

**Lokalisation von Tsa1p, einem thioispezifischen
Antioxidant-ähnlichen Protein aus *Candida albicans* und
dessen Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Interaktion**

**Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung**

**Vorgelegt von
Martina Brachhold
aus Stuttgart**

**Hauptberichter: PD Dr. S. Rupp
Mitberichter: Prof. Dr. P. Scheurich
Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2011**

**Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart
2011**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	07
1 Zusammenfassung	10
2 Abstract	11
3 Einleitung	12
3.1 <i>Candida albicans</i> – ein polymorpher Hefepilz	12
3.2 Wachstumsverhalten und Quorum sensing	16
3.3 <i>C. albicans</i> als Humanpathogen	17
3.3.1 Prävalenz von Candidosen	17
3.3.2 Therapie	18
3.3.3 Virulenzfaktoren	19
3.4 Zellwandaufbau von <i>C. albicans</i>	20
3.5 Erkennung von <i>C. albicans</i> durch den Wirt	22
3.6 Mechanismen der Proteinsekretion	23
3.7 Tsa1p – ein „moonlighting“ Protein in <i>C. albicans</i>	25
3.8 Zielsetzung der Arbeit	27
4 Material und Methoden	28
4.1 Material	28
4.1.1 Chemikalien	28
4.1.2 Radiochemikalien	28
4.1.3 Enzyme	28
4.1.4 Reaktionskits	29
4.1.5 Pufferlösungen	29
4.1.6 Kulturmedien	29
4.1.7 Oligonukleotide	31
4.1.8 Plasmide und Vektoren	32
4.1.9 Antikörper	33
4.1.10 <i>C. albicans</i> Stämme	33
4.1.11 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	35
4.1.12 Bakterienstämme	36
4.1.13 Zelllinien	36
4.1.14 Datenbanken und Datenverarbeitung	36
4.2 Methoden	37

4.2.1	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	37
4.2.2	Kultivierung von Hefestämmen.....	37
4.2.3	Kultivierung von Zelllinien.....	38
4.2.4	Mikroskopie.....	39
4.2.5	Biotinylierung von Zellwandproteinen.....	39
4.2.6	Zellaufschluss und Proteinkonzentrationsbestimmung.....	40
4.2.7	Immunfällung.....	41
4.2.8	Generierung und Aufreinigung der Anti-Tsa1p-Antikörper.....	41
4.2.9	Alternative Methode zur Gewinnung von biotinyliertem Tsa1p.....	47
4.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
4.2.11	Methoden zur Gelfärbung.....	49
4.2.12	Western Blot Analysen.....	51
4.2.13	Massenspektrometrische Analyse.....	52
4.2.13.1	Analyse von Tsa1p.....	52
4.2.13.2	Analyse des Sekretoms.....	53
4.2.14	Isolierung von Gesamt-RNA.....	54
4.2.15	Northern Blot Analysen.....	55
4.2.16	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	57
4.2.17	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	57
4.2.18	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	58
4.2.19	Restriktionsverdau von DNA und Ligation in Plasmide.....	59
4.2.20	Transformation von Bakterien und Hefen.....	60
4.2.21	Southern Blot Analysen.....	61
4.2.22	Einbringen von <i>CaTSA1</i> in <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	62
4.2.23	Erzeugung von Punktmutationen in <i>CaTSA1</i>	63
4.2.24	Bestimmung der β -Glucan Exposition auf Zelloberflächen.....	64
4.2.25	Ermittlung der Phagozytoserate von <i>Candida</i> -Zellen durch Immunzellen.....	65
4.2.26	Messung der Produktion von ROS durch Immunzellen.....	67
4.2.27	Ermittlung der Überlebensrate von <i>Candida</i> -Zellen nach Kontakt mit Immunzellen.....	67
5	Ergebnisse.....	70
5.1	Bedingungen der Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche.....	70
5.1.1	Tsa1p wird auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche	

	transportiert.....	71
5.1.2	Die Tsa1p-Oberflächenlokalisation ist abhängig von der Wachstumsphase.....	73
5.1.3	Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Oberflächenlokalisation.....	75
5.1.4	Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf die Oberflächenlokalisation.....	77
5.1.5	Untersuchung auf posttranslationale Modifizierung von Tsa1p.....	79
5.1.6	Die Oberflächenlokalisation ist durch verschiedene Faktoren induzierbar.....	82
5.1.7	Tsa1p-Oberflächenlokalisation findet sich bei einer Vielzahl von <i>C. albicans</i> Isolaten.....	84
5.1.8	CaTsa1p lokalisiert auch in <i>S. cerevisiae</i> an die Zelloberfläche.....	85
5.2	Signaltransduktionswege und molekulare Determinanten der Tsa1p-Oberflächenlokalisation.....	88
5.2.1	Relevante Signaltransduktionswege der Tsa1p-Oberflächenlokalisation.....	89
5.2.1.1	Ras1p.....	91
5.2.1.2	Pde2p.....	92
5.2.1.3	Efg1p.....	93
5.2.1.4	Msb2p.....	94
5.2.1.5	Hst6p.....	95
5.2.2	Molekulare Determinanten der Tsa1p-Oberflächenlokalisation.....	96
5.2.2.1	Einbringen gezielter Punktmutationen in <i>TSA1</i>	97
5.2.2.2	<i>TSA1</i> -Mutanten sind katalytisch inaktiv.....	99
5.2.2.3	Fähigkeit zur Ausbildung multimerer Komplexe wird beeinflusst.....	101
5.2.2.4	Mutationen haben einen Einfluss auf die Zelloberflächenlokalisation.....	103
5.3	Einfluss von Tsa1p auf die Zellwand von <i>C. albicans</i> und die Immunantwort des Wirtes.....	105
5.3.1	Tsa1p und die β -Glucan Exposition der Zellwand.....	106
5.3.2	Tsa1p und die Produktion von ROS durch Makrophagen.....	108
5.3.3	Tsa1p und die Phagozytoserate durch Makrophagen.....	110
5.3.4	Tsa1p und die Überlebensrate der <i>Candida</i> -Zellen nach Kontakt	

	mit Immunzellen.....	113
6	Diskussion.....	117
6.1	Tsa1p wird nicht-klassisch transportiert.....	118
6.2	Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche.....	119
6.2.1	Abhängigkeit von der Wachstumsphase und Einfluss von QSM.....	120
6.2.2	Tsa1p-Oberflächenlokalisierung und das Redox-Gleichgewicht der Zellen.....	121
6.2.3	Klinische Isolate.....	122
6.2.4	CaTsa1p in <i>S. cerevisiae</i>	123
6.3	Untersuchung möglicher posttranslationaler Modifizierung von Tsa1p.....	124
6.4	Signaltransduktionswege der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung.....	125
6.5	Molekulare Determinanten der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung.....	128
6.5.1	Einfluss der Cysteine.....	128
6.5.2	Einfluss des C-Terminus.....	130
6.6	Einfluß von Tsa1p auf die Wirt-Pathogen-Interaktion.....	131
7	Literaturverzeichnis.....	136
Anhang.....		146
	Peptidsequenzen der zwei aus dem Gel ausgeschnittenen Banden....	146
	Sekretom von <i>C. albicans</i> Zellen (BFA-Versuch).....	147
	Abbildungsverzeichnis.....	149
	Tabellenverzeichnis.....	151
	Danksagung.....	152
	Lebenslauf.....	153
	Erklärung.....	154

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
α-MEM	Minimal Essential Medium Alpha nach Eagle
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
b	Base
BFA	Brefeldin-A
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>Ca</i>	<i>Candida albicans</i>
CBB	“Coomassie Brilliant Blue“
CLR	“C-type Lectin Receptor“
CNBr	“Cyanogen bromide“
CT	C-terminal
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g / mg / µg	Gramm / Milligramm / Mikrogramm
GFP	“Green Fluorescent Protein“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metall-Ionen Chromatographie
IP	Immunpräzipitation (Immunfällung)

l / ml / μ l	Liter / Milliliter / Mikroliter
M / mM	Molar / Millimolar
m / mm / μ m	Meter / Millimeter / Mikrometer
MALDI-TOF	“Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
MS	Massenspektrometrie
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NP40	Nonident P40
NT	N-terminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	“Open Reading Frame“ (offener Leserahmen)
p. a.	“pro analysi“ (für analytische Zwecke)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	“Pathogen-Associated Molecular Pattern”
PBS	“Phosphate buffered saline“ (Phosphatpuffer mit Salz)
PBST	PBS mit 0,05% Tween20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
PRR	“Pattern Recognition Receptor”
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QSM	Quorum Sensing Molekül
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Sav-POD	Streptavidin-Peroxidase
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	“Sodium Dodecyl Sulfate“
SSC	“Saline Sodium Citrate”
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

TCA	Trichloracetat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	“Toll-like Receptor”
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan Monolaureat
U	Units (Einheiten)
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenprozent (volume/volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight/volume)
WT	Wildtyp
YNB	„Yeast Nitrogen Base“
YPD	„Yeast extract / peptone / dextrose“
ZV	Zellverdopplung

1 Zusammenfassung

Der Hefepilz *Candida albicans* lebt als opportunistischer, kommensalischer Organismus hauptsächlich auf Haut und Schleimhäuten des Verdauungs- und Urogenitaltrakts der meisten gesunden Menschen. Allerdings kann *C. albicans* bei immunkomprimierten Menschen auch lebensbedrohliche Infektionen auslösen.

Die Zellwand von *C. albicans* und deren Zusammensetzung spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung oder Abwehr einer Infektion. Zellwandbestandteile vermitteln die Adhäsion und Invasion in Wirtsgewebe und tragen somit entscheidend zur Pathogenität des Organismus bei. Bestandteile der Zellwand dienen dem Immunsystem des Wirtes jedoch als antigene Strukturen, die von Immunzellen erkannt werden können; dies kann schließlich zur Abtötung des Pathogens führen.

