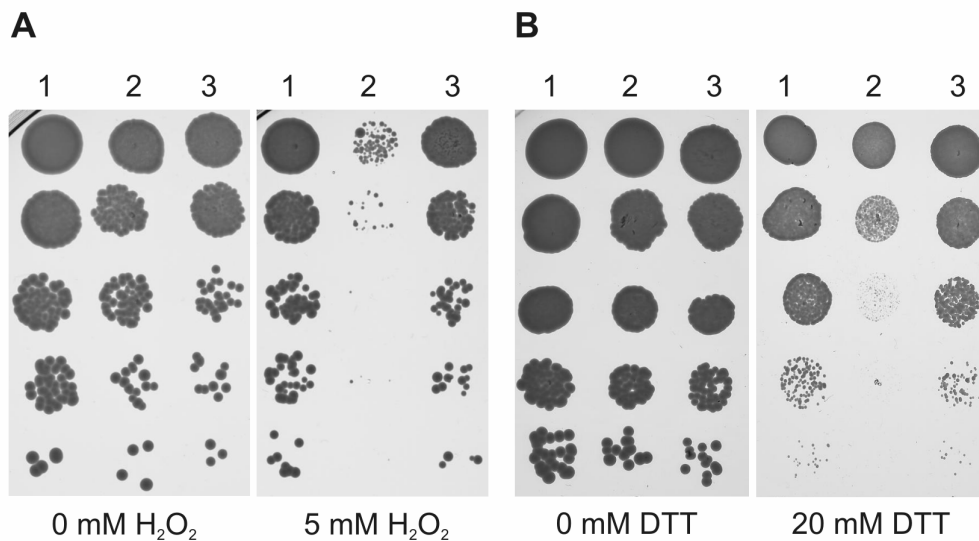


Abbildung 22: $\Delta tsa1$ -Mutante sind sensitiver gegenüber H_2O_2 und DTT.

Repräsentative Sensitivitäts-Tests der $\Delta tsa1$ -Mutanten (Reihe 2), der rekonstituierten Mutanten (Reihe 3) im Vergleich zum Wildtyp SC 5314 (Reihe 1). YPD-Platten wurden mit angegebenen Mengen von H_2O_2 und DTT supplementiert, jeweils fünffache Verdünnungen von Zellen aus einer Vorkultur (YPD 30 °C) beginnend mit 10^5 Zellen wurden ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die $\Delta tsa1$ -Mutante zeigte eine verminderte Resistenz gegenüber H_2O_2 und DTT (Abb. 22). Dieser Effekt wurde in den Mutanten mit einer funktionellen Kopie des *TSA1*-Gens nahezu vollständig rekonstituiert und konnte mit dem unabhängigen Deletionsstamm Can297 und der rekonstituierten Mutante Can298 reproduziert werden

(Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde der Einfluss auf die Sensitivität gegenüber der folgenden Substanzen getestet, von welchen bekannt war, dass sie oxidativen Stress verursachen können:

Cadmium-Ionen, Diamid, Menadion und Peroxynitrit. Jedoch zeigten die Deletionsstämme keine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Substanzen (Daten nicht gezeigt).

6.3.4.3 Hitzeschock

In *S. cerevisiae* führte die Abwesenheit von *TSA1* zu einer erhöhten Sensitivität bei Hitzeschock, was darauf zurückgeführt wird, dass bei hohen Temperaturen mehr reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen (36). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass ScTsa1p durch Oligomerisierung zu hochmolekularen Komplexen die Funktion eines Chaperons übernimmt (28). Die Oligomerisierung und die daran gekoppelte Chaperonfunktion kann sowohl durch Hitzeschock als auch durch H_2O_2 induziert werden.

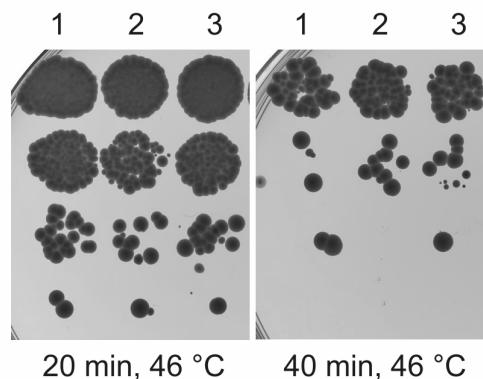


Abbildung 23: Verlust von *TSA1* hat keine signifikante Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hitzeschock.

Wildtypzellen, $\Delta tsa1$ -Mutanten und rekonstituierte Mutanten wurden in YPD 30 °C bis zur mittleren Log-Phase kultiviert, auf $OD_{600} = 10$ eingestellt, zentrifugiert, im Restvolumen aufgenommen und in vortemperiertes YPD gegeben (46 °C). Nach 20 bzw. 40 min wurden 1ml-Aliquots entnommen, kurz auf Eis abgekühlt und in Verdünnungen ausplattiert (1:10).

In *C. albicans* jedoch war der Deletionsstamm Can312 nicht weniger resistent gegenüber Hitzeschock als die rekonstituierten Mutante Can313 und der Wildtyp (Abb. 23). Jeweils gleiche Zellzahlen ($OD_{600} = 10$) wurden in 10 ml YPD Medium überführt, das bei 46 °C temperiert wurde. Um die Überlebensfähigkeit der Zellen

nach dem Hitzeschock zu ermitteln, wurden nach 20 min bzw. 40 min jeweils 1 ml Kultur entnommen und kurz auf Eis gekühlt. Davon wurden je 10 µl und jeweils zehnfache Verdünnungen auf YPD-Platten pipettiert (Abb. 23). Nach 40 min bei 46 °C konnte ein Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Stämme beobachtet werden, aber es bestanden keine Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp. Das Ergebnis wurde mit der unabhängigen *Δtsa1*-Mutante Can297 bestätigt (Daten nicht gezeigt).

6.3.4.4 Funktionen als Signalmolekül - Transkriptionelle Analysen mittels genomweiter DNA-Mikroarrays

ScTsa1p wurde bereits als transkriptioneller Aktivator für bestimmte oxidative Stress-Gene, wie z. B. Thioredoxin Reduktase (*TRR1*) in *S. cerevisiae* beschrieben (38). Da sowohl die Kernlokalisation als auch die hyphale Oberflächenlokalisation von Tsa1p in *C. albicans* bisher unbekannt war, wurde untersucht, ob Tsa1p möglicherweise ein oxidativer Sensor sein könnte, der die Regulation von Genen auf transkriptioneller Ebene beeinflusst. Dafür wurden Transkriptionsanalysen mittels genomweiten DNA-Mikroarrays durchgeführt. Drei Bedingungen wurden gewählt, unter welchen jeweils die *Δtsa1*-Mutante Can312 mit dem Wildtypstamm SC 5314 verglichen wurde:

1. fünf Stunden YPD 30 °C und 30 Minuten 5 mM H₂O₂ (oxidativer Stress).
2. Sechs Stunden α-MEM bei 37 °C (Hypheninduktion).
3. sechs Stunden YPD bei 30 °C als Referenzbedingung.

Die Bedingungen wurden gewählt, da Tsa1p in *C. albicans* zum einen Funktionen in der Abwehr von oxidativem Stress übernimmt (Abschnitt 6.3.4.2) und zum anderen Tsa1p nur durch Hyphenbildung in die Zellwand transportiert wird (Abschnitt 6.2.1).

Die Auswertung der Transkriptionsdaten mittels Scatter Plots zeigte, dass bei oxidativem Stress (5 mM H₂O₂) und Hyphenbildung (α-MEM, 37 °C) Gene in der *Δtsa1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm sowohl stärker als auch schwächer transkribiert wurden (Abb. 24). Gene, die nicht disreguliert sind, liegen auf der Diagonalen des Diagramms. In YPD bei 30 °C änderte sich die Expression nur sehr weniger Gene (Abb 24). Durch den Verlust von *TSA1* wurde somit vor allem die Expression von Genen bei oxidativem Stress und bei hyphalem Wachstum beeinflusst. Die Auswertungen der Transkriptionsanalysen sind in den folgenden Absätzen zusammenge-

fasst. Es wurden nur Gene aufgeführt, die in der Δ -*tsa1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Stamm mindestens zweifach hoch oder herunter reguliert waren.

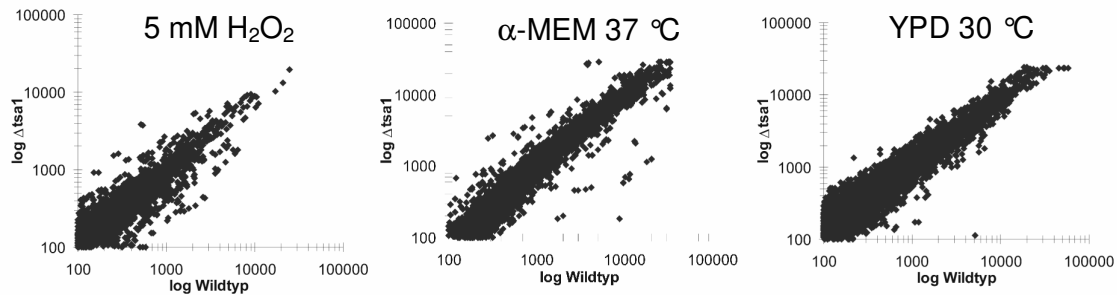


Abbildung 24: Transkriptionsanalysen der Δ *tsa1*-Mutante Can312 im Vergleich zum Wildtyp SC 5314.

Die Stämme wurden in YPD bei 30 °C mit 5 mM H_2O_2 , in α -MEM bei 37 °C und in YPD bei 30 °C kultiviert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Cy3- und Cy5-markierte cDNA wurde mittels reverser Transkription hergestellt. Entsprechende Cy3- und Cy5-markierte cDNA wurde vereinigt und auf einem Mikroarray hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale wurden in einem Epifluoreszenz-Scanner ausgelesen, normalisiert und als Scatter Plots dargestellt. Jeweils ein Punkt stellt ein Gen dar. Die Achsen repräsentieren die Signalintensitäten unter der angegebenen Bedingung. Die dargestellten Blots sind Hybridisierungen mit Cy3-markierter cDNA des Wildtyps (X-Achse) und Cy5-markierter cDNA der Mutante (Y-Achse).

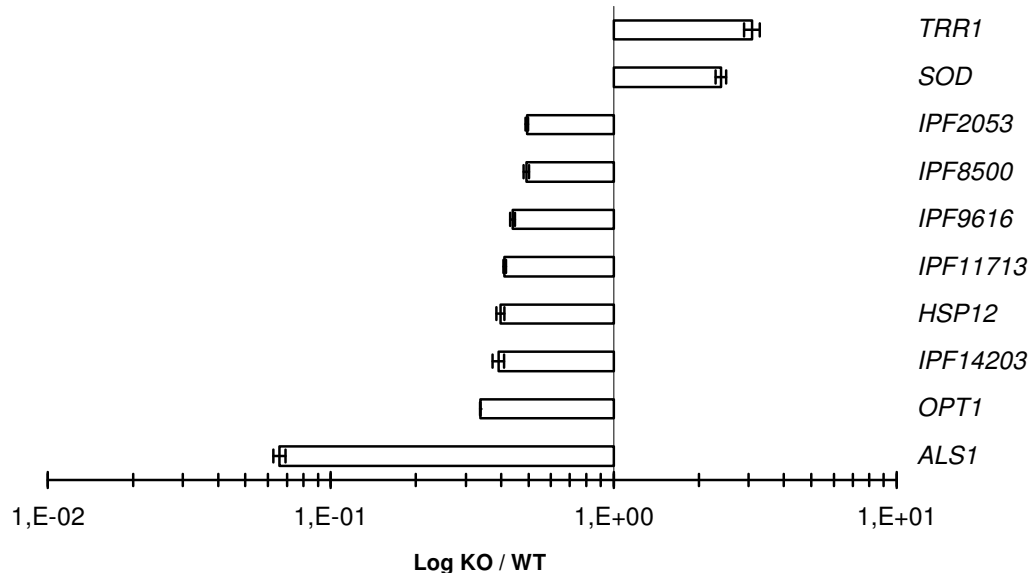


Abbildung 25: Disregulierte Gene der Δ *tsa1*-Mutante in YPD 30 °C.

Vergleich der Δ *tsa1*-Mutante mit dem Wildtypstamm. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und jedes Gen befindet sich als Duplikat auf den DNA-Mikroarrays. Somit setzte sich jeder Mittelwert aus vier Datenpunkten zusammen. X-Achse: Das mittlere Verhältnis der absoluten Expressionen, die Fehlerbalken stellen deren mittlere Abweichung dar (logarithmische Skalierung).

YPD 30 °C - Referenzbedingung

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* war *TSA1* in *C. albicans* nicht für die H₂O₂-abhängige Induktion von *TRR1* notwendig. Im Gegenteil, *TRR1* wurde in der Δ *tsa1*-Mutante Can313 im Vergleich zum Wildtyp SC 5314 sowohl in YPD (Abb. 25, 27) als auch in YPD mit 0,1 mM H₂O₂ drei- bis fünffach stärker exprimiert (Daten nicht gezeigt). Tsa1p war folglich nicht für die transkriptionelle Induktion von *TRR1* notwendig.

In YPD bei 30 °C wurden in der Δ *tsa1*-Mutante insgesamt nur zehn Gene mehr als zweifach disreguliert (Abb. 25). Nur zwei Gene, *TRR1* und *IPF1222*, einem Gen mit starker Homologie zu Superoxid-Dismutasen (SOD), waren in der Mutante stärker transkribiert. Das deutet daraufhin, dass in der Mutante durch den Verlust von Tsa1p mehr ROS gebildet wurden und die Zelle dies durch die erhöhte Transkription der beiden Antioxidant-Gene zu kompensieren versucht. Herunterreguliert waren acht Gene (Abb. 25): Ein Zellwand-Gen *ALS1*, ein Oligopeptid-Transporter *OPT1*, ein Hitzeschock-Protein *HSP12* und fünf unbekannter Funktion (*IPF14203* (CA0934), *IPF11713* (CA1330), *IPF9616* (CA2024), *IPF8500* (CA2389), *IPF2053* (CA4983)).

5 mM H₂O₂ – Oxidativer Stress

Bei 5 mM H₂O₂ waren insgesamt 67 Gene disreguliert (Tab. 10), was die Annahme unterstützt, dass Tsa1p für die Abwehr von oxidativem Stress notwendig ist. Insgesamt 21 Gene wurden in der Mutante mindestens zweifach stärker exprimiert. Vier dieser Gene sind Antioxidant-Gene: *COR33* ein durch Cadmium induziertes Gen, das auch Resistenz gegenüber H₂O₂ vermittelt (persönliche Mitteilung Dr. Kai Sohn), *GPX1* und *GPX2* (Glutathion-Peroxidasen) und *IPF12303* (Glutathion-S-Transferase Homolog).