Das thiol-spezifische Antioxidant-ähnliche Protein Tsa1p ist ein differentiell lokalisiertes Protein, das sowohl an der Zellwand sowie im Cytosol und Nukleus der Zellen gefunden wird. Im Cytosol übernimmt das Protein unter anderem die Funktion, Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Trotz der Zellwandlokalisation besitzt das Protein keine N-terminale Signalsequenz, die es ihm ermöglichen würde, in den klassischen ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg einzutreten.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Identifizierung der molekularen Determinanten und relevanten Signaltransduktionswege, die für den Transport des Proteins an die Zelloberfläche verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass Tsa1p durch einen nicht-klassischen, vom ER/Golgi-unabhängigen Transportweg an die Zelloberfläche gelangt. Es wurden verschiedene Bedingungen identifiziert, die zu einer Lokalisation des Proteins an die Zelloberfläche führen: die Wachstumsphase der Zellen sowie Stressinduktion spielen hierbei unter anderem eine Rolle. Durch Erzeugen verschiedener Punktmutationen in Tsa1p konnten wichtige Determinanten der Translokation des Proteins an die Zelloberfläche identifiziert werden. Beide katalytisch aktiven Cysteine des Proteins werden für die Lokalisation an die Zelloberfläche benötigt, nicht aber dessen C-Terminus. Diese Mutanten zeigten ebenfalls eine Veränderung in der Zusammensetzung ihrer Zellwand bezüglich der Zugänglichkeit des Bestandteils β -1,3-Glucan. Auch die Erkennung durch Immunzellen war bei diesen Stämmen gegenüber dem Wildtyp verändert. Es konnte somit gezeigt werden, dass Tsa1p eine wichtige Funktion an der Zellwand besitzt, welche mit der Wirt-Pathogen-Interaktion zusammenhängt.

2 Abstract

The yeast *Candida albicans* is an opportunistic, commensal organism living mainly on the skin and mucosal surfaces of the intestinal and urogenital tract of most healthy humans. However, *C. albicans* can lead to life-threatening infections in immunocompromised hosts.

The cell wall of *C. albicans* and its composition possesses an important role in establishing or preventing an infection. Cell wall components mediate adhesion to and invasion into host tissue and therefore contribute substantially to the pathogenicity of the organism. However, these compounds also represent antigenic structures which can be sensed and recognized by immune cells of the host. Subsequently this can lead to killing of the pathogen.

The thiol-specific antioxidant-like protein Tsa1p is a differentially localized protein which can be found at the cell wall as well as in the cytosol and the nucleus of the cells. In the cytosol it protects the organism against oxidative stress. Despite its cell surface localization, this protein does not have an N-terminal signal sequence for entry into the classical ER/Golgi-mediated secretory pathway.

This thesis focused on identifying the molecular determinants and relevant signaling pathways crucial for localizing Tsa1p to the cell surface. It could be shown that Tsa1p is transported in a non-classical, ER/Golgi-independent manner. Various conditions could be identified which lead to a cell surface localization of the protein: the growth phase in which the cells are in and also stress induction play a decisive role. By generating different point mutations in Tsa1p we could identify important determinants needed for the translocation of the protein to the cell surface. Both catalytically active cysteines of the protein are needed for cell surface localization but not its C-terminus. These mutants also show a change in their cell wall composition concerning the component β -1,3-glucan. The recognition of these strains by immune cells of the host was altered compared to wildtype cells. Consequently we could show that Tsa1p has an important function at the cell wall which is linked to the interaction between the host and the pathogen.

3 Einleitung

3.1 *Candida albicans* – ein polymorpher Hefepilz

Der Hefepilz *Candida albicans* wird systematisch in den Stamm der *Ascomyceten* (Schlauchpilze) und die Ordnung der *Saccharomycetales* eingeordnet. *C. albicans* besitzt ein diploides Genom mit acht Chromosomenpaaren. Die Vermehrung erfolgt asexuell, unter bestimmten Voraussetzungen konnte jedoch Paarung induziert und tetraploide Zellen hervorgebracht werden (Hull et al. 2000, Magee and Magee 2000, Pujol et al. 1993). Eine Sporulation wurde bislang jedoch nicht beobachtet. *C. albicans* ist ein fakultativ anaerober und Kohlenstoff-heterotropher Organismus. Das Genom wurde in zehnfacher Abdeckung vollständig sequenziert und man geht von insgesamt 7200 verschiedenen Genen aus (Lo et al. 1997). Damit liegt das Genom von *C. albicans* etwa in der Größenordnung von *S. cerevisiae*.

C. albicans wird auch als polymorpher Hefepilz bezeichnet: er kann reversible morphogenetische Übergänge zwischen Blastosporen, Pseudohyphen und Hyphen durchlaufen (Odds 1988). Blastosporen sind ovale, 4-6 µm große Zellen, die sich durch Sprossung vermehren. Bei der Bildung von Pseudohyphen trennen sich Mutter- und Tochterzelle nach der Teilung nicht mehr voneinander. Dabei entstehen Ketten länglicher, einzelner Zellen (Lo et al. 1997). Durch anhaltendes apikales Wachstum der Blastosporen können sich Hyphen ausbilden. Diese langen, röhrenförmigen Strukturen sind durch Septen segmentiert, die einzelne Zellkerne voneinander trennen. Die Fähigkeit, zwischen einzelligen und filamentösen Wachstumsformen zu wechseln, wird als Dimorphismus bezeichnet. In Abb. 01 sind die verschiedenen Morphologien von *C. albicans* dargestellt.

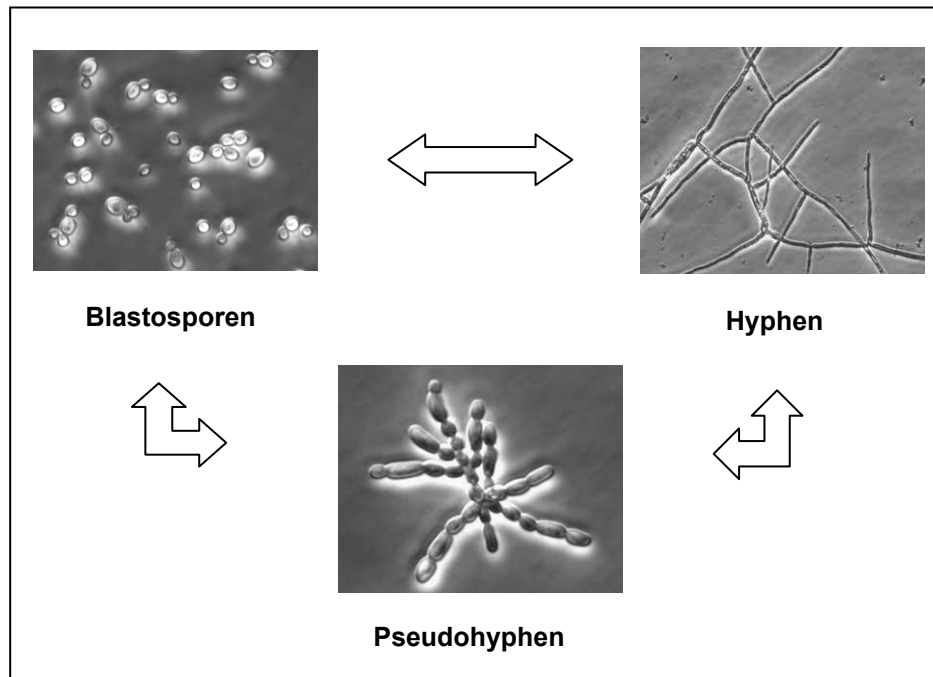


Abb. 01: Unterschiedliche Morphologien von *C. albicans*

C. albicans ist in der Lage, reversible morphogenetische Wachstumsübergänge zwischen Blastosporen, Pseudohyphen und Hyphen zu durchlaufen

Steuerung der Morphogenese:

S. cerevisiae ist mit *C. albicans* verwandt und wird dadurch oft als Modellorganismus herangezogen, um zelluläre Vorgänge bei *C. albicans* zu untersuchen. Da *S. cerevisiae* ebenfalls Pseudohyphen ausbilden kann (Gimeno et al. 1992), ermöglichte dies eine Identifizierung konservierter Signalwege durch die Entdeckung homologer Proteine, die auch in *C. albicans* am Wechsel der Morphologie beteiligt sind. In *C. albicans* regulieren mehrere parallel verlaufende Signalwege die Morphogenese.

Wichtig für die Hyphenbildung in *C. albicans* ist der cAMP-abhängige Protein-Kinase A-Signalweg (cAMP/PKA) (Sabie and Gadd 1992). Dieser wird in Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert. Die Protein-Kinase A in *C. albicans* besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten Tpk1p und Tpk2p (Bockmuhl et al. 2001, Cloutier et al. 2003, Sonneborn et al. 2000). Beide Untereinheiten regulieren u. a. den Transkriptionsfaktor Efg1p, der ein konserviertes basisches „Helix-Loop-Helix“-Motiv aufweist. Dieser bindet als Dimer an DNA und reguliert somit die Genexpression (Stoldt et al. 1997). Efg1p ist an morphologischen Prozessen in der Zelle beteiligt und spielt eine zentrale Rolle bei der Morphologie (Doedt et al. 2004). Er wirkt als transkriptioneller Aktivator und Repressor für viele Gene, die bei der Morphogenese benötigt werden. Viele für Zellwandkomponenten kodierende Gene

wie *HWP1*, *HYR1* oder *ALS1* werden durch Efg1p reguliert (Bailey et al. 1996, Braun and Johnson 2000, Fu et al. 2002, Sharkey et al. 1999). Eine Deletion von *EFG1* führt zur Veränderung der Zellwandzusammensetzung in Blastosporen sowie Hyphen (Korting et al. 2003, Lo et al. 1997, Sohn et al. 2003).

Die Phosphodiesterase Pde2p wird benötigt, um den cAMP Gehalt der Zelle zu regulieren. Die Deletion des Gens bewirkt eine ständige Aktivierung des PKA-Signalwegs und führt zu einer verstärkten Sensitivität des Stammes gegenüber Zellwand-schädigenden Agenzien sowie zu einer Reduzierung der Zellwanddicke durch Veränderung der Ergosterol- und Glucanzusammensetzung (Jung et al. 2005). Zusätzlich spielt eine MAPK („Mitogen Activated Protein Kinase“) - Kaskade eine Rolle bei der Signalweiterleitung zur Hyphenbildung. Die MAPK Cek1p reguliert durch den Transkriptionsfaktor Cph1p den Übergang von Blastosporen zu Hyphen (Kohler and Fink 1996, Leberer et al. 1996, Liu et al. 1994, Malathi et al. 1994).