Sechs Gene haben Funktionen im Aminosäure-Metabolismus, wobei drei davon an der Biosynthese von Glutathion beteiligt sind, nämlich *ECM17* (Sulfit-Reduktase), *MET15* (O-Acetylhomoserin-O-Acetylserin Sulfhydrylase), *GDH3* (Glutamatdehydrogenase). Die betroffenen Biosynthesewege wurden skizziert (Abb. 26). Zwei weitere Gene dieses Biosynthesewegs, *MET2* und *GSH1*, sind zwar nicht in der Mutante disreguliert, jedoch induziert im Wildtyp unter 5 mM H₂O₂ (Daten nicht gezeigt, Abb. 26).

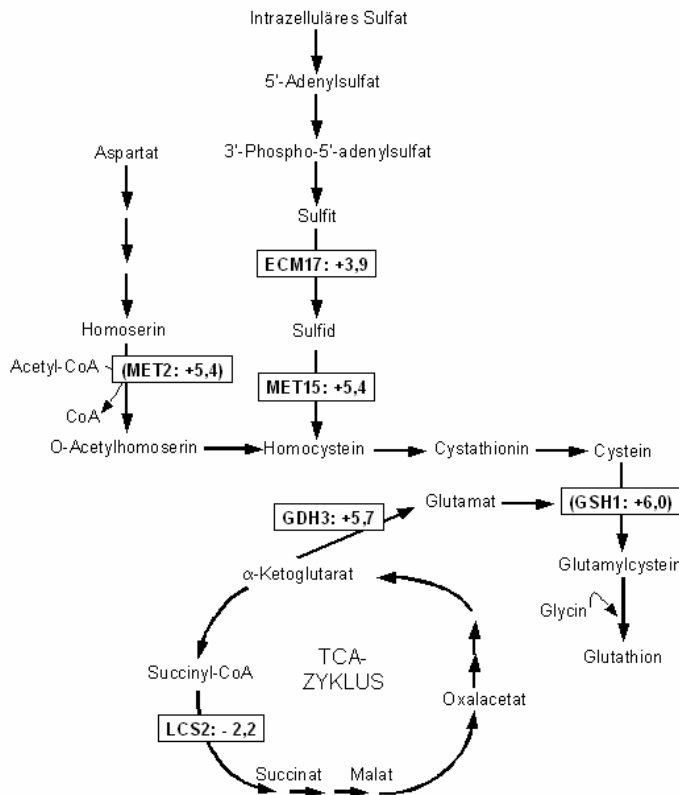


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Cystein und Glutathion-Biosynthese.

Die im *Δtsa1*-Stamm disregulierten Gene beteiligter Enzyme und der Faktor der Disregulation sind in den Kästchen angezeigt. In Klammern sind Gene angegeben, die in Wildtypzellen durch 5 mM H₂O₂ um den jeweiligen Faktor induziert wurden.

LYS21 kodiert eine Homocitrat Synthase. Homologe dieses Enzyms werden in *S. cerevisiae* durch *YAP1* reguliert (70) und durch H₂O₂ und Menadion transkriptionell stark induziert (>2,8; www.yeastgenome.org). *ILV5* kodiert eine mitochondrielle Ketol-Säure Redukto-Isomerase, die in der Biosynthese von Leucin und für die Erhaltung von mitochondrieller DNA notwendig ist (74). Das Gen der Glutamat Synthetase *GLN1* wird ebenfalls stärker transkribiert. *GLN1* ist ein Hauptregulator des Stickstoff-Stoffwechsels der Zelle (75). Tsa1p wurde ursprünglich als protektives Agens genau dieses Enzyms beschrieben (73). Das Gen des Enzyms Pyc2p (Pyruvatcarboxylase), dessen Reaktion neben dem Pentosephosphatweg Hauptlieferant des Reduktions-äquivalents NADPH ist (70,75), wurde in der Mutante ebenfalls verstärkt transkribiert. Vier Gene kodieren Zellwand-Proteine: die Agglutinine *ALS4* und *ALS12*, eine potentielle Glukosidase *SUN42* und *YWP1*. Die Agglutinine bilden in *C. albicans* eine große Proteinfamilie von Adhäsinen, deren Mitglieder untereinander hoch homolog sind. Bemerkenswerterweise sind *ALS4* und *ALS12* auch im Wildtyp durch 5 mM H₂O₂ drei- bis vierfach induziert (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase (*INO1*) und fünf Gene von unbekanntem Genprodukt ver-

stärkt transkribiert. *INO1* wurde bereits als Gen identifiziert, welches in oxidativem Stress in *C. albicans* stärker transkribiert wird (76).

Tabelle 10: Auswertung der genomweiten Transkriptionsanalyse bei 5 mM H₂O₂.

Gene, die in der <i>Δtsa1</i> -Mutante stärker transkribiert werden									
Klasse	Mittl. Intensität Wildtyp	Mittl. Abw. WT ^a	Mittl. Intensität <i>Δtsa1</i>	Mittl. Abw. <i>Δtsa1</i>	<i>Δtsa1</i> /WT	Mittl. Abw. <i>Δtsa1</i> /WT	Id ^b	Genname	Funktion / Homolog
Antioxidant Gene	3417,44	368,44	533,39	12,73	6,41	0,743	11929.2 CA1190	<i>CIP1</i>	Cytosolische Oxidoreduktase (Homolog)
	856,48	13,50	361,19	20,44	2,38	0,172	13205.1 CA0558	<i>GPX2</i>	Glutathione Peroxidase (Homolog)
	2012,54	211,56	934,06	164,56	2,18	0,158	13207.2 CA0559	<i>GPX1</i>	Glutathione Peroxidase (Homolog)
	3052,49	421,63	1415,77	126,77	2,15	0,107	12303.2 CA4392	<i>IPF12303</i>	Glutathione-S-Transferase (Homolog)
AminosäureStoffwechsel	1481,35	181,01	80,79	18,40	18,99	2,611	8236.1 CA1579	<i>GDH3</i>	NADP-Glutamat Dehydrogenase (Homolog)
	1637,93	64,20	288,86	18,11	5,69	0,184	15149.2 CA1855	<i>GLN1</i>	Glutamat Synthase (Homolog)
	994,18	82,67	186,90	25,90	5,38	0,333	12125.2 CA2565	<i>MET15</i>	O-Acetylhomoserin O-Acetylserine Sulphydrylase
	566,77	67,20	148,39	18,72	3,86	0,543	8340.1 CA4320	<i>ECM17</i>	Putative Sulfite Reduktase (Homolog)
	875,88	155,96	408,22	90,72	2,17	0,101	18482.1 CA2335	<i>LYS21</i>	Homocitrat Synthase (Homolog)
	1292,42	83,34	601,97	65,18	2,16	0,173	9595.2 CA1983	<i>ILV5</i>	Ketol-Säure Reducto-Isomerase (Homolog)
Zellwand-Gene	1803,44	271,97	673,69	122,94	2,69	0,088	13009.2 CA1528	<i>ALS4</i>	Agglutinin-like Protein 4
	2645,61	182,23	1021,01	127,01	2,61	0,157	18994.1 CA0413	<i>ALS12</i>	Agglutinin-like Protein 12
	1440,95	46,01	578,19	30,22	2,50	0,116	10421.1 CA5232	<i>SUN42</i>	Putative Zellwand beta-Glucosidase (Homolog)
	2285,67	60,86	927,95	36,45	2,47	0,076	5185.2 CA1678	<i>YWP1</i>	Yeast Wall Protein 1
nicht-klassifizierte Gene	566,77	67,20	145,54	1,11	4,13	0,147	904.1 CA5986	<i>INO1</i>	Myo-Inositol-1-Phosphat Synthase
	1322,57	24,34	394,89	35,39	3,39	0,356	15167.2 CA1464	<i>PYC2</i>	Pyruvat Carboxylase 2 (Homolog)
	720,82	63,76	259,37	26,48	2,79	0,091	4999.2 CA2874	<i>IPF4999</i>	unbekannte Funktion
	620,99	65,31	251,91	41,15	2,49	0,206	6342.1 CA1458	<i>IPF6342</i>	unbekannte Funktion
	1433,21	102,28	587,04	47,03	2,46	0,257	11029.2 CA2053	<i>IPF11029</i>	unbekannte Funktion
	1461,73	243,97	626,75	59,28	2,32	0,315	11888.1 CA4416	<i>IPF11888</i>	unbekannte Funktion
	4783,50	491,80	2178,73	99,98	2,21	0,328	17186.2 CA0828	<i>IPF17186</i>	unbekannte Funktion
Gene, die in der <i>Δtsa1</i> -Mutante geringer transkribiert werden									
TSA1	2,26	1,89	8719,18	579,57	2,48E-04	1,93E-04	2431.1 CA5714	<i>IPF2431</i>	Thiol-spezifisches Antioxidant-Protein (Homolog)
	26,67	5,58	3381,56	147,06	7,84E-03	1,49E-03	18076.1 CA5697	<i>IPF18076</i>	Thiol-spezifisches Antioxidant-Protein (Homolog)
Monooxygenasen	259,99	45,09	1463,96	223,04	0,18	0,004	5688.1 CA2225	<i>SUR2</i>	Ceramid Hydroxylase (Homolog)
	851,33	97,57	3321,28	397,72	0,26	0,005	19729.1 CA1353	<i>ERG1</i>	Squalene Epoxidase
	408,61	18,79	1145,25	144,50	0,36	0,030	5819.1 CA4852	<i>SCS7</i>	Ceramid Hydroxylase (Homolog)

Glycerin-Stoffwechsel	434,85	7,72	2507,58	246,17	0,18	0,020	1139.1 CA5788	<i>RHR2</i>	DL-Glycerol Phosphatase
	263,28	12,22	905,27	126,77	0,30	0,042	6860.1 CA2263	<i>GPD1</i>	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (Homolog)
Kohlhydrat-Stoffwechsel	1378,05	213,73	5272,91	835,20	0,26	0,037	4109.2 CA1067	<i>HXT62</i>	Zucker Transporter
	517,45	135,60	1888,54	548,54	0,28	0,009	18773.1 CA1069	<i>HXT5</i>	Zucker Transporter
	1274,69	176,60	4503,33	395,16	0,28	0,020	753.1 CA5505	<i>TPS3</i>	Alpha,Alpha-Trehalose-Phosphate Synthase (Homolog)
	1632,06	97,12	5435,41	764,59	0,30	0,025	5750.2 CA3112	<i>PFK2</i>	6-Phosphofruktokinase
	572,66	7,05	1832,79	439,54	0,33	0,081	4104.2 CA1070	<i>HXT61</i>	Zucker Transporter
	1837,00	140,14	5256,78	333,78	0,35	0,049	4286.2 CA0127	<i>HXK2</i>	Hexokinase II (Homolog)
	1724,22	410,29	4554,47	1343,0 3	0,38	0,046	3234.1 CA2474	<i>PDC11</i>	Pyruvate Decarboxylase (Homolog)
	1405,03	122,84	3175,80	306,65	0,45	0,056	294.1 CA5467	<i>GSY1</i>	Glycogen Synthase (Homolog)
	516,62	24,60	1058,89	150,39	0,49	0,047	16449.2 CA2758	<i>GLC3</i>	1,4-Glucan Branching Enzym (Homolog)
291,22	14,21	613,22	120,03	0,50	0,103	2471.1 CA5728	<i>IPF2471</i>	Maltose Acetyltransferase	
Zellwand-Gene	245,56	26,50	682,61	139,86	0,37	0,036	13002.1 CA0316	<i>ALS1</i>	Agglutinin-ähnliches Protein 1
	254,38	23,24	659,61	85,61	0,39	0,015	7144.2 CA3987	<i>ECM3</i>	Zellwandbiogenese und -Architektur (Homolog).
	656,64	61,18	1565,69	221,53	0,42	0,019	19968.1 CA3030	<i>IPF19968</i>	PIR Protein
	292,79	25,71	694,00	93,19	0,43	0,031	4215.2 CA4700	<i>SAP9</i>	Aspartyl Proteinase 9 (Homolog)
Aminosäure-Stoffwechsel	356,74	74,91	921,45	111,80	0,38	0,035	14202.2 CA0934	<i>IPF14203</i>	Homolog zu Transaminasen
	490,18	67,28	1442,19	117,94	0,34	0,036	2755.2 CA2266	<i>HEM1</i>	5-aminolevulinic acid synthase
	257,67	51,76	776,02	220,27	0,34	0,030	14203.2 CA0935	<i>IPF14203</i>	Homolog zu Transaminasen
	681,75	63,17	1547,73	161,27	0,45	0,088	12204.1 CA0664	<i>LSC2</i>	Succinate-CoA Ligase (Homolog)
Resistenz-Gene	354,01	112,74	928,87	315,44	0,38	0,035	10349.2 CA3895	<i>CDR4</i>	Multidrug Resistenz Protein
	958,85	77,96	2405,46	575,46	0,42	0,073	961.1 CA5965	<i>IPF961</i>	Multidrug Resistenz Protein (Homolog)
Ribonucleoside-Diphosphat Reduktasen	714,30	265,40	1734,49	538,99	0,40	0,027	4053.1 CA4492	<i>RNR22</i>	Ribonucleoside-Diphosphat Reduktase (Homolog)
	542,94	111,06	1265,38	247,69	0,43	0,046	10991.2 CA4155	<i>RNR21</i>	Ribonucleoside-Diphosphat Reduktase (Homolog)
nicht-klassifizierte Gene	372,88	36,07	2370,28	147,55	0,16	0,008	9955.1 CA2452	<i>IPF9955</i>	unbekannte Funktion
	95,63	4,05	610,26	80,26	0,16	0,025	1019.1 CA5144	<i>IPF1019</i>	unbekannte Funktion
	107,05	7,44	614,49	48,74	0,17	0,006	10705.1 CA2873	<i>AQY1</i>	Aquaporin-ähnliches Plasmamembran- und H ₂ O-Kanal Protein (Homolog)
	270,80	41,62	1485,61	135,88	0,18	0,038	20057.1 CA0495	<i>IPF20056</i>	unbekannte Funktion
	158,83	6,83	758,85	74,10	0,21	0,012	4450.1 CA0684	<i>IPF4450</i>	unbekannte Funktion
	344,83	115,43	1220,32	184,07	0,27	0,053	2944.2 CA2636	<i>MSW1</i>	Mitochondrielle Tryptophanyl-tRNA Synthetase (Homolog)
	288,55	41,55	856,46	61,73	0,34	0,038	3735.1 CA2075	<i>IFE2</i>	unbekannte Funktion
	290,66	21,49	821,23	79,73	0,36	0,029	2361.1 CA5208	<i>IPF2361</i>	unbekannte Funktion
	685,24	71,98	1686,90	219,61	0,41	0,022	11759.2 11759.2	<i>IPF11759</i>	unbekannte Funktion
	290,30	27,26	701,76	51,63	0,41	0,012	8493.1 CA5063	<i>IPF8493</i>	Putatives Mitglied der Nicht-Transporter Gruppe ATP-bindender Proteine (Homolog)
	523,09	25,67	1245,28	115,53	0,42	0,023	15671.2 CA2391	<i>ADH5</i>	Alcohol Dehydrogenase (Homolog)

601,54	39,25	1406,73	73,95	0,43	0,013	4430.1 CA4174	<i>IPF4119</i>	unbekannte Funktion
440,82	16,37	1018,12	37,15	0,43	0,014	19962.1 CA2832	<i>CRD1</i>	Cu-Transport P1-Typ ATPase
267,36	45,48	613,51	22,48	0,43	0,064	5909.2 CA4713	<i>CCC1</i>	Transmembraner Ca ²⁺ -Transporter (Homolog)
248,04	8,54	570,87	13,96	0,43	0,006	2804.1 CA5933	<i>IPF2804</i>	unbekannte Funktion
315,80	18,69	1180,30	450,56	0,44	0,347	8464.2 CA4458	<i>IPF8464</i>	unbekannte Funktion
790,10	115,68	1691,75	127,87	0,46	0,040	7220.2 CA2490	<i>MUM2</i>	Ubiquitin C-terminale Hydrolase (Homolog)
1363,67	67,98	2808,03	168,59	0,49	0,017	9550.1 CA4570	<i>IPF9550</i>	Osm1p, Osmotisches Wachstums-Protein (Homolog)
632,12	43,29	1250,94	64,97	0,50	0,013	7686.2 CA3169	<i>IPF7686</i>	Putatives mitochondrielles Phosphat Carrier Protein (Homolog)

Vergleich der *Δtsa1*-Mutante mit dem Wildtypstamm SC5314. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und jedes Gen befindet sich als Duplikat auf den DNA-Mikroarrays. Somit setzt sich jeder Mittelwert aus vier Datenpunkten zusammen. Angegeben sind die Mittelwerte der Expression im Wildtyp- und Deletionsstamm sowie deren mittlere Abweichungen, das mittlere Verhältnis der absoluten Expressionen sowie deren mittlere Abweichung. a Mittlere Abweichung, b Identifikation, IPF-Nummer und Accession-Nummer (Candida DB).

46 Gene wurden bei 5 mM H₂O₂ in der Mutante mindestens um den Faktor zwei geringer transkribiert. Drei der am stärksten herunterregulierten Gene waren NADP⁺-abhängige Monooxygenasen aus der Membranbiosynthese, *SUR2*, *ERG1* und *SCS7*. Diese Enzyme hydroxylieren unter Verbrauch von O₂ und NADPH Membranvorläufermoleküle. Die Zelle versucht vermutlich, oxidative Prozesse zu minimieren. Zehn Gene haben Funktionen im Kohlehydrat-Metabolismus. Darunter sind die Hauptregulatoren der Glykolyse Phosphofruktokinase 2 (*PFK2*) und Hexokinase 2 (*HXK2*), sowie zwei Gene von Hexosetransportern, *HXT5* und *HXT6*. Weiterhin gehören dazu drei zellwand-assoziierte Gene: eine GPI-verankerte Aspartyl-Proteinase (*SAP9*), *ECM3* (Funktion unbekannt, potentielle ATPase des ER) und ein Gen eines putativen PIR-Proteins (*PIR1*) sowie zwei Gene, die im Glycerin-Stoffwechsel involviert sind (*RHR2* und *GPD1*). Für beide Enzyme stellt Glycerin-3-Phosphat das Substrat dar. Glycerin-3-Phosphat könnte unter diesen Bedingungen nützlich sein, da durch dessen Transport in Mitochondrien Reduktionsäquivalente FADH₂ entstehen (75). Weiterhin gehören zwei Ribonukleotid-Reduktasen, *RNR21* und *RNR22* zu den in der Mutante herunterregulierten Genen. Diese Enzyme reduzieren Ribonukleotide zu Deoxy-Ribonukleotiden mittels Thioredoxin oder Glutathion als Kofaktor (75). Möglicherweise stehen unter diesen stark oxidierenden Bedingungen (5 mM H₂O₂) Thioredoxine und Glutathione in reduzierter Form nicht mehr in ausreichendem Maße für eine Reaktion zur Verfügung. Das Gen *HEM1* wurde ebenfalls herunterreguliert.

liert. Das kodierte Enzym führt den ersten Schritt der Häm-Biosynthese durch und ist der Hauptregulator diese Biosynthesewegs. *HEM1* in *S. cerevisiae* wird durch die Transkriptionsfaktoren Hap2p Hap3p reguliert, für die auch auf dem TSA1-Promotor *in silico* Bindestellen identifiziert wurden (Regulation von Tsa1p). *HEM1* ist laut Expressionsdaten (www.yeastgenome.org) unter oxidativem Stress herunterreguliert. Es wird postuliert, dass die Häm-Gruppe selbst oxidativen Stress hervorrufen kann (33). Die übrigen Gene sind keiner funktionellen Gruppe zuzuordnen (Tabelle 10).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Zelle unter Wasserstoffperoxid-Stress versucht, den Verlust von *TSA1* zu kompensieren, indem sie zusätzlich Gene exprimiert, die im Glutathion abhängigen Abwehrmechanismus liegen. Reaktionen, die Reduktionsäquivalente konsumieren (z. B. Monooxygenasen) und der Glukose-Metabolismus werden gedrosselt. Die Rolle von Tsa1p in der Abwehr von oxidativen Schädigungen, wie schon durch phänotypische Daten gezeigt, wird durch die Transkriptionsanalyse bestätigt.

α -MEM 37 °C - Hyphen

Wenn Hyphen gebildet werden, lokalisiert Tsa1p zusätzlich zur intrazellulären Verteilung im Zytoplasma und im Zellkern auf der Zelloberfläche. Antioxidant-Gene wurden auch unter diesen Bedingungen in der $\Delta tsa1$ -Mutante verstärkt exprimiert: Catalase A (*CAT1*), Thioredoxin Reduktase (*TRR1*) und Oxidoreduktase (*COR33*). Daher wird angenommen, dass auch unter diesen Bedingungen Tsa1p die Funktion einer Peroxidase übernimmt, da die Zelle versucht den Verlust von *TSA1* durch Aktivierung anderer stressregulierender Signaltransduktionswege zu kompensieren. Zusätzlich wurden Zellwand-Gene hochreguliert, *ALS4*, *ALS12* und *YWP1*, die auch bei Zugabe von 5 mM H₂O₂ verstärkt transkribiert wurden (siehe oben). Zudem waren die Gene einer Alpha-1,2-Mannosyltransferase (*MNN22*) und eines PIR-Protein Homolog (*IPF19968*) hochreguliert. Letzteres wurde dagegen bei 5 mM H₂O₂ in der $\Delta tsa1$ -Mutante herunterreguliert. Ähnlich verhielt es sich auch mit den Genen zweier Ribonucleosid-Diphosphat Reduktasen (*RNR21* und *RNR22*), die in Hyphen im Deletionsstamm verstärkt exprimiert, dagegen durch Zugabe von 5 mM H₂O₂ stark herunterreguliert waren. Des weiteren wiesen drei Gene, die *Multi-Drug* Transporter kodieren, sowie zwei Transkriptionsfaktoren erhöhte Transkription auf. Nur in Hyphen waren zwei Transkriptionsfaktoren in der Mutante disreguliert, *MSN2/4* und *NRG1*. Auf dem Promotor von *TSA1* befindet sich eine potentielle Bindestelle für

Msn2p/Msn4p. Eine Disregulation könnte daher eventuell mit dem Verlust von *TSA1* erklärt werden. *NRG1* kodiert einen transkriptionellen Repressor, der die Hyphenbildung steuert (77). Die Ausbildung von Hyphen war jedoch unter allen getesteten Bedingungen in flüssigem und festem Medium unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zehn nicht klassifizierte Gene, teilweise mit Genprodukten unbekannter Funktion, wurden ebenfalls stärker transkribiert.

Insgesamt 12 Zellwand-Gene in der $\Delta tsa1$ -Deletionsmutante wurden mindestens um den Faktor 2 schwächer transkribiert. Ausschließlich unter hypheninduzierenden Bedingungen waren Zellwand-Gene in solchem Maße disreguliert. Dieses Ergebnis stellt somit den ersten Hinweis auf eine Rolle von *TSA1* in der Zellwand dar. Weiterhin gehörten die Gene von zwei Hexosetransportern, drei Format- und zwei Alkoholdehydrogenasen sowie von vier Aminosäurestoffwechsellenzymen zu den transkriptionell reprimierten Genen.

Tabelle 11: Auswertung der genomweiten Transkriptionsanalyse 6 h α -MEM 37 °C.

Gene, die in der $\Delta tsa1$ -Mutante stärker transkribiert werden									
Klasse	Mittl. Intensität Wildtyp	Mittl. Abw. WT	Mittl. Intensität $\Delta tsa1$	Mittl. Abw. $\Delta tsa1$	$\Delta tsa1$ / WT	Mittl. Abw. $\Delta tsa1$ / WT	Id	Gennamen	Funktion / Homolog
Antioxidant Gene	93,62	19,45	700,09	42,14	7,83	1,52	20124.1 CA3011	<i>CTA1</i>	Peroxisomale Catalase A, Homolog
	4499,66	390,35	25252,96	2405,23	5,66	0,63	2959.2 CA3059	<i>TRR1</i>	Thioredoxin Reduktase (Homolog)
	167,86	61,86	541,03	44,62	3,65	1,14	11929.2 CA1190	<i>COR33</i>	Oxidoreduktase (Homolog)
	1379,30	240,25	3916,07	1196,92	3,04	1,32	1218.1 CA4835	<i>IPF1218</i>	Superoxid Dismutase (Homolog)
	2013,92	233,33	4194,91	429,06	2,09	0,03	1421.1 CA4919	<i>TTR1</i>	Glutaredoxin (Homolog)
Zellwand und Zellwandbiogenese	3433,57	379,82	24716,04	2972,42	7,18	0,22	5185.2 CA1678	<i>YWP1</i>	Yeast Wall Protein 1
	663,53	67,25	4417,87	1285,31	6,56	1,49	13009.2 CA1528	<i>ALS4</i>	Agglutinin Protein
	863,02	86,09	5695,36	1563,73	6,49	1,41	18994.1 CA0413	<i>ALS12</i>	Agglutinin Protein
	178,81	45,81	785,63	19,91	4,77	1,33	10363.2 CA0752	<i>MNN22</i>	Golgi Alpha-1,2-Mannosyltransferase (Homolog)
	1128,45	285,45	2515,78	474,67	2,27	0,16	19968.1 CA3030	<i>IPF19968</i>	putatives Zellwand PIR-Protein
Nukleotid-Stoffwechsel	346,71	61,79	985,61	176,60	2,84	0,03	4053.1 CA4492	<i>RNR22</i>	Ribonucleosid-Diphosphat Reduktase (Homolog)
	2992,38	361,37	7293,74	660,34	2,47	0,33	11704.2 CA2805	<i>RNR1</i>	Ribonucleosid-Diphosphat Reduktase (Homolog)
	361,58	124,33	726,94	116,79	2,15	0,42	2434.1 CA5715	<i>HNT2</i>	Diadenosine Polyphosphat Hydrolase
Resistenz Gene	290,61	123,11	1075,48	57,94	4,42	1,69	16346.2 CA2968	<i>BMR1</i>	Benomyl/Methothrexate Resistenz Protein (Homolog)
	263,16	58,09	670,48	168,49	2,54	0,15	10349.2 CA3895	<i>CDR4</i>	Multiresistenz Protein
	857,92	69,03	1812,23	205,63	2,12	0,30	961.1 CA5965	<i>IPF961</i>	Resistenz Protein (by homology)
Transkriptionsfaktoren	3520,53	94,67	7984,09	767,64	2,26	0,16	1932.1 CA5289	<i>NRG1</i>	Transkriptionsfaktor Nrg1p/Nrg2p

	3291,64	424,64	6556,59	792,62	1,99	0,03	9939.2 CA2214	<i>IPF9939</i>	Msn4p Transkriptionsfaktor (Homolog)
Nicht klassifizierte Gene	230,49	68,74	2215,18	323,69	10,16	1,67	6428.1 CA2396	<i>IPF6428</i>	unbekannte Funktion
	655,96	36,54	2745,33	196,89	4,19	0,17	17190.2 CA0110	<i>IPF17190</i>	unbekannte Funktion
	1619,28	203,47	5953,42	524,58	3,69	0,14	15051.2 CA0066	<i>IPF15051</i>	unbekannte Funktion
	419,03	73,37	1417,87	159,54	3,51	0,82	9926.2 CA3530	<i>IPF9926</i>	Alkaline Phosphatase (Homolog)
	284,22	20,02	967,95	73,81	3,41	0,20	15015.2 CA0276	<i>IPF15015</i>	unbekannte Funktion
	2230,80	107,81	5432,75	301,69	2,43	0,05	20104.1 CA2520	<i>IPF20104</i>	Alkohol Dehydrogenase (Homolog)
	239,33	20,21	554,03	116,47	2,36	0,59	7197.2 CA3800	<i>RPL7A</i>	60S Ribosomales Protein L7-A
	297,54	57,07	646,76	60,22	2,24	0,36	2400.1 CA5891	<i>IPF2400</i>	putative Alkohol Dehydrogenase
	357,46	45,98	725,62	60,04	2,06	0,17	10223.2 CA1200	<i>IPF10223</i>	putative Serine/Threonine Kinase
	852,91	88,59	1712,63	26,55	2,03	0,23	7948.2 CA3842	<i>YKE2</i>	Gim complex Komponente (Homolog)