Cek1p wird auch bei bestimmten Mutanten des *HOG1* MAPK-Signalwegs aktiviert, vermutlich um Defekte im Aufbau der Zellwand zu kompensieren (Roman et al. 2005). Der *HOG* MAPK-Signalweg ist für die Reaktion des Organismus auf osmotischen und oxidativen Stress verantwortlich. Beim Homolog in *S. cerevisiae*, *ScHOG* MAPK, kommt es bei osmotischem oder oxidativem Stress zu einer Aktivierung von Zellmembran-gebundenen Rezeptorproteinen (*ScSho1p* und *ScMsb2p*), die die umgebende Osmolarität wahrnehmen (Cullen et al. 2004, Hohmann 2002). Auch in *C. albicans* ist *Sho1p* als Adapter Protein beschrieben worden, das als Sensor oberhalb des *HOG* MAPK-Signalwegs fungiert und ist ebenfalls essentiell für die Aktivierung der *CEK1*-MAPK. *Sho1p* spielt somit eine Rolle bei der Adaption an oxidativen Stress sowie bei der Morphogenese (Roman et al. 2005). Das Mucin *Msb2* wird als möglicher Sensor von Zellwandschäden beschrieben, das für die Phosphorylierung von *Cek1p* als Antwort auf Zellwandstress benötigt wird (Roman et al. 2009).

Der Protein-Kinase A und der *Cek1p*-vermittelte MAP-Kinase-Signalweg wirken parallel und tragen gemeinsam zur Hyphenbildung und der Virulenz bei (Lo et al. 1997).

Beide Signalwege werden durch das G-Protein *Ras1p* aktiviert und reguliert (Leberer et al. 2001). *Ras1p* wirkt damit als ein Regulator des hyphalen Wachstums: eine dominant-negative *Ras1*-Mutation [*Ras1*(A16)] führt zu Defekten bei der Filamentbildung während eine dominant-aktive Mutation [*Ras1*(V13)] die Bildung von

Hyphen verstärkt (Feng et al. 1999).

Es gibt noch weitere Signaltransduktionswege, die für einen Morphologiewechsel von Bedeutung sind: der Transkriptionsfaktor Tec1p reguliert die hyphale Entwicklung (Schweizer et al. 2000). Die Transkription von *TEC1* wird durch Cph2p und Efg1p reguliert. Tup1p, Nrg1p und Rfg1p hingegen wirken als Repressoren der Hyphenentwicklung in *C. albicans* (Braun et al. 2001, Garcia-Sanchez et al. 2005, Murad et al. 2001a, Murad et al. 2001b).

Der Transkriptionsfaktor Rim101p ist für die Regulation pH-Wert-abhängiger Gene verantwortlich. Der pH-Wert der Umgebung beeinflusst sehr stark die Morphologie von *C. albicans*. Bei saurem pH dominiert hauptsächlich die Form von Blastosporen, neutraler pH induziert Hyphenbildung (Davis et al. 2000).

Abb. 02 zeigt einen Überblick über die unterschiedlichen Morphologie-beeinflussenden Signaltransduktionswege in *C. albicans*.

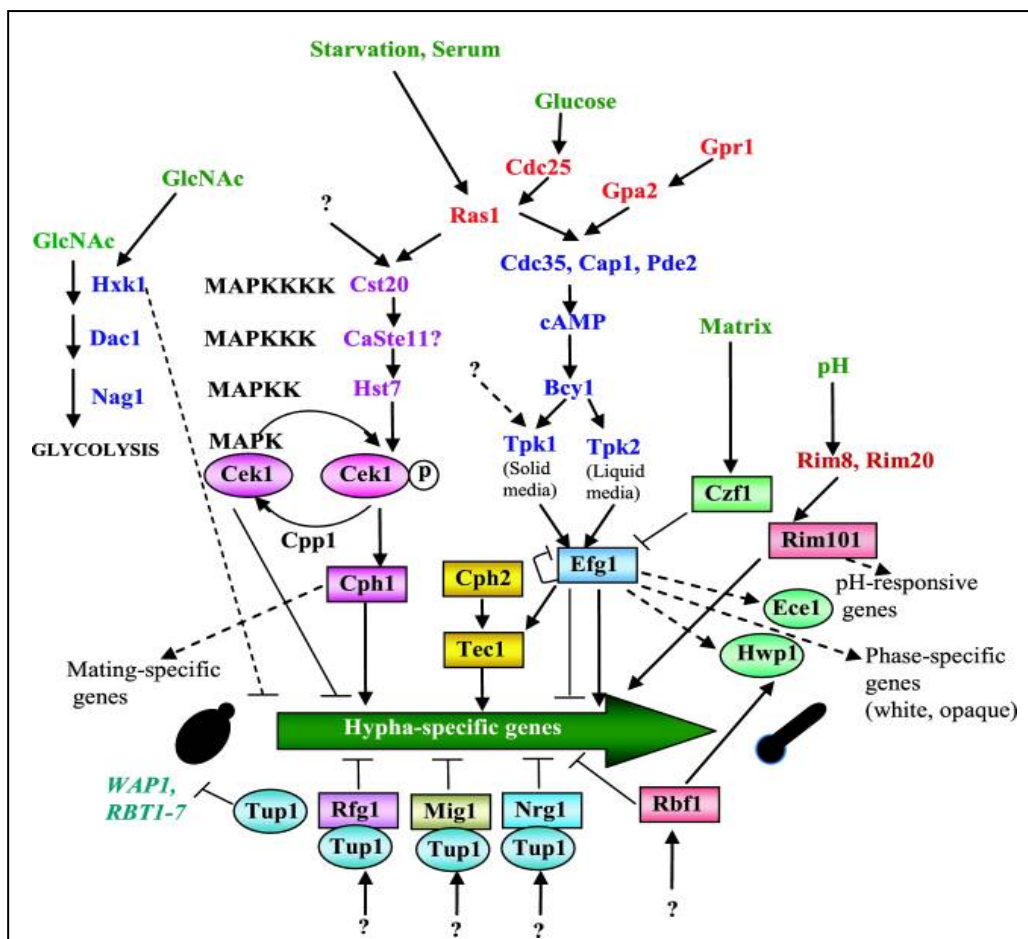


Abb.02: Regulation des Dimorphismus in *C. albicans*

Pfeile deuten eine Aktivierung an, Striche eine Inhibierung.

Quelle: (Biswas et al. 2007)

3.2 Wachstumsverhalten und Quorum sensing

Werden *C. albicans* Zellen in geringer Zellzahl in frisches Medium transferiert, so verläuft das Wachstum der Zellen stets nach dem gleichen Muster und kann in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: die lag-Phase, Phase des exponentiellen Wachstums, eine Verlangsamung des Wachstums und die stationäre Phase.

In der lag-Phase findet kein Wachstum der Zellen statt. Die Zellen müssen sich erst an die Umgebung adaptieren. Während des exponentiellen Wachstums kommt es zu einer schnellstmöglichen Zellvermehrung aufgrund des hohen Nährstoffangebotes und der Tatsache, dass Abfallstoffe genügend im Medium verdünnt werden. Mit steigender Zellzahl beginnt sich das Wachstum der Zellen zu verlangsamen, da Nährstoffe stetig aufgebraucht werden und sich Abfallstoffe im Medium immer mehr ansammeln. Dies führt letztendlich zur stationären Phase, in der kein Zellwachstum mehr stattfindet, die in die Absterbephase übergeht.

C. albicans Zellen sind in der Lage, die Zelldichte der umliegenden Population chemisch zu messen, was als Quorum sensing bezeichnet wird (Hornby et al. 2001). *C. albicans* war der erste eukaryotische Organismus, bei dem Quorum sensing beschrieben wurde (Alem et al. 2006). Es wird durch kleine Signalmoleküle vermittelt, die sich in der extrazellulären Umgebung ansammeln. Zu bekannten Quorum sensing Molekülen (QSM) von *C. albicans* zählen Farnesol und Tyrosol. Dodecanol ist eine zu Farnesol ähnliche Substanz. Wenn sich durch Wachstum der Zellen die Zellzahl erhöht, so erhöht sich auch die Anzahl der abgegebenen Signalmoleküle. Sobald ein bestimmter Grenzwert erreicht ist, induziert die An- oder Abwesenheit dieser Moleküle ein bestimmtes Wachstumsverhalten in der Zellpopulation. Dazu gehört unter anderem die so genannte lag-Phase, wenn Zellen in frischem Medium verdünnt werden. Je höher hierbei der Verdünnungsfaktor ist, desto länger brauchen die Zellen, bis sie exponentielles Wachstum initiieren können. Die lag-Phase ist darauf zurückzuführen, dass autostimulierende Substanzen benötigt werden, die von den Zellen während des Wachstums ins Medium abgegeben werden (Chen et al. 2004). Bei einer Verdünnung der Zellen in frischem Medium fällt diese Konzentration unter einen kritischen Wert, der erst durch Proliferation der Zellen wieder überschritten werden muss (Chen et al. 2004). Werden Zellen in konditioniertes Medium (sterilfiltriertes Medium einer

Übernachtskultur) gegeben, so ist der Effekt der lag-Phase aufgehoben und die Zellen beginnen sofort mit dem exponentiellen Wachstum. Die aktive Substanz hierbei wurde als Tyrosol identifiziert, das während des Wachstums der Zellen ständig in das Medium abgegeben wird (Chen et al. 2004). Bei *C. albicans* treten mehrere Zelldichte-abhängige Phänomene auf: zum einen die bereits beschriebene Verzögerung des Wachstums bis zur Aufnahme des exponentiellen Wachstums (lag-Phase), zum anderen kontrolliert die Zelldichte ebenfalls den morphogenetischen Wechsel zwischen Blastosporen-Morphologie und der filamentösen Hyphenform des Pilzes. Bei hoher Zelldichte dominiert das Wachstum als Blastosporen, bei niedriger Zelldichte kommt es bevorzugt zur Ausbildung von Keimschläuchen (Hornby et al. 2001, Odds 1988). Farnesol wurde als Quorum sensing Molekül beschrieben, das den morphologischen Übergang von der Hefe zur Hyphenform bei hohen Zelldichten blockiert (Hornby et al. 2001, Oh et al. 2001). Tyrosol hingegen beschleunigt die Hyphenbildung. Die Morphogenese in *C. albicans* unterliegt demnach einer komplexen positiven und negativen Kontrolle durch Tyrosol und Farnesol (Chen et al. 2004).