Gene, die in der *Δtsa1*-Mutante geringer transkribiert werden

TSA1	20288,21	1427,61	57,68	36,31	2,92E-03	1,92E-03	2431.1 CA5714	<i>TSA1</i>	Thiol-spezifisches Antioxidant-Protein (Homolog)
	7392,10	955,73	182,25	82,67	2,35E-02	1,16E-02	18076.1 CA5697	<i>TSA1</i>	Thiol-spezifisches Antioxidant-Protein (Homolog)
Zellwand und Zellwandbiogenese	2275,16	564,84	10,03	9,03	3,66E-03	3,07E-03	872.1 CA5344	<i>RBE1</i>	Repressed by <i>EFG1</i> Protein 1, putatives Pathogen-related Protein (Homolog)
	10928,93	652,69	742,46	120,06	0,068	0,0074	8099.1 CA2055	<i>SAP4</i>	Sekretierte Aspartyl Proteinase 4
	16170,27	2772,52	1146,81	88,72	0,073	0,0093	6816.1 CA2499	<i>SAP5</i>	Sekretierte Aspartyl Proteinase 5
	12481,51	1688,99	917,28	185,94	0,073	0,0050	12747.2 CA0968	<i>SAP6</i>	Sekretierte Aspartyl Proteinase 6
	1894,53	79,84	208,37	17,97	0,11	0,0078	7957.2 CA0557	<i>HYR1</i>	Hyphen-reguliertes Protein, internes Fragment
	3767,03	209,20	556,63	68,11	0,15	0,023	19734.1 CA1576	<i>HYR1</i>	Hyphen-reguliertes Protein
	13123,41	847,44	2209,76	147,74	0,17	0,0038	13002.1 CA0316	<i>ALS1</i>	Agglutinin Protein
	23593,57	6307,32	4976,57	1382,02	0,21	0,0050	12297.1 CA4394	<i>IPF12297</i>	Mycelial surface antigen (Homolog)
	3772,42	539,92	1090,47	303,10	0,28	0,040	1341.1 CA5112	<i>IPF1341</i>	Putatives Mucin Protein (Homolog)
	6970,66	1182,09	1950,20	194,66	0,29	0,058	12916.1 CA2830	<i>HWP1</i>	Hyphal Wall Protein
	1860,06	314,69	531,05	27,06	0,29	0,034	15385.2 CA2825	<i>RBT1</i>	Repressed by <i>TUP1</i> Protein 1
	36000,98	3490,76	11396,01	1541,95	0,32	0,070	12997.2 CA0448	<i>ALS10</i>	Agglutinin Protein
	4807,13	551,39	1612,14	198,24	0,34	0,026	6869.2 CA2181	<i>ECM33</i>	Zellwand-Biogenese und Architektur (Homolog)
	21059,06	5201,56	8020,57	2505,60	0,37	0,027	12101.1 CA2557	<i>IPF12101</i>	Mycelial surface antigen Vorläufer (Homolog zu <i>C. albicans CSA1</i>)
	686,47	55,99	300,71	38,03	0,44	0,041	4419.1 CA4180	<i>EXG2</i>	Glucan 1,3-beta-Glucosidase (Homolog)
	1549,54	108,42	750,21	56,10	0,48	0,022	13702.2 CA2589	<i>KRE1</i>	Sekretorisches Protein
Hexose Transporter	5833,67	232,08	2085,80	198,80	0,36	0,021	9983.2 CA1506	<i>HGT11</i>	Hexose Transporter
	2642,60	147,20	945,65	54,11	0,36	0,014	5315.2 CA4038	<i>HGT12</i>	Hexose Transporter
Format und Alkohol Dehydrogenasen	3235,00	403,00	476,68	27,93	0,15	0,012	4795.1 CA 2334	<i>ADH3</i>	Alkohol Dehydrogenase (Homolog)
	1312,37	96,15	600,27	49,13	0,46	0,044	4794.1 CA2333	<i>ADH4</i>	Alkohol Dehydrogenase (Homolog)
	4526,13	588,14	1986,19	441,09	0,45	0,146	11124.1 CA1846	<i>FDH12</i>	Format Dehydrogenase (Homolog)
	786,95	79,20	380,16	47,94	0,48	0,013	6323.2 CA1810	<i>FDH2</i>	Format Dehydrogenase (Homolog)
	5624,62	924,63	2625,89	373,46	0,49	0,148	18026.2 CA0636	<i>FDH4</i>	Format Dehydrogenase (Homolog)

	856,00	86,50	417,86	133,87	0,50	0,183	18922.1 CA0639	<i>FDH13</i>	Format Dehydrogenase (Homolog)
Aminosäure- Stoffwechsel	741,45	75,06	242,96	36,20	0,33	0,031	13176.2 CA2964	<i>ARG3</i>	Ornithin Carbamoyltransferase (Homolog)
	527,64	34,07	235,46	59,52	0,45	0,125	14202.2 CA0934	<i>IPF14203</i>	Transaminase (Homolog)
	1819,70	161,49	824,05	115,67	0,45	0,032	2508.1 CA5818	<i>ARG1</i>	Argininosuccinat Synthetase (Homolog)
	2002,12	157,31	974,13	241,94	0,48	0,094	12652.2 CA3546	<i>ACO1</i>	Aconitate Hydratase (Homolog)
nicht klassifizierte Gene	2351,06	338,44	13,96	12,96	0,01	0,0047	11363.1 CA2802	<i>IPF11363</i>	unbekannte Funktion
	874,73	104,81	67,10	44,62	0,08	0,054	13252.1 CA0338	<i>IPF13252</i>	unbekannte Funktion
	21962,85	2940,35	7210,94	2278,09	0,32	0,061	10662.2 CA3827	<i>IPF10662</i>	unbekannte Funktion
	1768,10	201,15	585,78	145,89	0,34	0,122	15822.2 CA1869	<i>IPF15822</i>	unbekannte Funktion
	3060,90	371,10	1047,18	316,12	0,36	0,147	8762.2 CA4220	<i>IPF8762</i>	unbekannte Funktion
	690,98	23,99	249,06	24,61	0,36	0,045	17424.2 CA0038	<i>CYC1</i>	Cytochrome-c Isoform
	921,18	173,68	381,93	136,52	0,40	0,073	19934.1 CA1882	<i>IPF19934</i>	unbekannte Funktion
	587,92	48,00	243,20	66,37	0,41	0,096	16389.1 CA0335	<i>IFA2</i>	unbekannte Funktion
	1132,57	208,68	454,48	15,03	0,41	0,063	18784.1 CA1042	<i>IPF18784</i>	unbekannte Funktion
	801,51	42,80	332,25	19,68	0,41	0,0074	4401.2 CA0493	<i>PRP39</i>	Pre-mRNA splicing Faktor (Homolog)
	4248,60	812,70	1736,27	273,00	0,42	0,067	15332.2 CA1582	<i>CLN21</i>	G1 Cyclin (by homology)
	47639,21	16335,29	17252,84	3058,14	0,44	0,214	14152.1 CA1402	<i>ECE1</i>	Zellelongations Protein
	515,46	46,04	257,12	56,26	0,49	0,065	15784.1 CA1237	<i>IPF15784</i>	unbekannte Funktion
	511,09	20,30	250,79	52,49	0,49	0,119	4408.2 CA4183	<i>SNO1</i>	hisH-ähnliches Protein (Homolog)

Vergleich der $\Delta tsa1$ -Mutante mit dem Wildtypstamm SC5314, analog zur Beschreibung von Tabelle 10.

6.3.4.5 Bestätigung der DNA-Mikroarray-Daten mittels Northern Blot

In jeder der gewählten Bedingungen für die genomweiten Transkriptionsanalysen wurde der Wildtypstamm SC 5314 mit einer $\Delta tsa1$ -Deletionsmutante zusammen hybridisiert. Dadurch war ein direkter Vergleich der Effekte des Deletionsstammes mit einem klinischen Isolat möglich. Um die genomweiten Transkriptionsanalysen zu bestätigen, wurden zwei unabhängige Deletionsstämme (Can312 und Can297) und die dazugehörigen rekonstituierten Stämme (Can313 und Can298) mit dem Wildtypstamm in Transkriptionsanalysen mittels Northern Blots untersucht (Abb. 27). Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen wurden überwiegend bestätigt. Die unterschiedlichen Mutanten-Stämme verhielten sich nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Zu Gunsten der Übersichtlichkeit wurden nur die Ergebnisse der $\Delta tsa1$ -Mutante Can312 und der dazugehörigen rekonstituierten Mutante Can313 gezeigt (Abb 27). In nur einem von neun Experimenten wurde der transkriptionelle Effekt in der rekonstituierten Mutante nicht revertiert (Abb. 27, *HYR1*). Unter den übrigen Bedingungen konnte zumindest partielle Reversion beobachtet werden. Möglicherweise handelte es sich

um einen Gen-Dosis-Effekt, da nur eine Kopie von *TSA1* von insgesamt vier rekonstituiert wurde. Die Analysen mittels Northern Blot bestätigen, dass die beobachtete Disregulation der Gene tatsächlich auf den Verlust von *TSA1* zurückzuführen waren.

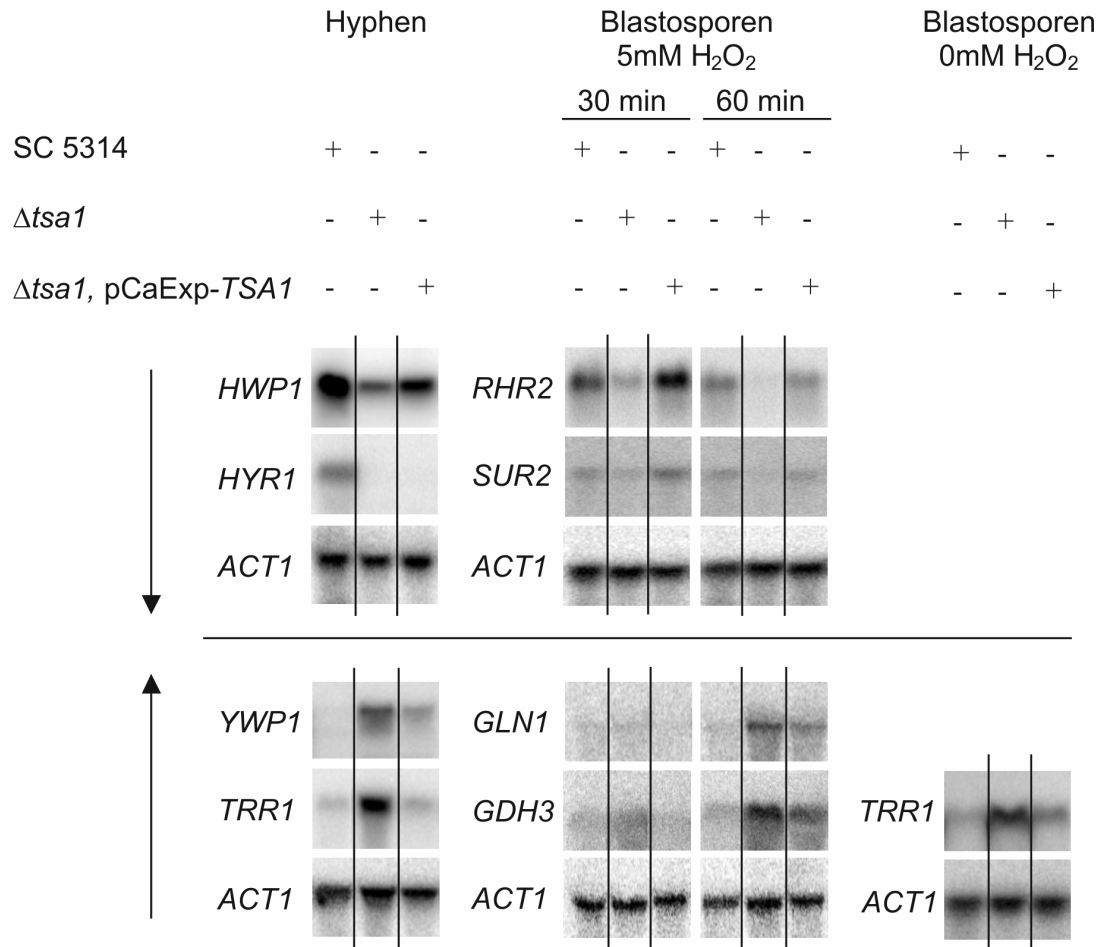


Abbildung 27: Northern-Hybridisierungen zur Bestätigung der Mikroarray-Daten.

Pfeil nach unten: Gene, die in der $\Delta tsa1$ -Mutante herunterreguliert werden; Pfeil nach oben: Gene, die in der $\Delta tsa1$ -Mutante hochreguliert werden.

6.3.4.6 Funktion im Zellkern

Neben Proteinen und Lipiden schädigen reaktive Sauerstoffverbindungen auch Ribonucleotid- und Deoxy-Ribonucleotide. Es wird daher seit längerem vermutet, dass Antioxidant-Proteine am Schutz vor DNA-Schäden beteiligt sind. Tsa1p in *S. cerevisiae* verhindert z. B. die Bildung von 8-OH-GMP durch oxidierende Substanzen wie H_2O_2 (78). Solche Basenmodifikationen können durch Basenaustausch zu Mutationen führen. Kürzlich wurde *ScTSA1* in einer Untersuchung zur Identifizierung von Mutations-suppressoren entdeckt. Unter den identifizierten Genen befanden sich auch zentrale Transkriptionsfaktoren der Stressantwort, wie *YAP1* und *SKN7* (79). In *C. albicans* wurden mittels genomweiter Transkriptionsanalysen sechs Gene für DNA-Reparaturenzyme ermittelt, die bei oxidativem Stress durch 0,4 mM H_2O_2 stark induziert werden (76). Unter den in dieser Arbeit vorgestellten oxidativen Stress Bedingungen (5 mM H_2O_2) wurde eines dieser Gene, *DDI1*, sowie *RAD51*, ein weiteres, das nicht in der genannten Studie identifiziert wurde, mindestens um den Faktor vier hochreguliert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Tsa1p von *C. albicans* auf Funktionen untersucht, die der Erhaltung der genetischen Stabilität dienen.

Dazu wurden drei unterschiedliche Stämme, CAI4, die Δ *ttsa1*-Mutante Can312 und die entsprechende rekonstituierte Mutante Can313 hinsichtlich der Mutationshäufigkeit im *URA3*-Gen untersucht. Dies war möglich, da die genannten Stämme jeweils mit nur einem *URA3*-Gen ausgestattet waren und zudem jeweils am selben Genlocus mit dem *URA3*-Gen rekonstituiert waren. Mutationen im *URA3*-Gen wurden mittels 5-FOA positiv selektioniert (Abschnitt 5.19.3, (53)). Die Stämme wurden über Nacht in uridin-freiem SC-Medium bei 30 °C kultiviert. Dadurch entstand Selektionsdruck gegen *URA3*-negative Zellen, der Mutationen im *URA3*-Gen der Vorkultur verhindern konnte. Die Stämme wurden anschließend in uridin-haltiges SC-Medium angeimpft ($OD_{600} = 0,1$), bis die frühe logarithmische Phase erreicht war ($OD_{600} = 1$). Daraufhin wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ Zellen auf Platten mit SC-Medium, das Uridin und 5-FOA enthielt, ausplattiert. Zellen ohne funktionelles *URA3*-Gen können auf 5-FOA-haltigem Medium wachsen, dagegen sind Zellen mit *URA3*-Gen dazu nicht in der Lage (53). Folglich wurden Klone selektioniert, die kein funktionelles *URA3*-Gen tragen.

Auf diese Weise wurde die Mutationsrate im *URA3*-Gen bestimmt. Der $\Delta tsa1$ -Stamm wies eine signifikant höhere Mutationsrate im *URA3*-Gen auf als die rekonstituierten Mutanten und der Wildtypstamm (Abb. 28 A). Das Experiment wurde nochmals mit der unabhängigen $\Delta tsa1$ -Mutante Can297 und der rekonstituierten Mutante Can298 durchgeführt (Daten nicht gezeigt), wodurch die Ergebnisse bestätigt wurden. Die Mutationsraten wurde aus den Mittelwerten dieser beiden Experimente bestimmt (Abb 28 B).

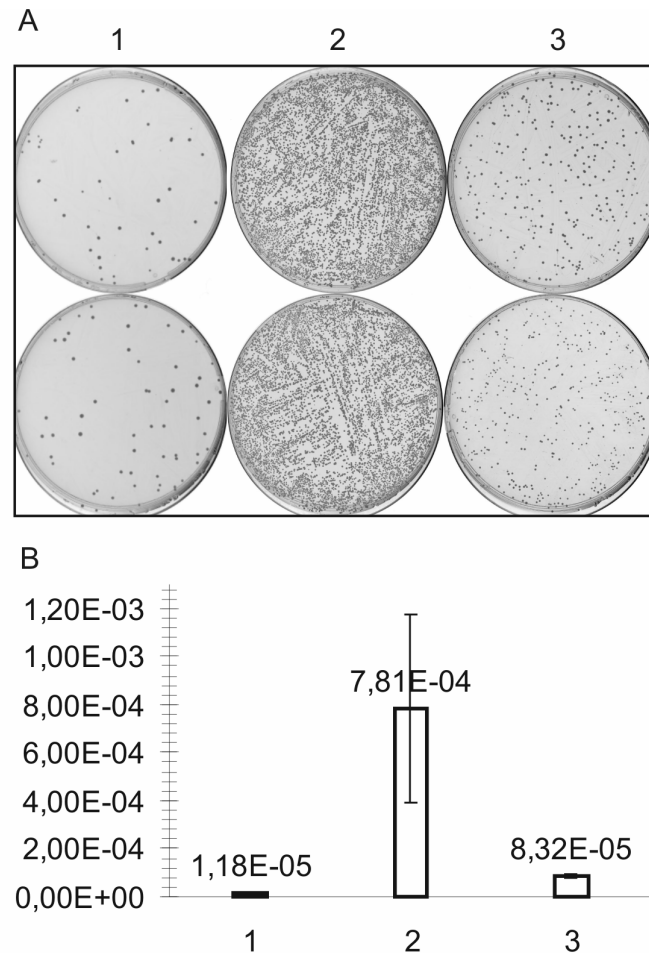


Abbildung 28: Erhöhte Mutationsrate in $\Delta tsa1$ -Mutanten.

A: Repräsentative Agar-Platten mit SC-Medium (+ Uridin, + 5-FOA). B: Darstellung der Mutationsraten. Fehlerindikator zeigt mittlere Abweichung der Mutationsraten zweier unabhängiger Stämme die jeweils doppelt ausplattiert wurden. Wildtyp SC5314 (1), $\Delta tsa1$ Can312 und Can297 (2), $\Delta tsa1$ -pCaExp-*TSA1* Can313 und Can298 (3).

In zwei unabhängigen $\Delta tsa1$ -Mutanten war die Mutationsrate im *URA3*-Gen signifikant höher als im Wildtyp oder in den entsprechenden rekonstituierten Stämmen. Daher wurde angenommen, dass *TSA1* in *C. albicans* ähnliche Funktionen in der Unterdrückung von Mutationen übernimmt wie *TSA1* in *S. cerevisiae*.

Alle verwendeten Stämme wuchsen auf uridin-freiem sowie uridin-haltigem SC-Medium und YPD mit vergleichbaren Wachstumsraten (Daten nicht gezeigt). Daher wurden beobachtete Effekte nicht auf Wachstumsunterschiede in verschiedenen Medien, sondern überwiegend auf den Verlust von *TSA1* zurückgeführt.

6.3.4.7 Tsa1p interagiert mit Proteinen der Hyphenzellwand

Mit Tsa1p interagierende Proteine in *C. albicans* wurden untersucht, um Hinweise auf neue Funktionen von Tsa1p zu erhalten. Dazu wurden Co-Immunpräzipitationen mit dem affinitätsgereinigten TSA-Antikörper durchgeführt. Die Zellwandlokalisierung von Tsa1p in Hyphen von *C. albicans* war bisher unbekannt und in diesem Kompartiment wurden noch keine Funktionen des Proteins beschrieben. Daher wurde spezifisch nach Interaktionspartnern von Tsa1p in der Hyphenzellwand gesucht.

Dazu wurden der Wildtyp SC 5314 und die $\Delta tsa1$ -Mutante Can312 als Hyphen kultiviert (α -MEM bei 37 °C), die Zellwand-Proteine biotinyliert und durch β -1,3-Glukanase extrahiert (Abschnitt 5.9.3). Anschließend wurden ca. 20 μ g dieser Extrakte pro Immunpräzipitation eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden sowohl mittels reduzierender als auch mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE separiert und im Western Blot analysiert. Die Blots wurden mit Streptavidin-POD entwickelt, so dass nur biotinylierte Zellwand-Proteine detektiert wurden. Potenzielle mit Tsa1p interagierende, intrazelluläre Proteine wurden auf diese Weise nicht visualisiert. In reduzierenden Gelen des Wildtyps wurde eine starke Bande bei 21 kDa detektiert (Abb 29, Spur 1). Diese fehlte in reduzierenden Gelen der Mutante (Spur 2). Daher handelte es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um die reduzierte Form von Tsa1p. Im Bereich zwischen 36 und 62 kDa konnten im Wildtyp mindestens drei weitere Proteinbanden beobachtet werden (Abb. 29, Spur 1). Die mittlere starke Bande könnte ein Gemisch aus mehreren Proteinen darstellen. Möglicherweise sind dies biotinylierte Zellwand-Proteine, die mit Tsa1p in der Hyphenzellwand interagieren. Die Annahme wurde dadurch bestätigt, dass in der entsprechenden Aufreinigung der $\Delta tsa1$ -Mutante nur eine einzelne Bande im Bereich von 50 kDa vorhanden war (Spur 2).

Dabei könnte es sich um ein mit dem TSA-Antikörper kreuzreagierendes Zellwand-Protein handeln. Das Protein war ebenfalls biotinyliert.

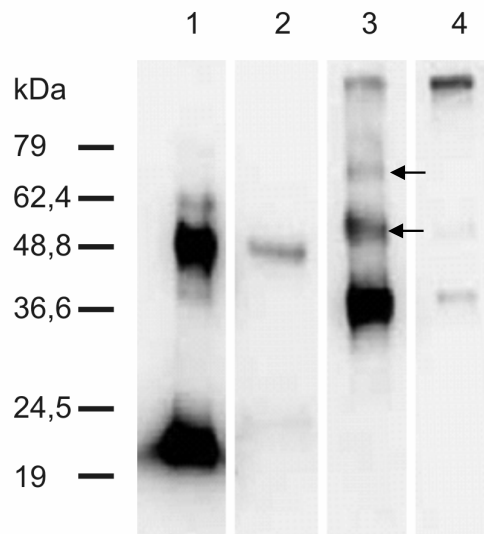


Abbildung 29: Mit Tsa1p interagierende Proteine der Hyphenzellwand.

Wildtypzellen (Spur 1 und 3) und der $\Delta tsa1$ -Stamm Can312 (Spur 2 und 4) wurden über Nacht in α -MEM bei 37 °C als Hyphen kultiviert und biotinyliert. Zellwand-Proteine wurden mittels Glukanase extrahiert, jeweils 20 μ g dieser Extrakte mittels TSA-Antikörper immunpräzipitiert und die Eluate durch reduzierende (Spur 1 und 2) bzw. nicht-reduzierende (Spur 3 und 4) SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Die PVDF-Membran wurde mit Streptavidin-POD entwickelt, um biotinylierte Zellwand-Proteine zu visualisieren. Die Pfeile markieren potenzielle Komplexe von Tsa1p mit Zellwand-Proteinen der Hyphe.

Es wurde überprüft, ob die im Wildtyp identifizierten, potenziellen Interaktionspartner von Tsa1p Tsa1p-Dimere (Abschnitt 6.3) waren, die durch unvollständige Reduktion zurückblieben. Deshalb wurden die Glukanase-Extrakte von Wildtyp und Mutante ebenfalls in nicht-reduzierender SDS-PAGE getrennt und mittels Streptavidin-POD im Western Blot analysiert (Abb. 29, Spur 3 und 4). Jedoch wurden keine Übereinstimmungen mit den im Wildtyp erscheinenden, potenziellen Interaktionspartnern von Tsa1p festgestellt. Darüber hinaus wurden in Hyphen des Wildtyps zwei weitere biotinylierte Protein-Banden bei 55 kDa und 70 kDa detektiert, die im $\Delta tsa1$ -Stamm nicht vorhanden waren (Abb 29, Spur 3, Pfeile). Es könnte sich um Komplexe von Tsa1p mit andere Zellwand-Proteinen handeln, die durch Disulfidbrücken verbunden sind, da die gekennzeichneten Proteinbanden im reduzierenden Gel nicht existieren (Spur 1).

In der Hyphenzellwand existieren demzufolge Proteine, die wahrscheinlich mit Tsa1p interagieren. Die Identität der Proteine, die möglicherweise Rückschlüsse auf neue Funktionen von Tsa1p zulässt, konnte noch nicht ermittelt werden.

7 Diskussion

Die Zelloberfläche krankheitserregender Pilze ist essenziell für die Adhäsion an Wirtsgewebe, ein erster entscheidender Schritt während des Infektionsvorganges. Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen werden fast ausschließlich durch Zellwand-Proteine vermittelt, die entweder durch kovalente Bindungen oder durch nicht-kovalente Kräfte in die Zellwandstruktur integriert sind (9). Bisher basierten Ansätze zur Identifizierung von löslichen Zellwand-Proteinen auf der Aufreinigung des unlöslichen Zellwandgerüsts und der anschließenden Extraktion der Proteine mittels Detergenz. Das entscheidende Problem dabei war, dass Zellwand-Proteine auf diese Weise nicht von intrazellulären Kontaminationen unterschieden werden konnten (5).

Daher wurden Zelloberflächen-Proteine spezifisch mittels eines membranundurchlässigen Biotinderivats markiert (60), die löslichen Zellwand-Proteine mittels Detergenz extrahiert und die biotinylierten Proteine durch Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung von immobilisiertem Neutravidin isoliert. In meiner Diplomarbeit wurde bereits beschrieben, dass die Plasmamembran von *C. albicans* unter den angewendeten Bedingungen für das Markierungsreagenz nicht durchlässig war. Dies wurde sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch Elektronenmikroskopie gezeigt. Die spezifische Markierung erlaubte es mittels dieses Ansatzes, auf der Zelloberfläche lokalisierte Proteine von intrazellulären Proteinen zu unterscheiden, die erst während der Proteinextraktion an die unlösliche Struktur der Zellwand adhären. Das für die Abtrennung der biotinylierten Proteine verwendete Avidin-Biotin-System ist gut etabliert (62). Da es jedoch für die Identifizierung der löslichen Zellwand-Proteine entscheidend war, durch die Aufreinigung intrazelluläre Komponenten vollständig abzutrennen, wurde die Spezifität der Aufreinigung ermittelt. Nur biotinylierte Zellen lieferten reproduzierbare Proteinmuster von Zelloberflächen-Proteinen, wohingegen Aufreinigungen von nicht markierten Zellen zur Isolation nur sehr weniger Proteine führte. Eines dieser Proteine war die Pyruvat Carboxylase, ein Enzym, das Biotin als Kofaktor enthält. Die endogene Biotinylierung von Proteinen wirkte sich folglich nicht störend auf den Ansatz aus. Die neu entwickelte Methode ist somit ein wertvolles Werkzeug um die Dynamik löslicher Zellwand-Proteine des Pathogens *C. albicans* zu untersuchen. Im Gegensatz zu vorhergehenden Publikationen, in denen die nicht durch Biotin vermittelte Bindung von Proteinen an die Affinitätsmatrix beschrieben wurde (80), konnte unter den hier gewählten Bedingungen keine Bindung nicht-

biotinylierter Zellwand-Proteine beobachtet werden. Daher wurde angenommen, dass unspezifische sowie nicht durch Biotin vermittelte Bindung an Neutravidin-Sepharose signifikant reduziert wurde.

Die zweite Neuerung dieser Methode war die Optimierung und Maßstabsvergrößerung, so dass die isolierten löslichen Zellwand-Proteine für eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Dadurch wurden insgesamt 29 verschiedene lösliche Zellwand-Proteine identifiziert, jeweils 17 aus Hyphen (α -MEM, 37 °C) sowie aus Blastosporen (YPD, 30 °C).

7.1 Identifizierte Proteine

Der Ansatz führte zur Identifizierung von Mannoproteinen, glykolytischen Enzymen, Hitzeschock-Proteinen, Elongationsfaktoren, Phosphorylasen und Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen. Der Großteil der identifizierten Proteine besaß keine erkennbare sekretorische Signalsequenz. Vielmehr handelte es sich um Enzyme mit bekannten Funktionen im Zytoplasma. Glykolytische Enzyme und Hitzeschock-Proteine wurden bereits auf der Oberfläche von *C. albicans* und anderen Organismen lokalisiert, weshalb alternative Transportwege für deren subzelluläre Verteilung vorgeschlagen wurden (9). In der Tat wurde nicht-klassische Sekretion in Säugerzellen und *S. cerevisiae* beschrieben. Der a-Faktor von *S. cerevisiae* wird z. B. durch den ABC-Transporter Ste6p (81,82) und Galectin aus Säugerzellen trotz Blockierung des klassischen Sekretionsweg in Hefe auf die Zelloberfläche transportiert (83). Die Mechanismen für den Export solcher Proteine sind noch nicht vollständig charakterisiert. Das HMGB1-Protein beispielsweise, das ein nukleäres Protein darstellt, wird von stimulierten Monozyten sekretiert. Der Export verläuft nicht-klassisch über zytoplasmatische Vesikel (84). Die hier aufgeführten Beispiele für nicht-klassische Sekretion, wie z. B. der Export mittels transmembranen Transportern oder zytoplasmatischer Vesikel, sind ein Indiz dafür, dass gleichzeitig mehrere unterschiedliche alternative Sekretionswege existieren (85).

Drei Hauptargumente unterstützen die These, dass die hier identifizierten Zellwand-Proteine tatsächlich lösliche Zellwand-Proteine von *C. albicans* darstellen:

1. Ein membran-undurchlässiges Biotinderivat wurde für die Markierung von Oberflächen-Proteinen verwendet und die Abtrennung biotinylierter Proteine war spezifisch.

2. In Bindungsexperimenten wurde gezeigt, dass intrazelluläre Proteine im Allgemeinen und Tsa1p-Gfp im Besonderen vor der Biotinylierung nicht an die Zellwand intakter Zellen adsorbierten. Das deutet daraufhin, dass Tsa1p und die anderen gefundenen Proteine *in vivo* in der Zellwand lokalisieren und beispielsweise nicht von lysierten Zellen stammen. Die Bindung von intrazellulären Proteinen an isolierte Zellwände wurde dagegen beschrieben (86). Daher wird vermutet, dass intakte Zellen, die von glykosylierten Proteinen umhüllt sind, eine geringere Affinität zu zytosolischen Proteinen haben als isolierte Zellwände.
3. Tsa1p wurde ausschließlich in Isolaten biotinylierter Hyphen (α MEM, 37 °C) und nicht in Isolaten biotinylierter Blastosporen (YPD 30 °C) gefunden, obwohl Tsa1p in beiden Wachstumsformen abundant ist. Die Untersuchungen des Fusionsprotein Tsa1p-Gfp mittels konfokaler Mikroskopie und des nativen Tsa1p mittels TSA-Antikörper bestätigen die Aufreinigung von Tsa1p durch Neutravidin-Sepharose. Zudem wurde gezeigt, dass die Translokation von Tsa1p an die Hyphenzellwand durch die Veränderung der Morphologie der Zelle in Abhängigkeit von *EFG1* induziert wurde.