3.3 *C. albicans* als Humanpathogen

C. albicans wird sehr selten in ökologischen Nischen wie im Boden oder auf Pflanzenmaterial gefunden. Stattdessen ist der Pilz fast ausschließlich mit warmblütigen Tieren assoziiert. Dort lebt er als opportunistischer, kommensalischer Organismus hauptsächlich auf Haut und Schleimhäuten, vor allem im urogenitalen und gastrointestinalen Trakt (Hube 2004). Nahezu 70% der gesunden menschlichen Bevölkerung trägt diesen Organismus in sich (Calderone 2002). Solange das Immunsystem des Wirtes funktionsfähig ist, hat er keinerlei Schädigung. Sobald aber eine Änderung im Immunstatus oder der Mikroflora des Wirtes auftritt, kann dies zu einer Infektion, der sogenannten Candidose führen.

3.3.1 Prävalenz von Candidosen

Von den insgesamt 150 *Candida*-Arten werden nur etwa zehn als humanpathogen beschrieben. Diese sind jedoch die häufigste Ursache für systemische

Pilzinfektionen beim Menschen. In über 50% aller Fälle ist dabei *C. albicans* der Erreger. *C. albicans* ist für 10% aller Fälle nosokomialer Infektionen verantwortlich und ist damit der wichtigste humanpathogene Pilz überhaupt (Beck-Sague and Jarvis 1993).

Oberflächliche Infektionen der Haut und Schleimhäute sind die häufigsten Formen der Candidose. Durch Invasion in das Gewebe und somit in den Blutstrom kann es aber auch zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen kommen. Meist werden dabei innere Organe wie Leber, Nieren und Gehirn geschädigt (Berman and Sudbery 2002). Besonders gefährdet sind Menschen, deren Immunsystem durch Chemotherapie, Langzeitbehandlung mit Antibiotika oder virale Infektionen stark geschwächt ist. Ebenfalls existieren mehrere prädisponierende Faktoren wie Verbrennungen, Traumata, Diabetes mellitus, hohes Alter oder Vitaminmangel. Eine Infektion kann auch durch ärztliche Behandlung ausgelöst werden, z.B. durch den Einsatz von medizinischen Geräten wie künstliche Beatmungsschläuche und intravenöse Katheter (Odds 1988). Diese erhöhen das Risiko einer Infektion um mehr als das dreifache, da durch mögliche Verunreinigungen der Erreger direkt in den Organismus gelangen kann (Beck-Sague and Jarvis 1993).

3.3.2 Therapie

Als Eukaryont besitzt *C. albicans* viele biologische Prozesse, die denen des Menschen sehr ähnlich sind. Wegen deshalb häufig auftretender Nebenwirkungen von Medikamenten muss die Dosis meist gering gehalten werden, was aber wiederum zu einer eher fungistatischen statt fungiziden Wirkung der Medikamente führt (Berman and Sudbery 2002). Die Ergosterol-Biosynthese ist spezifisch für Pilze und für deren Wachstum unerlässlich. Die meisten heute erhältlichen Medikamente greifen deshalb in diesen Syntheseweg ein.

Polyene gehören einer Klasse von natürlichen antifungalen Verbindungen an. Sie binden mit hoher Affinität an das Ergosterol in der Pilzmembran. Dadurch wird die Membran destabilisiert und der Pilz abgetötet. Eines der erfolgreichsten Polyene, das Amphotericin B, wird von *Streptomyces nodosus* produziert (Gallis et al. 1990). Es wird primär bei der Behandlung von systemischen Candidosen eingesetzt.

Echinocandine sind ebenfalls natürlich vorkommende, antifungale Wirkstoffe, die als nicht-kompetitive Inhibitoren der β -1,3-Glucan-Synthase fungieren (Walker et al.

2010). Dieses Enzym ist an der Synthese der Glucanpolymere der Zellwand beteiligt. Zu den Echinocandinen zählt unter anderem das Derivat Caspofungin.

Eine weitere Gruppe antifungaler Medikamente bilden die synthetischen Verbindungen der Azole. Hierzu zählen Imidazole wie Ketoconazol sowie die Triazole Fluconazol und Itraconazol. Sie alle blockieren ein Schlüsselenzym im Biosyntheseweg des Ergosterols, die Sterol-14 α -Demethylase, ein Cytochrom-P450 Enzym (MacCallum et al. 2010).

In den letzten Jahren haben sich in zunehmenden Maße Resistenzen gegen die bisher erhältlichen Medikamente ausgebreitet (Boschman et al. 1998, Denning 1995, Johnson et al. 1995, Siegman-Igra and Rabaw 1992, Smith et al. 1991). Gerade deshalb ist die Erforschung zellulärer Vorgänge von *C. albicans* so wichtig, um neue Ansatzpunkte im Kampf gegen dieses Humanpathogen zu finden.

3.3.3 Virulenzfaktoren

Nur wenige der 150 bekannten *Candida*-Arten gelten als pathogen. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Tatsache, dass nur etwa 35% von ihnen in der Lage sind bei 37°C Körpertemperatur zu wachsen (Schauer and Hanschke 1999).

Die Pathogenität von *C. albicans* beruht zum einen auf seiner Anpassungsfähigkeit die verschiedensten Habitate des menschlichen Körpers zu besiedeln und dort erfolgreich unter den physiologisch unterschiedlichsten Bedingungen zu überleben. Zum anderen ist das Pathogen mit einer Reihe von Virulenzfaktoren ausgestattet. Dazu gehört die Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen. Dies wird durch bestimmte Zelloberflächenproteine, den sogenannten Adhäsinen vermittelt (Chaffin et al. 1998, Hostetter 1994). Auch die Sekretion von hydrolytischen Enzymen (Proteinasen, Phospholipasen, Lipasen) trägt zur Virulenz bei. Durch deren Sekretion werden die Zellmembranen des Wirtes zerstört und die *Candida*-Zellen können in das Wirtsgewebe eindringen (Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Letztendlich ist auch die Fähigkeit von *C. albicans*, die Morphologie zwischen Blastosporen und Hyphen zu wechseln (Dimorphismus) ein entscheidendes Kriterium, das zur Virulenz des Organismus beiträgt (Cutler 1991, Lo et al. 1997). Die filamentösen Hyphen zeigen eine viel effizientere Adhärenz an das Wirtsgewebe als die ovalen Blastosporen (Odds 1988) und können auch viel effektiver in das Wirtsgewebe einwachsen (Gow et al. 2002). Ebenfalls können von Makrophagen

phagozytierte Hefezellen durch die Ausbildung von Hyphen die Immunzellen lysieren und somit ihrer Zerstörung entgehen (Kaposzta et al. 1999). *C. albicans*-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, Hyphen auszubilden, erwiesen sich im Mausmodell als avirulent.

Die Zellwand von *C. albicans* nimmt bei der Virulenz des Pathogens eine besondere Stellung ein, ist sie doch die äußerste Struktur des Organismus und somit für den Kontakt zur Umgebung entscheidend.

3.4 Zellwandaufbau von *C. albicans*

Die Zellwand von *C. albicans* ist eine für den Pilz essentielle Struktur, die den Zellen ihre charakteristische Form gibt und sie vor Lyse schützt. Sie macht in etwa 15 - 30% des Gesamt-Trockenzellgewichts aus. Die Zellwand besteht im Wesentlichen aus folgenden Bestandteilen: β -Glucan (50 - 60%), Chitin (0,6 - 9%), Mannosepolymere (Mannoproteine 6 - 25%) und Lipide (1 - 7%). Glucane sind Glukosepolymere, die entweder β -1,3- oder β -1,6-verknüpft sind.

Die Zellwand ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Die innerste Schicht bilden Chitinfibrillen, die mit β -1,3-Glucanketten verknüpft sind. Dies verleiht der Zellwand ihre Stärke. Ketten von stark verzweigten β -1,6-Glucanen bilden die Verbindung zwischen β -1,3-Glucan, Chitin und Proteinen. Die äußerste Schicht besteht hauptsächlich aus Mannoproteinen. Diese Zellwandproteine sind normalerweise stark durch Mannose-haltige Polysaccharide O- oder N-glykosyliert (Chaffin 2008, Chaffin et al. 1998). Zellwandproteine können in zwei Gruppen unterteilt werden: entweder sind sie kovalent an das Glucanetz gebunden oder nicht-kovalent in der Zellwand eingebunden (lösliche Zellwandproteine). Kovalent-gebundene Zellwandproteine (GPI- und PIR-Proteine) sind fest mit dem Zuckergerüst verankert und lassen sich nur durch die Zugabe von Enzymen oder chemischen Agenzien vom Zellwandgerüst ablösen. Lösliche Zellwandproteine sind durch schwache Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrücken, ionische Wechselwirkungen und hydrophobe Kräfte an die Zellwand gebunden. Sie können durch Zugabe von Detergenzien leicht extrahiert werden (Chaffin et al. 1998, Urban et al. 2003).

Abb. 03 zeigt eine schematische Darstellung der Zellwand von *C. albicans*.

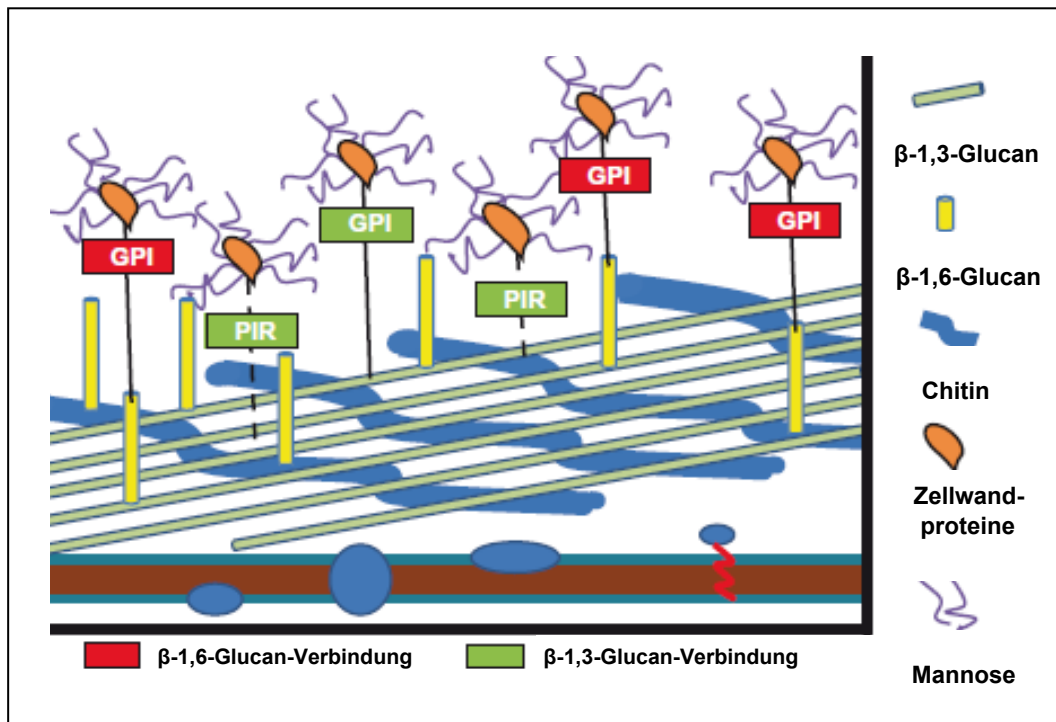


Abb. 03: Schematische Darstellung der Zellwand

Nur die Hauptkomponenten der Zellwand sind gezeigt. β -1,3-Glucan und Chitin sind die strukturgebenden Komponenten und bilden die innerste Schicht. Die äussere Schicht besteht aus Zellwandproteinen, die kovalent an das Glucanetz gebunden oder nicht-kovalent mit der Zellwand assoziiert sein können. Lösliche Proteine sind in der Abbildung nicht eingezeichnet.

Quelle: verändert nach (Arana et al. 2009)

Die Zellwand ist nicht starr sondern elastisch und unterliegt einem fortwährenden Umbau, da sich der Organismus an ständig wechselnde physiologische Umgebungen anpassen muss. Dies trifft auch auf die Zusammensetzung der Zellwandbestandteile, besonders der unterschiedlichen Proteine zu. Zellwandproteine bilden die äussersten Komponenten des Organismus und treten somit in direkten Kontakt mit der Umgebung. Sie bilden ebenfalls eine mögliche Kontaktstelle zu Wirtszellen, indem sie die Adhäsion und Invasion des Pathogens vermitteln. Das Immunsystem kann insbesondere die Kohlehydratstrukturen der Zellwand erkennen. Zellwandbestandteile von *C. albicans* sind somit ein entscheidend zur Pathogenität des Organismus beitragender Teil (Chaffin 2008, Chaffin et al. 1998).

3.5 Erkennung von *C. albicans* durch den Wirt

Zellwandbestandteile stellen als externe Komponenten von *C. albicans* antigene Strukturen dar, welche von Immunzellen des Wirtes erkannt werden können.

Der erste Schritt zum Aufbau einer schützenden Immunantwort ist die Erkennung der *Candida*-Zellen durch Zelloberflächenrezeptoren von Immunzellen. Es kommt zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege und zur Stimulierung von entzündungsvermittelnden Substanzen (Janeway and Medzhitov 2002, Medzhitov 2007). Daraufhin werden Cytokine ausgeschüttet, was wiederum zur Einwanderung von Immunzellen an der Eintrittsstelle der *Candida*-Zellen führt. Weitere Mechanismen, wie die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten bzw. Makrophagen oder die Initiierung der adaptiven Immunantwort durch T-Helferzellen resultieren daraus (Netea and Marodi 2010).

Zu den wichtigsten Immunzellen der angeborenen Immunabwehr gehören Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen. Diese Zellen gehören zu den phagozytierenden Zellen des Immunsystems: nach Erkennung von antigenen Strukturen werden Pathogene durch Phagozytose aufgenommen und in Phagolysosomen transportiert. In diesen werden eine ganze Reihe von Enzymen wie Lipasen, Amylasen, Proteasen und Nukleasen sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgeschüttet, um die Pathogene abzutöten (Newman and Holly 2001). Phagozyten bilden ROS durch die Aktivität des NADPH Oxidase Komplexes, indem Elektronen von NADPH auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, um Superoxid zu produzieren (Wellington et al. 2009).

Die so genannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) auf der Oberfläche von Phagozyten erkennen bestimmte Zellwandbestandteile von *C. albicans*, darunter Mannan und Mannoproteine (Gazi and Martinez-Pomares 2009, Marodi et al. 1991), Chitin und β -Glucan (Gantner et al. 2003, Reid et al. 2009). Die antigenen Strukturen auf der Pilzzellwand werden „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) genannt und umfassen Oberflächendeterminanten, die in Säugetierzellen nicht existieren (Underhill 2004, Underhill and Ozinsky 2002).

Dabei sind verschiedene PRRs in der Lage, unterschiedliche PAMPs zu erkennen (Underhill 2003). Es existieren mehrere Familien von PRRs, darunter die „Toll-like Receptors“ (TLRs) und die „C-type Lectin Receptors“ (CLRs). TLRs sind entweder

mit der Membran assoziierte oder intrazelluläre Rezeptoren. Sie sind in der Lage, verschiedene PAMPs von *C. albicans* zu erkennen: TLR2 erkennt Phospholipomannan der *Candida*-Zellwand, TLR4 O-verlinkte Mannane und TLR9 pilzspezifische DNA (Jouault et al. 2003, Miyazato et al. 2009, Tada et al. 2002). Die CLRs sind hauptsächlich Membran-gebundene Rezeptoren, die neben Mannan durch Dectin-2 und den Mannoserezeptor auch Polysaccharidverbindungen der *Candida*-Zellwand erkennen können (Ezekowitz et al. 1990, McGreal et al. 2006). Der Transmembranrezeptor Dectin-1 und der Complement Rezeptor 3 (CR3) erkennen spezifisch das β -1,3-Glucan der Zellwand (Brown 2006).

3.6 Mechanismen der Proteinsekretion

Zellwandproteine und sekretierte Proteine weisen normalerweise eine N-terminale Signalsequenz auf, durch die sie in das Endoplasmatische Retikulum (ER) gelangen. Dort wird die Signalsequenz abgespalten und die Proteine werden zum Teil posttranslational, z.B. durch Glykosylierung modifiziert. Vom ER werden sie in Golgi-Vesikel verladen, um dann weiter zur Zelloberfläche transportiert zu werden. Dieser Vorgang wird als klassischer Proteinsekretionsweg bezeichnet (Rothman and Wieland 1996, Walter et al. 1984).

Seit den letzten 20 Jahren werden aber immer mehr Proteine an der Oberfläche von Zellen gefunden, die keine N-terminale Signalsequenz aufweisen. Diese können demnach nicht in das ER gelangen, und damit nicht in den klassischen Sekretionsweg eintreten. Man geht davon aus, dass solche Proteine unabhängig vom klassischen ER/Golgi-Sekretionsweg an die Zelloberfläche gelangen (Nickel 2003). Inhibitoren des Sekretionsweges wie Brefeldin-A (BFA) haben keinen Einfluß auf deren Sekretion. BFA inhibiert die Aktivierung von ARF1 („ADP-ribosylation factor 1“) auf Golgi-Membranen und blockiert dadurch den vesikulären Transport durch Golgi-Vesikel (Lippincott-Schwartz et al. 1989, Orci et al. 1991). Dies macht es Proteinen, die den klassischen Sekretionsweg durchlaufen unmöglich, die Zelloberfläche zu erreichen, was auf die Existenz nicht-klassischer Mechanismen der Proteinsekretion hindeutet, die parallel zur klassischen Sekretion verlaufen.

Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, aber keine N-terminale Signalsequenz aufweisen, finden sich bei Säugerzellen, Bakterien, niederen

Eukaryonten und Protozoen. Die Sekretion von Proteinen auf nicht-klassische Weise ist demnach ein weit verbreitetes Phänomen, das bis heute noch nicht gut erforscht ist (Nombela et al. 2006).

In *C. albicans* wurden bisher 37 solcher Proteine identifiziert, für *S. cerevisiae* wurden 16 beschrieben (Nombela et al. 2006). Meist handelt es sich um nicht-kovalent gebundene Proteine, die mittels Detergenzien aus der Zellwand extrahiert werden konnten. Viele dieser Proteine werden im Cytoplasma gefunden, wo sie oft eine bekannte Funktion haben. Über ihre Funktion an der Zelloberfläche ist meist nicht viel bekannt (Pitarch et al. 2002, Urban et al. 2003). Verschiedene Nachweise wurden bereits erbracht, dass es sich bei den an der Oberfläche gefundenen Proteinen mit einer bekannten cytosolischen Funktion nicht um Artefakte oder Kontaminationen handelt (Nickel 2003, Urban et al. 2003).

Mindestens vier verschiedene Transportwege der nicht-klassischen Proteinsekretion können unterschieden werden, welche entweder vesikulär oder nicht-vesikulär ablaufen (Nickel and Rabouille 2009, Nickel and Seedorf 2008). In Abb. 04 sind mögliche Mechanismen und Transportwege für Proteine dargestellt, die die Zelloberfläche auf nicht-klassische Weise erreichen.

Nicht-vesikuläre Mechanismen basieren auf einer direkten Translokation der Proteine durch die Plasmamembran. Für die „Fibroblast Growth Factors“ FGF-1 und FGF-2 verläuft der Transport möglicherweise direkt über die Plasmamembran, indem sie durch spezielle Transporter den extrazellulären Raum erreichen (Nickel 2003). In *S. cerevisiae* wird das Peptidpheromon α -Faktor durch den ABC-Transporter Ste6p transportiert, der nur für den Transport dieses Peptids verantwortlich ist. Das Ortholog in *C. albicans* ist Hst6p (Magee et al. 2002). Das *Leishmania* Protein HASPB überquert ebenfalls direkt die Plasmamembran vermutlich mittels eines flip-flop Mechanismus (Nickel 2003).