Obwohl alle löslichen Zellwand-Proteine – bis auf Gap1, Tef1p und Hsp70p – jeweils nur in einer der beiden Wachstumsformen identifiziert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese Proteine auch in der Zellwand der jeweils anderen Wachstumsform zu finden waren. Das war z.B. für Ebp1p der Fall, welches als Fusionsprotein mit Gfp in der Plasmamembran von Hyphen und Blastosporen identifiziert, jedoch nur von hyphalen Zellen isoliert wurde. Auch Hsp90p wurde bereits durch monoklonale Antikörper sowohl in der Hyphen- als auch auf der Blastosporenzellwand lokalisiert (57). Im Biotinylierungsansatz wurde Hsp90p jedoch nur in Hyphen gefunden. Das bedeutet, dass der Ansatz nicht zur vollständigen Identifizierung aller löslichen Zellwand-Proteine führte. Dennoch deuten die Unterschiede der gefundenen löslichen Zellwand-Proteine in den verschiedenen Wachstumsformen auf differenzielle Expression oder Lokalisation hin, die durch Adaption an Wachstumsform, Medium oder Temperatur hervorgerufen wurde.

Zwölf Proteine wurden zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit in der Zellwand lokalisiert. Die übrigen Proteine wurden bereits in anderen Studien aus Zellwänden von *C. albicans* isoliert oder mittels Immunohistochemie auf der Zelloberfläche lokalisiert

(9,58,59,64-67). Hitzeschock-Proteine oder glykolytische Enzyme, die bekannte Funktionen im Zytoplasma übernehmen, könnten auf der Zelloberfläche unterschiedliche Funktionen übernehmen. Daher werden sie als „*Moonlighting Enzymes*“ (Schwarzarbeiter-Enzyme) bezeichnet (59). Eine zunehmende Zahl an Publikationen beschreibt neue Funktionen solcher Proteine. Gap1p wurde auf der Zelloberfläche verschiedener Organismen von Bakterien und Pilzen lokalisiert. Laminbindende Eigenschaften wurden für dieses glykolytische Enzym beschrieben. Zusätzlich zu der bekannten Funktion in der Glykolyse ist Gap1p somit ein Zelloberflächen-Adhäsion (87). Elongationsfaktor 1 aus der Tabakpflanze wurde als Vitronektin bindendes Oberflächen-Protein beschrieben (88). Kürzlich wurde berichtet, dass eine an Gap1p fusionierte intrazelluläre Invertase in *S. cerevisiae* Wachstum auf Medium erlaubt, das als einzige Kohlenstoffquelle Saccharose enthält (89). Zellen, die nur intrazelluläre Invertase exprimieren, wachsen nicht auf diesem Medium. Zudem konnte bei Stämmen mit Fusionsprodukt extrazelluläre Invertaseaktivität gemessen werden, nicht jedoch bei Stämmen die Invertase allein exprimierten. Das deutet daraufhin, dass Gap1p in *C. albicans* aktiv auf die Oberfläche transportiert wird (89).

Zu den hier identifizierten löslichen Zellwand-Proteinen, deren Zellwand-Lokalisation bisher nicht bekannt war, zählte Tsa1p. Zwei getrennte Banden wurden in reduzierenden SDS-Gelen beobachtet (Abb. 06). Wie in *S. cerevisiae* beschrieben wurde, könnte es sich bei diesen entweder um partielle Degradation oder um unterschiedliche Konformationen des Monomers von Tsa1p handeln, (26).

7.2 Funktionen von Tsa1p

7.2.1 Funktion als Peroxidase

TSA-ähnliche Proteine wurden in verschiedenen Studien in unterschiedlichen Organismen als Peroxidasen charakterisiert, die Wasserstoffperoxid, Alkylhydroperoxide und andere ROS abzubauen vermögen (23). Auch in *C. albicans* hat Tsa1p die Funktion einer thiol-spezifischen Peroxidase. Vier Ergebnisse unterstützen diese Aussage:

1. Die Resistenz gegenüber H_2O_2 nimmt in der $\Delta tsa1$ -Mutante stark ab. Rekonstituierte Mutanten mit einer funktionellen Kopie von *TSA1* zeigten eine dem Wildtyp SC 5314 vergleichbare Resistenz. Der Einsatz von DTT führte zu sehr ähnlichen Effekten, da es sich um eine Thiol-Verbindung handelt, wel-

- ches durch Oxidation reaktive Thiyl-Radikale bilden kann. Diese wiederum inhibieren Thiol-Proteine oder schädigen andere Zellbestandteile (69).
2. *TSA1* wurde durch oxidierende Substanzen wie H_2O_2 und Menadion induziert, wobei die Transkription (Northern Blot) nach Zugabe von H_2O_2 deutlich stärker anstieg als die Translation (Western Blot). Möglicherweise wurde Tsa1p durch das oxidative Milieu, welches durch die eingesetzten Substanzen erzeugt wurde, in höherem Maße denaturiert und abgebaut als in YPD ohne H_2O_2 oder Menadion. Durch die gesteigerte Transkription des *TSA1*-Gens könnte somit der Verlust des Proteins in der Zelle ausgeglichen werden. Konfokaler Mikroskopie zufolge wurde unter dem Einfluss von H_2O_2 Tsa1p-Gfp ebenfalls verstärkt gebildet. Die mikroskopischen Aufnahmen vermitteln eventuell den Eindruck, dass durch Zugabe von 5 mM H_2O_2 die Zunahme der Menge von Tsa1p-Gfp stärker ausfällt (Abb. 12) als die Zunahme von Tsa1p unter den selben Bedingungen im Western Blot (Abb. 16 B). Die Quantifizierung der Menge des jeweiligen Gfp-Signals wurde nicht vorgenommen, da reproduzierbare quantitative Daten aus Western Blots zur Verfügung standen. Zudem ist das Fusionsprotein Tsa1p-Gfp unter stark oxidierenden Bedingungen möglicherweise stabiler als natives Tsa1p.
 3. Die H_2O_2 -abhängige Induktion von *TSA1* wurde durch den Transkriptionsfaktor *CAP1* reguliert, der eine zentrale Rolle bei Stressantworten der Zelle spielt, insbesondere bei oxidativem Stress (44).
 4. Mittels genomweiter Transkriptionsanalysen wurde ermittelt, dass in $\Delta tsa1$ -Mutanten im Vergleich zu Wildtypzellen Antioxidant-Gene verstärkt transkribiert wurden. Unter 5 mM H_2O_2 handelte es sich dabei um insgesamt vier Antioxidant-Gene, darunter zwei Glutathion-Peroxidasen, und drei für die Biosynthese von Cystein und Glutamat essenzielle Gene. Cystein und Glutamat sind neben Glycin zwei der drei Grundbausteine für Glutathion. Das Glutathion/Glutathion-Peroxidase-System stellt einen vom TSA/Thioredoxin-System unabhängigen Zweig der antioxidativen Abwehrmechanismen dar. Die Zelle reagiert folglich auf den Verlust von Tsa1p durch Induktion eines parallelen Signalweges. Auch unter den leicht oxidierenden Bedingungen des Zellkulturmediums α -MEM wurde die Transkription von fünf Antioxidant Genen verstärkt. Dazu gehörte ebenfalls *TRR1*, Catalase A, eine Oxidoreduktase, eine

Superoxid-Dismutase und Glutaredoxin. Sogar in nicht-stimulierten Zellen (0 mM H₂O₂) der Deletionsmutante wurden zwei Antioxidant-Gene verstärkt transkribiert: Thioredoxin-Reduktase (*TRR1*) und ein Homolog einer Superoxid-Dismutase. Unter diesen Bedingungen wurden ausschließlich diese beiden Gene induziert. Möglicherweise wurde *TRR1* bei 5 mM H₂O₂ in der Δ *tsa1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht disreguliert, da das Gen unter dieser Bedingung als eines der meisttranskribierten Gene überhaupt nicht noch stärker exprimiert werden konnte.

7.2.2 Funktion im Zellkern

Da reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) Proteine, Lipide sowie DNA schädigen (90), liegt es nahe anzunehmen, dass Tsa1p nicht nur im Zytoplasma die Funktion einer Peroxidase übernimmt, sondern auch im Nukleus. ScTsa1p kann z. B. die Bildung von 8-OH-Guanosin verhindern (78). Diese Modifikation, die durch H₂O₂ hervorgerufen wird, führt zu Basenaustausch und somit zu Mutationen (78). Da Tsa1p in *C. albicans* unter allen getesteten Bedingungen im Nukleus lokalisierte, könnte das Protein DNA und Proteine des Zellkerns vor Oxidierung schützen. Da Δ *tsa1*-Mutanten in verstärktem Maße Mutationen akkumulieren (siehe Ergebnisse), ergab sich ein erster direkter Hinweis auf Funktionen dieses Proteins im Zellkern. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit zwei kürzlich erschienenen Publikationen überein. Einer Studie zufolge führte die Deletion aller TSA-Gene in *S. cerevisiae* zu genetischer Instabilität (37) und ScTSA1 wurde in einer Untersuchung zur Identifikation von Mutationssuppressoren in *S. cerevisiae* zusammen mit anderen oxidativen Stressgenen wie z. B. *YAP1* und *SKN7* identifiziert (79).

7.2.3 Unterschiede CaTsa1p zu ScTsa1p

Neben den Funktionen, die CaTsa1p und ScTsa1p gemeinsam haben, existieren auch Unterschiede. Im Gegensatz zu Untersuchungen in *S. cerevisiae* führte der Verlust von Tsa1p in *C. albicans* nicht zu erhöhter Sensitivität gegenüber Cadmium-Ionen und Peroxynitrit. Möglicherweise konnte die Zelle den Verlust mittels Induktion anderer Gene kompensieren, oder *TSA1* hat diese Funktion zugunsten anderer Gene in *C. albicans* verloren.

7.2.3.1 Virulenz

Der Einfluss von Tsa1p auf die Pathogenität von *C. albicans* wurde in einem murinen Tiermodell für systemische Infektionen untersucht. Der Verlust von Tsa1p beeinflusste die Virulenz des Pilzes jedoch nicht nachweisbar. Möglicherweise kann die Zelle den Verlust von Tsa1p durch Induktion paralleler Signaltransduktionswege kompensieren. Die genomweiten Transkriptionsanalysen zeigten sowohl in oxidativem Stress als auch bei Hyphenbildung in der $\Delta tsa1$ -Mutante verstärkte Transkription mehrerer Antioxidant-Gene. Zusätzlich wurden Virulenzfaktoren der Zellwand in Hyphenzellen, wie z. B. *HWP1*, *ALS10* sowie drei verschiedene sekretierte Aspartylproteinasen, im $\Delta tsa1$ -Stamm deutlich weniger stark transkribiert als im Wildtyp. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer Attenuation der Virulenz im Mausmodell könnte die Tatsache sein, dass die betroffenen Zellwand-Gene in den rekonstituierten Mutanten zwar wieder stärker, jedoch nicht vollständig auf Wildtyp-Niveau transkribiert wurden (siehe Abb. 27).

Für die Tests in den Mäusen wurde stets ein $\Delta tsa1$ -Deletionsstamm mit einer rekonstituierten Mutante verglichen. Zwischen den beiden Stämmen bestand kein messbarer Unterschied in der Virulenz. Folglich wurde vermutet, dass Tsa1p kein Virulenzfaktor von *C. albicans* darstellt, der eine Funktion in der Abwehr von ROS ausübt, die von Immunzellen des Wirtes gebildet werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Resistenz gegenüber ROS nicht essenziell in der Virulenz eines pathogenen Pilzes ist. Z. B. führte auch die Deletion des Stressregulators *SKN7*, der z. B. Superoxid-Dismutasen reguliert, nur zu geringfügig attenuierter Virulenz im systemischen Mausmodell (91). In diesem Zusammenhang wurde vorgeschlagen, dass Peroxynitrit als zentrales Molekül notwendig für die Abtötung von *C. albicans* durch phagozytierende Zellen sein soll (92). $\Delta tsa1$ -Mutanten waren jedoch ebenfalls nicht sensitiver gegenüber Peroxynitrit.

In Adhäsions- und Invasionsassays mittels Zellsystemen konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen $\Delta tsa1$ -Stämmen und rekonstituierten Mutanten festgestellt werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Tsa1p ein Adhäsion oder ein lytisches Enzym ist.

7.2.3.2 Ts1p im Hitzeschock

Die Funktion von ScTsa1p in der Resistenz gegenüber Hitzeschock war bereits seit längerem bekannt. Die molekulare Funktionsweise des Enzyms war jedoch in diesem Zusammenhang unklar. Kürzlich wurde ScTsa1p funktionell als molekulares Chaperon charakterisiert (28). Diese Funktion wird durch Oligomerisierung einzelner Tsa1p-Moleküle zu hochmolekularen Komplexen erreicht und durch Hitzeschock und Wasserstoffperoxid induziert (28). Im Unterschied dazu wurden in *C. albicans* Stämmen, denen Tsa1p fehlte, keine erhöhte Sensitivität gegenüber Hitzeschock festgestellt. Zwischen $\Delta tsa1$ -Deletionsstämmen und deren rekonstituierten Stämmen konnten im Hitzeschock keine Unterschiede festgestellt werden. Unter oxidativem Stress, also genau dann, wenn die Chaperonaktivität von ScTsa1p ansteigt, wurden laut Mikroarray-Daten in $\Delta tsa1$ -Stämmen keine Hitzeschock-Proteine kompensatorisch induziert. Dahingegen wurden in Wildtypzellen durch Wasserstoffperoxid mehrere Gene für Hitzeschock-Proteine verstärkt exprimiert (Daten nicht gezeigt sowie (76)). Die gleichbleibende Sensitivität und die unveränderte Expression von Hitzeschock-Proteinen in $\Delta tsa1$ -Mutanten im Vergleich zu Wildtypstämmen schließen dennoch nicht aus, dass Tsa1p in *C. albicans* zu hochmolekularen Komplexen oligomerisiert, um als Chaperon zu arbeiten. In *C. albicans* ist diese Funktion jedoch möglicherweise nicht essenziell.

7.2.3.3 Funktion in der Hyphenzellwand

Genomweite Transkriptionsanalysen gaben einen ersten Hinweis für eine Funktion von Tsa1p in der Zellwand von Hyphen. Demzufolge änderte sich die Zusammensetzung der Zellwand in $\Delta tsa1$ -Mutanten. 15 von 41 in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp mindestens zweifach herunterregulierte Gene waren Zellwand-Gene. Fünf andere Zellwand-Gene waren dagegen in der $\Delta tsa1$ -Mutante stärker exprimiert. Dieser Effekt trat nur bei Bedingungen auf, unter denen *C. albicans* Hyphen bildete und somit Tsa1p auf der Zelloberfläche lokalisierte. Tsa1p kommt daher möglicherweise eine Rolle bei der Organisation der Zellwand zu. Mittels Northern Blots wurden diese Ergebnisse mit zwei unabhängigen Mutanten bestätigt. Mit einer funktionellen *TSA1*-Kopie wurden die Effekte zumindest partiell aufgehoben. Die in *S. cerevisiae* identifizierte Chaperonaktivität von Tsa1p könnte die Effekte auf die Transkription unterschiedlicher Zellwand-Gene erklären. Zudem könnte die Redoxaktivität von Tsa1p notwendig für die Verknüpfung der Zellwand-Proteine an das Glukannetzwerk sein.