Vesikuläre Mechanismen sind abhängig von intrazellulären, membrangebundenen Faktoren, die mit der Plasmamembran verschmelzen, um ihre Ladung in den extrazellulären Raum zu entlassen. IL-1 β wird in intrazelluläre Vesikel, vermutlich endosomale Subkompartimente transportiert, welche dann mit der Plasmamembran verschmelzen. Eine weitere Möglichkeit, die Membran zu überwinden ist die Bildung von Exosomen, die sich an der Oberfläche der Zellen bilden können. Exosomen sind sehr labile Strukturen, die ihren Inhalt in den extrazellulären Raum entlassen. Dieser Vorgang wird als „membrane blebbing“ bezeichnet und ist der mögliche

Transportweg der Galectine (Nickel 2003).

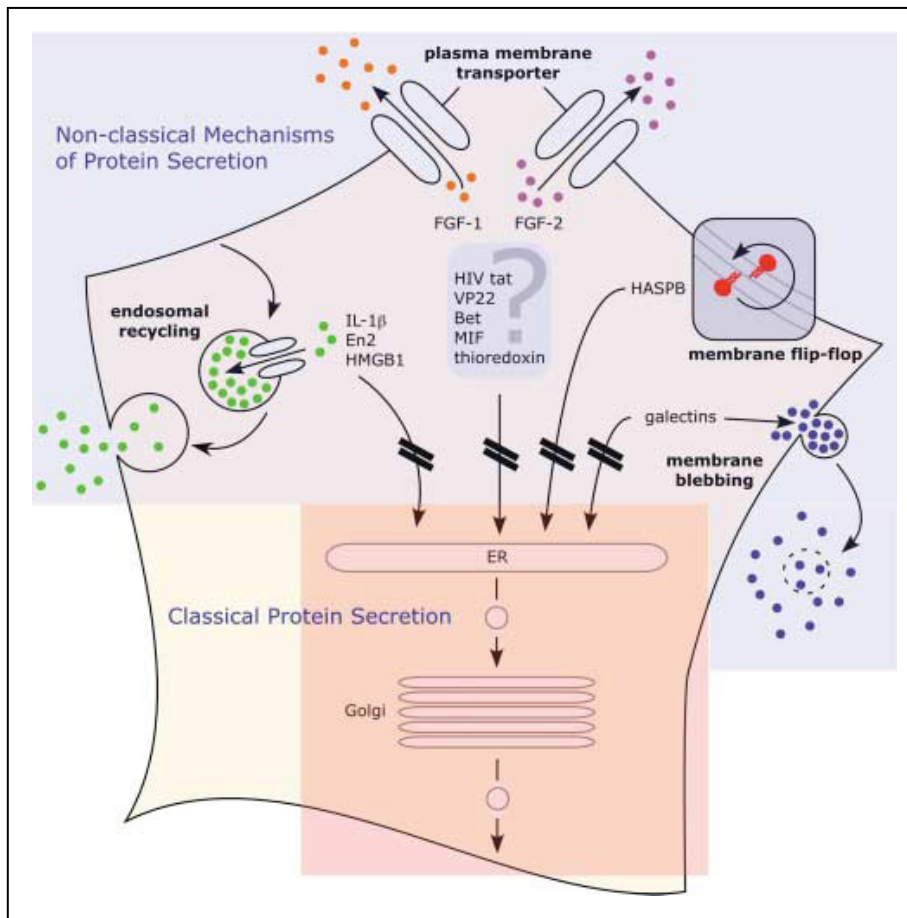


Abb. 04: Mögliche Exportwege für nicht-klassisch sekretierte Proteine

Die klassische Proteinsekretion über den ER/Golgi-Weg ist in der roten Box im unteren Teil des Bildes dargestellt. Für den nicht-klassischen Proteintransport können mindestens vier verschiedene Arten eines möglichen Transportes unterschieden werden: Endosomenrecycling, Plasmamembrantransporter, Membran flip-flop Mechanismen oder „membran blebbing“ sind mögliche Transportwege für nicht-klassisch sekretierte Proteine. Für viele Proteine ist jedoch die genaue Weise der Translokation an die Zelloberfläche immer noch nicht bekannt.
 Quelle: (Nickel 2003)

3.7 Tsa1p – ein „moonlighting“ Protein in *C. albicans*

Das thiol-spezifische Antioxidant-ähnliche Protein Tsa1p („Thiol-specific antioxidant-like“) wurde als Detergenz-extrahierbares, lösliches Protein der Zellwand von *C. albicans* identifiziert. Es wurde als differentiell lokalisiertes Protein beschrieben: sowohl bei Blastosporen als auch bei Hyphen wurde Tsa1p im Nukleus und im Cytoplasma gefunden, jedoch nur bei Hyphen konnte Tsa1p auch an der Zellwand nachgewiesen werden (Urban et al. 2003). Tsa1p besitzt keine N-terminale Signalsequenz, die es dem Protein ermöglichen würde, in den klassischen, ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg einzutreten. Der Mechanismus der Tsa1p-

Lokalisation an die Zellwand ist bis heute unklar. Proteine, die in mehreren Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind und dort unterschiedliche Funktionen wahrnehmen, werden als „moonlighting“ Proteine bezeichnet (Jeffery 1999). Für viele dieser „moonlighting“ Proteine wird eine Sekretion auf nicht-klassische Weise vorgeschlagen, da den meisten ein Signalpeptid für den Eintritt in das ER fehlt.

Tsa1p gehört zu der Familie der Tsa/AhpC-Proteine. Tsa1p weist dabei große Homologien zu Thioredoxin Peroxidasen (Tpx) bzw. Peroxiredoxinen (Prx) auf. TSA-ähnliche Proteine sind in vielen Organismen verbreitet. In *S. cerevisiae* hat ScTsa1p verschiedene Funktionen im Cytosol der Zelle, darunter der Schutz vor oxidativem Stress und Hitzeschock, sowie die Aufrechterhaltung der Genomstabilität (Jang et al. 2004, Ross et al. 2000, Wong et al. 2004). ScTsa1p ist zu 76% identisch und zu 88% homolog zu Tsa1p in *C. albicans*. In *S. cerevisiae* existiert ein zweites Homolog, ScTsa2p, das jedoch nicht in *C. albicans* vorkommt. In *C. albicans* besitzt Tsa1p ebenfalls Peroxidase Aktivität und wirkt dabei als Antioxidant wie die Proteine der TSA1/AhpC Familie anderer Arten (Shin et al. 2005, Urban et al. 2005). Tsa1p übernimmt hier aber keine Funktion bei der Resistenzvermittlung gegen Hitzeschock. Tsa1p in *C. albicans* ist ebenfalls an der Stabilisierung des Genoms beteiligt und wird zusätzlich für den korrekten Zellwandaufbau bei Hyphen benötigt (Urban et al. 2005). Tsa1p Homologe in *C. neoformans* und *E. histolytica* wurden bereits als Virulenzfaktoren beschrieben (Choi et al. 2005, Missall et al. 2004). Die Funktionen von Tsa1p und seinen Homologen beschränkt sich demnach nicht nur auf eine reine Funktion beim Schutz gegen oxidativen Stress.

Tsa1p ist ein hoch abundantes Protein in *C. albicans*. Es existieren zwei Allele von TSA1 im *Candida*-Genom, die in entgegengesetzter Orientierung auf demselben Chromosom liegen. Alle vier Kopien sind dabei gleich funktionell (Shin et al. 2005). Für Reversionsstämme mit nur einer funktionellen Kopie wurden Gen-Dosis-Effekte beobachtet (Urban et al. 2005).

ScTsa1p und CaTsa1p gehören zu der Gruppe der 2-Cys Peroxiredoxinen, welche jeweils zwei hochkonservierte Cysteine besitzen. Bei *S. cerevisiae* liegen diese an Aminosäurepositionen 47 und 170, bei *C. albicans* an den Positionen 47 und 168. Dabei ist Cys47 stark konserviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion des Proteins als Antioxidant bei *S. cerevisiae* (Chae et al. 1994).

Unter oxidativem Stress wird die Thiolgruppe eines konservierten Cysteins zu Sulfonsäure oxidiert, welche weiter zu Sulfinssäure oxidieren kann. Die dadurch eingebrachte negative Ladung resultiert in einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes von 4.9 zu 4.7, wie in 2D SDS-PAGE beobachtet werden konnte (Biteau et al. 2003).

Tsa1p hat ein berechnetes Molekulargewicht von 24 kDa, jedoch kann das Protein in verschiedenen multimeren Formen auftreten. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass durch Oxidation der Cysteine intermolekulare Disulfidbrücken mit Cysteinen eines zweiten Tsa1p ausgebildet werden können. Dabei können sich verschiedene Kombinationsmöglichkeiten ergeben, die zu unterschiedlichen Größen im nicht-reduzierenden SDS-Gel führen (Chae et al. 1994). In *S. cerevisiae* kommt es bei Hitzeschock und oxidativem Stress zu einer reversiblen Ausbildung von multimeren Strukturen sowohl bei ScTsa1p als auch bei ScTsa2p (Jang et al. 2004).

3.8 Zielsetzung der Arbeit

Proteine mit bekannten cytosolischen Funktionen werden auch an der Zelloberfläche von *C. albicans* gefunden. Diese sogenannten „moonlighting“ Proteine besitzen oft keine N-terminale Signalsequenz, die einen Eintritt in den klassischen ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg ermöglicht. Durch welchen Mechanismus viele dieser Proteine an die Zelloberfläche gelangen, ist bis heute unklar. Dies trifft auch auf das Protein Tsa1p von *C. albicans* zu. Trotz fehlender Signalsequenz konnte dieses Protein an der Zellwand von Hyphen nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Sekretionsmechanismus von Tsa1p. Es sollten die molekularen Determinanten des Proteins identifiziert werden, die für die Zelloberflächenlokalisation verantwortlich sind, ebenso wie an der Lokalisation beteiligte Signalwege. Des Weiteren sollte geklärt werden, unter welchen Bedingungen das Protein an die Zelloberfläche lokalisiert und welche Funktion es an der Zellwand besitzt. Von besonderem Interesse war auch die Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges von Tsa1p-Oberflächenlokalisation und der Pathogenität des Organismus, da Tsa1p bisher nur bei Hyphen - die für eine effiziente Infektion notwendige Morphologieform des Pathogens - an der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert im Methodenteil aufgeführt, in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (München), Carl Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Schnelldorf), VWR (Darmstadt: Merck, Fluka, Riedel-de Haen). Generell wurde für die Herstellung von Pufferlösungen und Kulturmedien Wasser verwendet, das mittels einer Ionentauscher-Anlage der Firma Millipore, Schwalbach deionisiert wurde.