Da weder Hitzeschock noch Wasserstoffperoxid, dagegen jedoch Hyphenbildung die Translokation von Tsa1p an die Zellwand induzierte, wird vermutet, dass zellwand-assoziiertes Tsa1p eher andere noch unbekannte Funktionen übernimmt als die Abwehr oxidativen und thermischen Stresses.

Um neue Funktionen von Tsa1p in der Zellwand zu charakterisieren, wurden mit Tsa1p interagierende Proteine aus Hyphenzellwänden untersucht. Mindestens drei unterschiedliche Proteine wurden dabei identifiziert. Die Proteine waren wie Tsa1p ebenfalls biotinyliert und wurden mittels Glukanase extrahiert. Das deutet darauf hin, daß es sich um Zellwand-Proteine handelt. Durch Kenntnis der Identität und Funktion der interagierenden Proteine, könnte auch die Funktion von Tsa1p in der Zellwand geklärt werden. Da die interagierenden Proteine bisher in sehr geringen Mengen aufgereinigt wurden, konnte die Identität der Proteine noch nicht bestimmt werden.

7.2.4 Verbindung der unterschiedlichen Funktionen

Tsa1p von *C. albicans* konnte in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen identifiziert werden. Ob Tsa1p in der Zellwand, im Zytoplasma oder im Zellkern immer dieselbe Funktion ausübt oder verschiedene Funktionen wahrnimmt ist noch nicht geklärt. Weitere Untersuchungen, z. B. zur Identifizierung interagierender Proteine von Tsa1 in der Zellwand (vorhergehender Abschnitt), könnten Hinweise für neue Funktionen von CaTsa1p aufzeigen. Zur Zeit ist die Peroxidasefunktion von Tsa1p in *C. albicans* die einzige Funktion, die nachgewiesen werden konnte. Da ROS durch Wachstum von der Zelle selbst gebildet werden und so zu DNA-Schädigungen führen können, wird angenommen, dass *TSA1* ebenfalls DNA zu schützen vermag. Der Effekt auf die Mutationsrate des *URA3*-Gens, der durch den Verlust von *TSA1* entstand, war ein sehr gutes Indiz dafür. Tsa1p konnte die genetische Stabilität erhöhen und Mutationen unterdrücken. Für Tsa1p in *C. albicans* wurde unter allen untersuchten Bedingungen Hinweise auf Peroxidase-Funktion gefunden. Daher wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Hauptfunktion von Tsa1p darin bestand, Proteine vor oxidativen Schädigungen zu schützen. Im Zellkern kamen darüber hinaus Nukleotide und in der Zellwand Mannoproteine und Lipide hinzu. Völlig neu war die Erkenntnis, dass während der Hyphenbildung zumindest ein Teil von Tsa1p in die Zellwand übergeht. Ein spezifisches Signal hierfür stellt der morphologische Wechsel von Blastosporen zu Hyphen dar. Die Expression von *TSA1* war unter diesen Bedingungen nicht von *EFG1* abhängig, dagegen jedoch dessen Translokation in die Zell-

wand. Daher könnte spekuliert werden, dass ein Transporter für Tsa1p oder andere Faktoren, die am Export beteiligt sind, durch *EFG1* reguliert werden.

Tsa1p ist bisher das erste Protein eines pathogenen Pilzes, das sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert und zusätzlich aufgrund morphologischer Veränderung in die Zellwand transportiert wird. Die differenzielle Lokalisation von Tsa1p eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, Antikörper gegen dieses Protein als diagnostischen Marker für die Identifizierung des morphologischen Differenzierungszustandes zu verwenden. Die hier beschriebenen Untersuchungen könnten den Ausgangspunkt für weiterführende Studien bilden, die das Verständnis alternativer Regulationsmechanismen, wie z. B. differenzielle Lokalisation, vertiefen. Diese Erkenntnisse könnten helfen, die Möglichkeiten für die Entwicklung effizienterer Behandlungsmethoden krankheitserregender Pilze zu verbessern.

8 Literaturverzeichnis

1. Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C., and Pla, J. (2001) *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-268.
2. Cutler, J. E. (1991) *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218
3. Odds, F. C. (1994) *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.
4. Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., and Sanchez, M. (1995) *Microbiol Rev* **59**, 345-386.
5. Klis, F. M. (1994) *Yeast* **10**, 851-869.
6. Ponton, J., Omaetxebarria, M. J., Elguezabal, N., Alvarez, M., and Moragues, M. D. (2001) *Med Mycol* **39**, 101-110.
7. Shepherd, M. G. (1987) *Crit Rev Microbiol* **15**, 7-25
8. Klis, F. M., de Groot, P., and Hellingwerf, K. (2001) *Med Mycol* **39**, 1-8.
9. Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., and Martinez, J. P. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.
10. Magee, B. B., and Magee, P. T. (2000) *Science* **289**, 310-313.
11. Ernst, J. F. (2000) *Microbiology* **146 (Pt 8)**, 1763-1774
12. de Pauw, B. E., and Meunier, F. (1999) *Chemotherapy* **45 Suppl 1**, 1-14.
13. Chadborn, T. (2001) *Datamonitor*
14. Haynes, M. P., Chong, P. L., Buckley, H. R., and Pieringer, R. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 7983-7992
15. Orozco, A. S., Higginbotham, L. M., Hitchcock, C. A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A., and Filler, S. G. (1998) *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2645-2649
16. Matthews, R. C., Rigg, G., Hodgetts, S., Carter, T., Chapman, C., Gregory, C., Illidge, C., and Burnie, J. (2003) *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2208-2216
17. Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G. R. (1997) *Cell* **90**, 939-949.
18. Sundstrom, P. (1999) *Curr Opin Microbiol* **2**, 353-357.
19. Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schafer, W., and Hube, B. (2000) *Mycoses* **43 Suppl 2**, 17-21
20. De Groot, P. W., Hellingwerf, K. J., and Klis, F. M. (2003) *Yeast* **20**, 781-796
21. Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H., and Klis, F. M. (2000) *Mol Microbiol* **35**, 601-611.
22. Newman, S. L., and Holly, A. (2001) *Infect Immun* **69**, 6813-6822
23. Hofmann, B., Hecht, H. J., and Flohe, L. (2002) *Biol Chem* **383**, 347-364
24. Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996) *J Biol Chem* **271**, 15315-15321
25. Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., and Kim, I. H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 5723-5732.
26. Chae, H. Z., Uhm, T. B., and Rhee, S. G. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7022-7026
27. Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) *Biochemistry* **41**, 5493-5504
28. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) *Cell* **117**, 625-635
29. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) *Nature* **425**, 980-984

30. Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., and Sitia, R. (1992) *J Biol Chem* **267**, 24161-24164
31. Poole, L. B., Chae, H. Z., Flores, B. M., Reed, S. L., Rhee, S. G., and Torian, B. E. (1997) *Free Radic Biol Med* **23**, 955-959
32. Cha, M. K., Yun, C. H., and Kim, I. H. (2000) *Biochemistry* **39**, 6944-6950
33. Iwahara, S., Satoh, H., Song, D. X., Webb, J., Burlingame, A. L., Nagae, Y., and Muller-Eberhard, U. (1995) *Biochemistry* **34**, 13398-13406
34. Nemoto, Y., Yamamoto, T., Takada, S., Matsui, Y., and Obinata, M. (1990) *Gene* **91**, 261-265
35. Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003) *Nature* **425**, 686-691
36. Lee, S. M., and Park, J. W. (1998) *Arch Biochem Biophys* **359**, 99-106
37. Wong, C. M., Siu, K. L., and Jin, D. Y. (2004) *J Biol Chem* **279**, 23207-23213
38. Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., and Morgan, B. A. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 2631-2642.
39. Pluthero, F. G. (1993) *Nucleic Acids Res* **21**, 4850-4851
40. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987) *Current protocols in molecular biology*, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley, New York
41. Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991) *Methods Enzymol* **194**
42. Gillum, A. M., Tsay, E. Y., and Kirsch, D. R. (1984) *Mol Gen Genet* **198**, 179-182
43. Fonzi, W. A., and Irwin, M. Y. (1993) *Genetics* **134**, 717-728.
44. Zhang, X., De Micheli, M., Coleman, S. T., Sanglard, D., and Moye-Rowley, W. S. (2000) *Mol Microbiol* **36**, 618-629.
45. Morschhauser, J., Michel, S., and Staib, P. (1999) *Mol Microbiol* **32**, 547-556
46. Care, R. S., Trevethick, J., Binley, K. M., and Sudbery, P. E. (1999) *Mol Microbiol* **34**, 792-798
47. Gerami-Nejad, M., Berman, J., and Gale, C. A. (2001) *Yeast* **18**, 859-864.
48. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*, 2nd Ed. (Ford, N., Ed.), 1-3. 3 vols., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour
49. Braun, B. R., and Johnson, A. D. (1997) *Science* **277**, 105-109.
50. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
51. Sanchez, J. C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M. R., and Hochstrasser, D. F. (1997) *Electrophoresis* **18**, 324-327
52. Hirotsu, S., Abe, Y., Okada, K., Nagahara, N., Hori, H., Nishino, T., and Hako-shima, T. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12333-12338
53. Boeke, J. D., LaCroute, F., and Fink, G. R. (1984) *Mol Gen Genet* **197**, 345-346
54. Staab, J. F., and Sundstrom, P. (1998) *Yeast* **14**, 681-686.
55. Sentandreu, M., Elorza, M. V., Sentandreu, R., and Fonzi, W. A. (1998) *J Bacteriol* **180**, 282-289.
56. Sohn, K., Urban, C., Brunner, H., and Rupp, S. (2003) *Mol Microbiol* **47**, 89-102
57. Matthews, R., Wells, C., and Burnie, J. P. (1988) *J Med Microbiol* **27**, 227-232.
58. Singleton, D. R., Masuoka, J., and Hazen, K. C. (2001) *J Bacteriol* **183**, 3582-3588.
59. Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2002) *Mol Cell Proteomics* **1**, 967-982.
60. Cole, S. R., Ashman, L. K., and Ey, P. L. (1987) *Mol Immunol* **24**, 699-705.

61. Cappellaro, C., Morsa, V., and Tanner, W. (1998) *J Bacteriol* **180**, 5030-5037.
62. Wilcheck, M., and Bayer, A. S. (1990) *Methods Enzymol* **184**, 14-45
63. Fonzi, W. A. (1999) *J Bacteriol* **181**, 7070-7079.
64. Lopez-Ribot, J. L., Alloush, H. M., Masten, B. J., and Chaffin, W. L. (1996) *Infect Immun* **64**, 3333-3340.
65. Swoboda, R. K., Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Gow, N. A., Gooday, G. W., and Brown, A. J. (1993) *Infect Immun* **61**, 4263-4271.
66. Alloush, H. M., Lopez-Ribot, J. L., Masten, B. J., and Chaffin, W. L. (1997) *Microbiology* **143**, 321-330.
67. Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P., and Gozalbo, D. (1997) *J Bacteriol* **179**, 4992-4999.
68. Radding, J. A., Heidler, S. A., and Turner, W. W. (1998) *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1187-1194.
69. Giles, G. I., and Jacob, C. (2002) *Biol Chem* **383**, 375-388
70. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Tolodano, M. B. (1999) *J Biol Chem* **274**, 16040-16046
71. Missall, T. A., Pusateri, M. E., and Lodge, J. K. (2004) *Mol Microbiol* **51**, 1447-1458
72. Dieterich, C., Schandar, M., Noll, M., Johannes, F. J., Brunner, H., Graeve, T., and Rupp, S. (2002) *Microbiology* **148**, 497-506
73. Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993) *J Biol Chem* **268**, 16815-16821
74. Sia, R. A., Urbonas, B. L., and Sia, E. A. (2003) *Curr Genet* **44**, 26-37
75. Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, 4 Ed., W. H. Freeman and Company, New York
76. Enjalbert, B., Nantel, A., and Whiteway, M. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 1460-1467
77. Braun, B. R., Kadosh, D., and Johnson, A. D. (2001) *Embo J* **20**, 4753-4761
78. Park, J. W., and Floyd, R. A. (1994) *Arch Biochem Biophys* **312**, 285-291
79. Huang, M. E., Rio, A. G., Nicolas, A., and Kolodner, R. D. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11529-11534
80. Masuoka, J., Guthrie, L. N., and Hazen, K. C. (2002) *Microbiology* **148**, 1073-1079.
81. Michaelis, S. (1993) *Semin Cell Biol* **4**, 17-27.
82. Kuchler, K., and Thorner, J. (1992) *Endocr Rev* **13**, 499-514.
83. Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H., and Kelly, R. B. (1996) *J Cell Biol* **133**, 1017-1026.
84. Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L. V., Torrissi, M. R., Bianchi, M. E., and Rubartelli, A. (2002) *EMBO Rep* **3**, 995-1001.
85. Nickel, W. (2003) *Eur J Biochem* **270**, 2109-2119
86. Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M. V., and Sentandreu, R. (1997) *Microbiology* **143**, 313-320.
87. Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Martinez, J. P., and Gil, M. L. (1998) *Infect Immun* **66**, 2052-2059.
88. Zhu, J. K., Damsz, B., Kononowicz, A. K., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. (1994) *Plant Cell* **6**, 393-404.
89. Delgado, M. L., Gil, M. L., and Gozalbo, D. (2003) *Yeast* **20**, 713-722
90. Jamieson, D. J. (1998) *Yeast* **14**, 1511-1527
91. Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., and Calderone, R. (2004) *Infect Immun* **72**, 2390-2394
92. Vazquez-Torres, A., and Balish, E. (1997) *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 170-192

Anhang

Sequenzierung des *TSA1*-Genlokus b

Die Sequenzierung (Biolux GmbH, Stuttgart) des hier beschriebenen Abschnitts des *TSA1*-Genlokus b (Abb. 19, Abschnitt 6.3.2) zeigte, dass im *Candida*-Genom vier identische Allele des *TSA1* Gens existieren, wobei sich je zwei Allele an unterschiedlichen Genloki auf Contig 19-2514 befanden

(www-sequence.stanford.edu/group/candida).

Contig 19-2514 endet vor dem Ende des *TSA1*-Lokus b (Abb. 19). Jeweils 630 bp in 5'-Richtung der offenen Leserahmen von *TSA1* liegt eine ebenfalls identische Sequenz. Danach sind die Sequenzen unterschiedlich. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um einen Primer herzustellen, der an diesen Bereich des *TSA1*-Genlokus b hybridisiert. Durch PCR-Amplifikation mittels eines zweiten Primers, der an eine Region jenseits des 3'-Endes des *TSA1*-Genlokus a bindet (Abb. 19), entstand ein spezifisches Produkt der Länge 2100 bp. Das deutete darauf hin, dass am Ende des Contigs-2514 noch eine vollständige Kopie des *TSA1*-Gens liegt.

Sequenz des spezifischen PCR-Produkts von *TSA1*-Genlokus b

Im folgenden ist die Basensequenz des spezifischen PCR-Produktes der Länge 2100 bp gezeigt, welche durch die Sequenzierung ermittelt wurde.