4.1.2 Radiochemikalien

Radioaktiv markiertes CTP, [α - 32 P]-CTP, wurde von der Firma Hartmann Analytic, Braunschweig bezogen.

4.1.3 Enzyme

Tab. 01: Enzyme

Enzym	Firma
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
rAPid Alkaline Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phusion-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin	Promega GmbH, Mannheim

4.1.4 Reaktionskits

Tab. 02: Reaktionskits

Name	Firma
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy [®] Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Dc Protein Assay Reagenzien	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
PRIME-IT [®] II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam
QuikChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam

4.1.5 Pufferlösungen

Allgemeine Puffer- und Stammlösungen wurden nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al. 1989, Ausubel et al. 1987). Spezielle Puffer und Lösungen sind gesondert im entsprechenden Methodenteil aufgeführt.

Tab. 03: Pufferlösungen

Puffer	Bestandteile	Konzentration
PBS-Puffer, pH 7.4	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
PBST-Puffer	PBS-Puffer	
	Tween 20	0,05%
TE-Puffer	Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM
TAE-Puffer (50x)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM
SSC-Puffer (20x), pH 7.0	NaCl	3 M
	Na-Citrat	300 mM

4.1.6 Kulturmedien

Medien wurden in zweifacher Konzentration angesetzt. Bei Verwendung als Flüssigmedium wurde mit H₂O auf einfache Konzentration verdünnt, bei Verwendung

als Festmedium mit 4% Agar in H₂O (Endkonzentration Agar: 20 g/l). Mit einer 40% -igen Glukoselösung wurde eine Gesamtkonzentration von 2 g/l Glukose im jeweiligen Medium eingestellt.

Bei Verwendung von Sc-Medium als Selektionsmedium für Hefen wurde Uracil für *Saccharomyces*-Stämme eingesetzt, für *Candida*-Stämme wurde Uridin verwendet.

Tab. 04: Allgemeine Kulturmedien für Hefen und Bakterien

Medium	Bestandteile	Konzentration
YPE-Medium	Hefeextrakt (Difco, Augsburg)	10 g/l
	(Bacto-) Pepton (Difco, Augsburg)	20 g/l
YPD-Medium	Vollmedium für Hefen	
	YPE-Medium	
α-MEM-Medium	Glukose	2 g/l
	Definiertes Zellkulturmedium mit L-Glutamin, Desoxyribo-/Ribo-Nukleotiden, ohne NaHCO ₃ (Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe)	10,17 g/l
	NaHCO ₃	2,2 g/l
	Glukose	2 g/l
RPMI-Medium	RPMI 1640 (Gibco)	
	FCS (Gibco)	10%
	Glutamin (Gibco)	2 mM
	Streptomycin/Penicillin (Gibco)	1%
YNB-Medium	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)	1,5 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
SC-Medium	Synthetisches Medium für Hefen	
	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)	1,5 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
	AS-Mix*	2 g/l
	Adenin	0,3 mM
	Uracil	0,2 mM
	Histidin	0,3 mM
	Leucin	1,6 mM
Tryptophan	0,4 mM	
SC –ura Medium	Selektionsmedium für Hefen ohne Uracil	
	Wie Sc-Medium, jedoch ohne Uracil	
LB-Medium	Vollmedium für Bakterien	
	Hefeextrakt	5 g/l
	Pepton	10 g/l
	NaCl	10 g/l

*: jeweils 10g Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val + 1 g PABA (Guthrie and Fink 2002)

Tab. 05: Medien mit Zusätzen

Medium	Zusätze	Konzentration
YPD-Medium	H ₂ O ₂	0,5 mM, 5 mM, 10 mM
	DTT	1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM
	β-Mercaptoethanol	5 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM
	(E,E)-Farnesol	50 μM, 300 μM
	1-Dodecanol	50 μM, 300 μM
	Tyrosol	50 μM, 300 μM
	Brefeldin-A	40 μM
YNB-Medium	Brefeldin-A	40 μM
α-MEM-Medium	Farnesol	300 μM
LB-Medium	Ampicillin	100 μg/ml

4.1.7 Oligonukleotide

Geeignete Oligonukleotide wurden mittels des Programms Primer3 ausgewählt und von der Firma Thermo Scientific HPLC-aufgereinigt bezogen. Lediglich die Oligonukleotide, welche für die Einbringung von Punktmutationen in *TSA1* zur Verwendung kamen, wurden von der Firma Operon bezogen; hierfür wurde als Aufreinigungsmethode die PAGE-Aufreinigung gewählt.

Tab. 06: Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz (5' – 3')
Tsa1_for_BamH1	<u>CGCGGATCC</u> ATGGCTCCAGTCGTTCAACA
Tsa1_rev_Xho1	CCGCTCGAGTTATTTGTTGACTTTGTTGAAGTATTCC

Unterstrichene Sequenzabschnitte kennzeichnen die Enzymschnittstellen

Tab. 07: Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz (5' – 3')
Seq1_F	GCTCTATTGCATTTTATTTCAATC
Seq1_R	AGCTTGTCTAAAATGCAATC
Seq2_F	AGACGGTGGTATTGGCAAAG
Seq2_R	CCTCTCAAGGCAACACCTTC
Seq3_for	GGAAATAGGCATGACGGAAA
Seq4_rev	TGGTTGTTGAACGACTGGAG
Seq5_rev	CCCGCCTAGACCACAATAAA
Seq6_for	TCATGCCGATACAAATGCAC
Seq_For1	CTTAATGCGCCGCTACAGG

Seq_Rev1	TTGATTGATCCAAAGGGTGTC
Seq_For2	TTGGAAAGCCTCCAACAATC
Seq_Rev2	AAAGGGAACAAAAGCTGGAG

Tab. 08: Oligonukleotide für Kolonie-PCR

Name	Sequenz (5' – 3')
Tsa1_Kolonie_for	CGTCGTTGATGGTGTCTTTG
Tsa1_Kolonie_rev	ATCACCTGGGTGCCAGTTAG
ScTSA1_for	GAACGAATTGCTGCTGATGA
ScTSA1_rev	GAGTCAGTGGAGGCGAAAAG
ScTSA2_for	TGTTGGTTGGTCATCCTCAA
ScTSA2_rev	ACCGTCTTTTCTGGGAAGGT
CaTSA1_for	GGCCTCTTCGCTATTACGC
CaTSA1_rev	TGATCCAAAGGGTGTCTTGA

Tab. 09: Oligonukleotide zur Einbringung von Punktmutationen

Name	Sequenz (5' – 3')
Tsa1_C47S_F	CATTGGCCTTCACATTTCGTCTCCCCATCAGAAATTATTGCTTATTC
Tsa1_C47S_R	GAATAAGCAATAATTTCTGATGGGGAGACGAATGTGAAGGCCAATG
Tsa1_C168S_F	CTGAAAAATACGGTGAAGTTTCTCCAGCTAACTGGCACCCAGG
Tsa1_C168S_R	CCTGGGTGCCAGTTAGCTGGAGAACTTCACCGTATTTTTTCAG
Tsa1_184AA_F	GAAACCATCAAGCCAAGCCAATAAGCATCCAAGGAATACTTCAAC
Tsa1_184AA_R	GTTGAAGTATTCCTTGGATGCTTATGGGCTTGGCTTGATGGTTTC

Tab. 10: Oligonukleotide für Southern Blot (SB) und Northern Blot (NB) Sonden

Name	Sequenz (5' – 3')
For1.2tsako_apa (SB+NB)	GCTCGGGCCATTAGATCCACATCTTCATTAC
Rev2.2.tsako_sac (SB+NB)	TCCCCGCGGATTGGTACGCAAAGGAACCA
Actin_for (NB)	CCATGTTCCCAGGTATTGCT
Actin_rev (NB)	TGAACAATGGATGGACCAGA

4.1.8 Plasmide und Vektoren

Tab. 11: Plasmide und Vektoren

Vektor, Plasmid	Referenz
pRS426-TEF	(Mumberg et al. 1995)
pRS426-TSA1	diese Arbeit
pUC18	(Yanisch-Perron et al. 1985)
pUC18-TSA1	diese Arbeit

pUC18-TSA1-C47S	diese Arbeit
pUC18-TSA1-C168S	diese Arbeit
pUC18-TSA1-C47/168S	diese Arbeit
pUC18-TSA1-AA184	diese Arbeit
pCaEXP	(Care et al. 1999)
pCaEXP-TSA1	(Urban et al. 2005)
pCaEXP-TSA1-C47S	diese Arbeit
pCaEXP-TSA1-C168S	diese Arbeit
pCaEXP-TSA1-C47/168S	diese Arbeit
pCaEXP-TSA1-AA184	diese Arbeit

4.1.9 Antikörper

Tab. 12: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Tsa1p Antikörper (AK-C) - gegen den C-Terminus gerichtet	(Urban et al. 2005)
Anti-Tsa1p Antikörper (AK-N) - gegen den N-Terminus gerichtet	diese Arbeit
Ziege-Anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat	Amersham
β -1,3-Glucan Antikörper	Biosupplies
Alexa Fluor488 Ziege-Anti-Maus IgG	Molecular Probes

4.1.10 *C. albicans* Stämme

Tab. 13: *C. albicans* Stämme

Stamm	Referenz -name	Genotyp	Referenz / Bezugsquelle
SC5314 (WT)		Klinisches Isolat	(Gillum et al. 1984)
Isolat No 9	Can437	Klinisches Isolat (oral)	Hautklinik Tübingen
Isolat No 8	Can440	Klinisches Isolat (oral)	Hautklinik Tübingen
Isolat No 13	Can439	Klinisches Isolat (vaginal)	Hautklinik Tübingen
Isolat No 7a	Can448	Klinisches Isolat (vaginal)	Hautklinik Tübingen
Isolat 4659	Can501	Klinisches Isolat (systemisch)	H. Bujdakova
Isolat 9783	Can503	Klinisches Isolat (systemisch)	H. Bujdakova
CAI4		<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Fonzi and Irwin 1993)
CAI4-URA3	Can100	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>rpn10::URA3</i>	N.Saunders
Vorstufe Δ tsa1	zu Can292	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i>	(Urban et al. 2005)