Die Primer, die für die Sequenzierung verwendet wurden, sind in der Sequenz fett gedruckt (reversed: kursiv; forward: nicht kursiv). Kleinbuchstaben kennzeichnen Basen, die bei der Sequenzierung schwache Signale ergaben.

```

1   GTGGTGGaAAAtAAGTGACAAGCTTTAATTCCAATAGATTTGACCTTTAGTTTACCATTAAGGATACACT
71  ATATCGAGACTAAGATAATACCAAGAGATCGAAGTGGCGTTTATATTTCTTGGTATAATCATTTCCGACA
141 GGGAAATTGGTATTTTGGCTACAGTTCCATTACATAATCATAGATCACAATACTAAAGCACTGGTTTAAAA
211 TTGCAAATTTTCAGTATGAAGTGATTGAATTTTGGTGAATAATTGTTGTCCACTGCTAGTTTATAAT
281 ATCATGGCAAGGAATGAACATAATTTCTGTTTGAATTCACCTCAAAAATTTTCAAAAATTACCATACTAT
351 TCCTCGGTTCTTACTCATTCTAGAATTCGCTTTGTCATCACACAGCGCAACAGACCATTTTACTAGCCCT
421 AAGCCAAAGGTGTCTGTTATGCCCAATAGGTAAGATTACTATCACCTGAGTAATCAAATTGCAGATTTAT
491 TGTGGTCTAGCGGGAAAAATAAGAGCGCACTGGGTGGGCCAATTAGATCCACATCTTCATTACAAATCA
561 CCCTGGTGGACCTAGACCTTTTTTGGGTCGATATTCCTGCACAATGTCCGCACATATTGTAGCTCTCACT
631 CACCAATGAAAAACGCGCCACCTGCACAGAAGTACCGGAATATTAAGGAAGATATGCCACACAATTGAG
701 TATATGTGAAATCATATGAAAGGCCAAACGATTTGTAACGAGAGAAATTGAACCATCGGCAACAATCAAGC
771 CAAAAAATAAAAACTGGAAAATAGTATATAATGAGCTCAATTGTACTTCCAATCTCTGATTTTTTTTT
841 TCTAATCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTTCTTTCTTTTGTCTATTGCATTTATTTCaAtC
911 AACTaATTAATTAGTCACATACATAGATACACTACTACAAAATGGCTCCAGTCGTTCAACAACCAGCTC
981 CAAGTTTCAAGAAAACCGCCGTCGTTGATGGTGTCTTTGAAGAAGTCACTTTAGAACAATACAAAGGTAA
1051 ATGGGTCTTGTGGCCTTTATTCCATTGGCCTTCACATTGCTCTGCCATCAGAAATATTGCTTATTCC
1121 GAAGCTGTAAAGAAATTTGCCGAAAAGGATGCTCAAGTTTTGTTGCCTCTACTGACTCCGAATACACCT
1191 GGTGGCTTGGACCAATGTCGCCAGAAAAGACGGTGGTATTGGCAAAGTCGACTTCCCAGTCTTGGCTGA
1261 CACCAACCCTCCTTGTCCAGAGACTACGGTGTCTTAATTGAAGAAGAAGGTGTTGCCTTGAGAGGTATT
1331 TTCTTGATTGATCCAAAGGGTGTCTTGAGACAAATCACCATCAATGACTTGCCAGTCGGTAGATCTGTTG
1401 AAGAATCCTTGAGATTGTTGGAGGCTTTCCAATTCAGTAAAAATACGGTGAAGTTTGTCCAGCTAACTG
1471 GCACCCAGGTGATGAAACCATCAAGCCAAGCCAGAAGCATCCAAGGAATACTTCAACAAAGTCAACAAA
1541 TAAACAGGATTTATAGATATATATGTACGTTTTTTTTTTTCGTTATGGTTTCATAGCAAATAGATTGCATT
1611 TTAgACAAGCTTTGTTTTGTGTTGCTCTAAGTTCTGTAATGTGCCTGTTTGATTTCGAGCCTGATTTATAC
1681 TAGAGCTGCGTTTCATGCCGATACAAATGCACTTCGATATTCTTCTCTCCCAAGTATTTTCAATGTTATT
1751 ATTTTTTTTTTCGCTCTCTTATCTCTTCAACAAACAAAGCCACAATGACATCTCAAGAGATTTACTTTTA
1821 CCGGTTCTTAGTGAGCAAGCAGGTATTCTACAAGTCAAGGTATACGTATGCGCTAGTGAATCTCAAGCCG
1891 TTGGTGCCAGGTCATGTGTTGGTGGTTCCTTTGCGTACCAATGTGTTACGGTTCGGCGACTTGTGCGCTG
1961 AAGAGTCTGTGCATTATATGCATACCTTGCAAGTTGATCCACAAGTTTATACAAAAGGTTTACAAGGCTGA
2031 CTCCTTAAACTTAGCAATACAAGAtGGGCCGAgTctGGCCAATCGGTGCCACATTTGCATACCCACatC
2101 At

```

Abgleich der ermittelten Basensequenz des spezifischen PCR-Produkts von TSA1-Genlokus b mit der *Candida*-Datenbank

Die Basensequenz des sequenzierten Abschnittes des *TSA1*-Genlokus b wurde mit der *Candida*-Datenbank verglichen. (www-sequence.stanford.edu). Ab Base 337 bis 2102 war die ermittelte Sequenz des *TSA1*-Genlokus b inklusive des offenen Leserahmens von *TSA1* (fett gedruckt) mit der Sequenz des Genlokus a zu 100 % iden-

tisch (Blast 1). Die Basen 1 bis 336 liegen in dem Bereich der Sequenz, die sich vom Genlokus a unterscheidet. Dieser Sequenzabschnitt entsprach der Datenbank zufolge genau dem Bereich des Genlokus b (Blast 2).

Blast 1

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
Contig19-2514	size=126050 [AAF1] [ALS6] [ALS7] [ALS94]	8835	0.0	1

Contig19-2514 size=126050 [AAF1] [ALS6] [ALS7] [ALS94] [ALS95] [ALS97]
 [ALS98] [APN1] [DOT1] [ERV25] [GLG99] [HST6] [JEN1] [LYS9] [MED6]
 [MMS21] [MUB1] [NUP116] [OPI3] [OST6] [PCH1] [SDL1] [TAF60] [TSA1]
 [UBA1] [UNG1] [YAL17] [YBL1] [YDR155] [YDR305] [YDR430] [YER126]
 [YER127] [YGL113] [YGL247] [YIL167] [YJL218] [YKL120] [YKL210]
 [YML18] [YML20] [YML9] [YMR211] [YOL45] [YOR304]
 Length = 126,050

Plus Strand HSPs:

Score = 8835 (1325.6 bits), Expect = 0.0, P = 0.0

Identities = 1767/1767 (100%), Positives = 1767/1767 (100%), Strand = Plus / Plus

Minus Strand HSPs:

Score = 4585 (687.9 bits), Expect = 1.3e-201, P = 1.3e-201

Identities = 929/935 (99%), Positives = 929/935 (99%), Strand = Minus / Plus

Blast 2

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
Contig19-2514	size=126050 [AAF1] [ALS6] [ALS7] [ALS94]	1670	6.1e-70	1

Contig19-2514 size=126050 [AAF1] [ALS6] [ALS7] [ALS94] [ALS95] [ALS97]
 [ALS98] [APN1] [DOT1] [ERV25] [GLG99] [HST6] [JEN1] [LYS9] [MED6]
 [MMS21] [MUB1] [NUP116] [OPI3] [OST6] [PCH1] [SDL1] [TAF60] [TSA1]
 [UBA1] [UNG1] [YAL17] [YBL1] [YDR155] [YDR305] [YDR430] [YER126]
 [YER127] [YGL113] [YGL247] [YIL167] [YJL218] [YKL120] [YKL210]
 [YML18] [YML20] [YML9] [YMR211] [YOL45] [YOR304]
 Length = 126,050

Minus Strand HSPs:

Score = 1670 (250.6 bits), Expect = 6.1e-70, P = 6.1e-70

Identities = 334/334 (100%), Positives = 334/334 (100%), Strand = Minus / Plus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Architektur der Pilz-Zellwand.	14
Abbildung 02: Schematische Dartsellung der möglichen Tsa1p-Dimere in <i>S. cerevisiae</i> .	18
Abbildung 03: Aminosäuresequenz von Tsa1p aus <i>C. albicans</i> .	38
Abbildung 04: Charakterisierung der polyklonalen Anti-TSA-Antikörper.	41
Abbildung 05: Anreicherung biotinylierter Proteine.	49
Abbildung 06: Präparative Aufreinigungen löslicher Zellwand-Proteine von <i>C. albicans</i> .	51
Abbildung 07: Bindungsexperimente mit intakten Zellen von <i>C. albicans</i> .	54
Abbildung 08: Subzelluläre Lokalisation von Tsa1-Gfp in Blastosporen und Hyphen von <i>C. albicans</i> mittels konfokaler Mikroskopie.	56
Abbildung 09: Tsa1p-Gfp lokalisiert im Nukleus.	57
Abbildung 10: Lokalisation von Ebp1p-Gfp in Hyphen und Blastosporen.	58
Abbildung 11: Hyphenbildung ist ein Signal für die Translokation von Tsa1p an die Zellwand.	59
Abbildung 12: Die Lokalisation von Tsa1-Gfp bleibt unverändert bei Zugabe von Wasserstoffperoxid.	61
Abbildung 13: Wasserstoffperoxid und Hitzeschock führen nicht zur Translokation von Tsa1p an die Zellwand.	62
Abbildung 14: Tsa1p wird nicht in das Medium sezerniert.	63
Abbildung 15: Tsa1p als Dimer und in einer überoxidierten Form.	65
Abbildung 16: Induktion von <i>TSA1</i> durch oxidierende und reduzierende Substanzen.	67
Abbildung 17: <i>TSA1</i> wird durch <i>CAP1</i> reguliert.	68
Abbildung 18: <i>TSA1</i> ist kein hyphal induziertes Gen.	69
Abbildung 19: Schema der verschiedenen <i>TSA1</i> -Genloki im Genom von <i>C. albicans</i> .	70
Abbildung 20: Deletion der vier Allele von <i>TSA1</i> .	73
Abbildung 21: Infektionsmodel einer systemischen Kandidose in Mäusen.	74
Abbildung 22: $\Delta tsa1$ -Mutante sind sensitiver gegenüber H_2O_2 und DTT.	75
Abbildung 23: Verlust von <i>TSA1</i> hat keine signifikante Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hitzeschock.	76
Abbildung 24: Transkriptionsanalysen der $\Delta tsa1$ -Mutante Can312 im Vergleich zum Wildtyp SC 5314.	78
Abbildung 25: Disregulierte Gene der $\Delta tsa1$ -Mutante in YPD 30 °C.	78
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Cystein und Glutathion-Biosynthese.	80
Abbildung 27: Northern-Hybridisierungen zur Bestätigung der Mikroarray-Daten.	88

Abbildung 28: Erhöhte Mutationsrate in $\Delta tsa1$ -Mutanten. 90

Abbildung 29: Mit Tsa1p interagierende Proteine der Hyphenzellwand. 92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Fluoreszenzfarbstoffe und Enzyme.	20
Tabelle 02: Reaktions-Kits.	20
Tabelle 03: Verwendete Antikörper.	21
Tabelle 04: <i>C. albicans</i> Stämme.	23
Tabelle 05: Plasmide und Vektoren.	23
Tabelle 06: Primer für die Herstellung der Deletions-, Rekonstitutions- und GFP-Markierungskonstrukte.	24
Tabelle 07: Primer für Northern- und Southern-Hybridisierungs-Sonden.	24
Tabelle 08: Primer für die Sequenzierung des <i>TSA1</i> -Genslokus in <i>C. albicans</i> .	25
Tabelle 09: Identität der löslichen Zellwand-Proteine.	52
Tabelle 10: Auswertung der genomweiten Transkriptionsanalyse bei 5 mM H ₂ O ₂ .	81
Tabelle 11: Auswertung der genomweiten Transkriptionsanalyse 6 h α -MEM 37 °C.	85

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich...

...Prof. Dr. Herwig Brunner für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion mit großzügigen Arbeitsbedingungen.

...Prof. Dr. Wolfgang Seufert für sein Interesse an dieser Arbeit.

...PD Dr. Steffen Rupp für die intensive Betreuung, seine ständige Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen und die Schaffung sehr guter Rahmenbedingungen.

...Dr. Kai Sohn für sein fortwährend großes Interesse an dieser Arbeit, für die unzähligen anregenden Diskussionen und seine Fähigkeit für eine Sache zu motivieren, die wesentlich zum Gelingen beigetragen hat.

...Dipl. Biol. Marc Röhm für seinen wissenschaftlichen und vor allem menschlichen Beistand, der für mich sehr wertvoll war.

...Dipl. Biol. (t. o.) Xin Xiong für sein Interesse an dieser Arbeit und die Weiterführung der Untersuchungen an Tsa1p.

...allen Mitgliedern der Gruppe „Genomics and Proteomics“ für die immerwährende Hilfsbereitschaft sowie die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

...meiner Familie und ganz besonders Katrin Pusch für den Rückhalt, die Unterstützung und einfach alles.

Diese Arbeit ist meinem Sohn Niels Robert Egon gewidmet, der am 29.01.2004 in Bad-Cannstatt geboren wurde.

Lebenslauf

von Constantin Urban,
geboren am 5. November 1973
in Stuttgart

Ausbildung

- September 1984 – Staufer-Gymnasium Waiblingen
Mai 1993 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- Oktober 1993 – Wehrdienst
September 1994
- Oktober 1994 – Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
Juli 2000 und an der California State University Long Beach, USA
Hauptfächer: Mikrobiologie und Virologie
Nebenfächer: Bioverfahrenstechnik und Immunologie
- Januar 1998 – Praktikum am Harbour-UCLA Research and Education Institute,
Juni 1998 Torrance, USA Abteilung Infectious Diseases
bei Prof. M. Yeaman
- November 1999 – Studienarbeit am IBVT, Universität Stuttgart bei Prof. M. Reuss
März 2000 Titel: Charakterisierung eines Expressionssystems in *E. coli* für
die Produktion einer Aryl-Aceto Nitrilase aus
Alcaligenes faecalis JM3
- August 2000 – Diplomarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart bei PD Dr. S. Rupp
April 2001 Titel: Identifizierung von Virulenzfaktoren der Zellwand in
Candida albicans
- Mai 2001 – Promotion am Fraunhofer IGB und an der Universität Stuttgart
Juni 2004 bei PD Dr. S. Rupp und Prof. H. Brunner
- Januar 2002 – Forschungsaufenthalt an der Universität Amsterdam bei
Februar 2002 Prof. F. Klis, Untersuchung von GPI-Proteinen in der Zellwand
von *Candida albicans*
- Seit Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Infek-
September 2004 tionsbiologie in Berlin, Abteilung Zelluläre Mikrobiologie
bei Prof. A. Zychlinsky

Publikationen

1. **Urban C., Sohn K., Lottspeich F., Brunner H., Rupp S.**

Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell.

FEBS Letters: 2003, Jun 5;544(1-3): 228-35

2. **Sohn K., Urban C., Brunner H., Rupp S.**

EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays.

Molecular Microbiology: 2003, Jan; 47(1): 89-102.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfaßt habe.

Stuttgart, November 2004

Constantin Urban