Δ tsa1	Can312	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::URA3</i>	(Urban et al. 2005)
Δ tsa1-TSA1	Can315	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-URA3</i>	(Urban et al. 2005)
TSA1-GFP	Can257 / TG6	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>TSA1/TSA1::GFP-URA3</i>	(Urban et al. 2003)
Δ tsa1-TSA1- C47S	Can629	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-C47S-URA3</i>	diese Arbeit
Δ tsa1-TSA1- C168S	Can630	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-C168S-URA3</i>	diese Arbeit
Δ tsa1-TSA1- C47/168S	Can631	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-C47/168S-URA3</i>	diese Arbeit
Δ tsa1-TSA1- AS184	Can632	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tsa1::FRT/tsa1::FRT</i> <i>rpn10::TSA1-AA184-URA3</i>	diese Arbeit
Ras1 (V13)	CQ52	<i>ade2::Mal1-RAS1V13-URA3</i> <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Feng et al. 1999)
Ras1 (A16)	CQ53	<i>ade2::Mal1-RAS1A16-URA3</i> <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Feng et al. 1999)
Δ pde2	WH 2-3U	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>pde2::hisG/pde2::hisG::URA3</i>	(Jung and Stateva 2003)
Δ tpk2	TPO7.4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>tpk2Δ::hisG/tpk2Δ::hisG-URA3-hisG</i>	(Sonneborn et al. 2000)
Δ efg1	HLC67	<i>ura3::1 imm434/ura3::1 imm434</i> <i>efg1::hisG/efg1::hisG-URA3-hisG</i>	(Lewis et al. 2002)
Δ cek1	CK43B- 16	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>cek1Δ::hisG-URA3-hisG/cek1Δ::hisG</i>	(Csank et al. 1998)
Δ hog1	CNC15	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i>	(Alonso-Monge et al. 1999)
Δ hog1-HOG1	CNC15- 10	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i> <i>his1Δ::hisG/his1Δ::hisG</i> <i>hog1::hisG/hog1::hisG</i> <i>LEU2/leu2::HOG1 URA3</i>	(Alonso-Monge et al. 1999)

Δ sho1	REP3	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i> <i>sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG</i>	(Roman et al. 2005)
Δ msb2	REP17	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG-URA3-hisG</i> <i>msb2::FRT/msb2::FRT</i>	(Roman et al. 2009)
Δ msb2-MSB2	REP15	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG-URA3-hisG</i> <i>MSB2/msb2_FRT</i>	(Roman et al. 2009)
Δ tec1	CaAS20	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>catec1Δ::hisG/catec1Δ::hisG</i> (pVEC-CaTEC1)	(Staib et al. 2004)
Δ tup1	BCa2-10	<i>tup1Δ::hisG/tup1Δ::hisG::p405-URA3</i> <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	(Braun and Johnson 1997)
Δ nrg1	MMC3	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>nrg1::hisG-URA3-hisG/nrg1::hisG</i>	(Murad et al. 2001b)
Δ chk1	CHK21	Δ <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> <i>cahk1::hisG/cahk1::hisG-URA3-hisG</i>	(Calera and Calderone 1999)
Δ yak1	CEC362	<i>yak1::HIS1/yak1::ARG4</i> <i>ura3::_imm434/ura3::_imm434</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i>	(Goyard et al. 2008)
Δ yak1-YAK1	CEC366	<i>yak1::HIS1/yak1::ARG4</i> <i>ura3::_imm434/ura3::_imm434</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i> <i>RPS10/RPS10::Clp10-URA3-YAK1</i>	(Goyard et al. 2008)
Δ sap9	M1018	Δ <i>ura3::imm434/ura3::imm434</i> ; <i>Delta sap9::hisG/Delta sap9::hisG-URA3-hisG</i>	(Albrecht et al. 2006)
Δ hst6	3696	<i>hst6/hst6 MTLa/a</i>	(Magee et al. 2002)
Δ hst6-HST6	3698	<i>hst6/hst6 pMK22/HST6 MTLa/a</i>	(Magee et al. 2002)

4.1.11 *S. cerevisiae* Stämme

Tab. 14: *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm	Referenz
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0</i>		(Winzeler et al. 1999)
<i>tsa1Δ</i>	<i>tsa1::KAN</i>	BY4741	(Winzeler et al. 1999)

<i>tsa2Δ</i>	<i>tsa2::LEU2</i>	BY4741	(Wong et al. 2002)
<i>tsa1Δ tsa2Δ</i>	<i>tsa1::KAN tsa2::LEU2</i>	BY4741	(Wong et al. 2002)
BY4741-pRS426	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0</i> -pRS426	BY4741	diese Arbeit
<i>tsa1Δ</i> -pRS426	<i>tsa1::KAN</i> -pRS426	<i>tsa1Δ</i>	diese Arbeit
<i>tsa2Δ</i> -pRS426	<i>tsa2::LEU2</i> -pRS426	<i>tsa2Δ</i>	diese Arbeit
<i>tsa1Δ tsa2Δ</i> -pRS426	<i>tsa1::KAN tsa2::LEU2</i> - pRS426	<i>tsa1Δ tsa2Δ</i>	diese Arbeit
BY4741- <i>CaTSA1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0</i> -pRS426- <i>CaTSA1</i>	BY4741	diese Arbeit
<i>tsa1Δ</i> - <i>CaTSA1</i>	<i>tsa1::KAN</i> -pRS426- <i>CaTSA1</i>	<i>tsa1Δ</i>	diese Arbeit
<i>tsa2Δ</i> - <i>CaTSA1</i>	<i>tsa2::LEU2</i> -pRS426- <i>CaTSA1</i>	<i>tsa2Δ</i>	diese Arbeit
<i>tsa1Δ tsa2Δ</i> - <i>CaTSA1</i>	<i>tsa1::KAN tsa2::LEU2</i> - pRS426- <i>CaTSA1</i>	<i>tsa1Δ tsa2Δ</i>	diese Arbeit

4.1.12 Bakterienstämme

Für Transformationen wurde, sofern nicht anders vermerkt, der Bakterienstamm *E. coli* DH5α verwendet, welcher von der Firma Invitrogen bezogen wurde.

4.1.13 Zelllinien

Tab. 15: Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
Raw 264.7 (murine Makrophagen)	ATCC (American Type Culture Collection)
HL-60 (humane Promyelozyten)	ATCC (American Type Culture Collection)

4.1.14 Datenbanken und Datenverarbeitung

Die in dieser Arbeit aufgeführten Basensequenzen der offenen Leserahmen (ORFs) und Gene von *C. albicans* wurden der „*Candida* Genome Database“ entnommen (www.candidagenome.org); für *S. cerevisiae* wurde die „*Saccharomyces* Genome Database“ herangezogen (www.yeastgenome.org).

Sequenzvergleiche und Homologieanalysen auf DNA- und Proteinebene wurden mittels verschiedener BLAST-Programme durchgeführt, die auf der Internetseite des

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) zur Verfügung stehen.

Zur Proteinanalyse wurden verschiedene Algorithmen und Proteindatenbanken des ExPASy Proteomics Servers genutzt (www.expasy.ch/tools/).

Die Erstellung von Oligonukleotiden erfolgte durch das Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

DNA-Sequenzen wurden zu Klonierungszwecken mittels des Programms Clonemanager (Version 5) bearbeitet.

Spezielle Programme sind in den entsprechenden Abschnitten der jeweiligen Methoden aufgeführt.

4.2 Methoden

Sofern in diesem Abschnitt nicht gesondert aufgeführt, wurden molekularbiologische und biochemische Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Ausubel et al. 1987, Sambrook et al. 1989).

4.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden in einer 50%-igen Glycerinlösung bei -80°C gelagert. Ihre Kultivierung erfolgte in einem Vollmedium für Bakterien (LB-Medium) bei 37°C und 160 upm. Zur Selektion Plasmid-kodierter Antibiotika-Resistenz wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ dem Medium zugesetzt.

4.2.2 Kultivierung von Hefestämmen

C. albicans und *S. cerevisiae* Stämme wurden bei -80°C in einer 30%-igen Glycerinlösung als Dauerkultur gelagert. Daraus wurden die Zellen zur Kultivierung zunächst als Vorkulturen in 20 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C und 160 upm bis zur stationären Phase herangezogen. Die Zellzahl im Medium wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600} , Jasco V-630 Spectrophotometer) ermittelt. Die Kulturen wurden stets aus der Vorkultur mit einer optischen Dichte von 0,1 gestartet, was einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml entspricht. Um *C. albicans* als Blastosporen zu kultivieren, wurden die Zellen in YPD-Medium bei 30°C angezogen, zur Induktion von Hyphen wurden die Zellen in α -MEM-Medium bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden stets in temperierten Inkubationsschüttlern

(innova[®] 44, New Brunswick Scientific) bei 160 upm inkubiert; Stämme auf Agarplatten für jeweils 2 Tage bei 30°C (Heraeus Brutschrank).

Konditioniertes Medium wurde durch zentrifugieren einer Übernachtskultur (3 min, 2.000 upm, Heraeus Megafuge 1.0) mit anschließender Filtration des überstehenden Mediums durch einen Sterilfilter (0,22 µm Spritzenfilter, PVDF) gewonnen.

Für Lokalisationsversuche von Tsa1p wurden Kulturen der jeweils zu untersuchenden Stämme nach jeder Zellverdopplung geerntet und die Oberflächenproteine biotinyliert. Je nach Fragestellung wurden den Medien zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Substanzen zugesetzt (siehe Tab. 05).

4.2.3 Kultivierung von Zelllinien

Raw 264.7:

Die murine leukämische Monozyten-Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 wurde mit DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Verwendung wurde ein Aliquot langsam auf Eis aufgetaut und einmal mit 50 ml RPMI-Medium gewaschen (5 min, 4°C, 1.000 upm, Heraeus Megafuge 1.0R), um die Zellen vom DMSO zu befreien. Die Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche (Greiner) mit 50 ml frischem RPMI-Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden diese entweder zur weiteren Kultivierung passagiert oder zur Durchführung von Versuchen mittels eines Zellkulturschabers vom Flaschenboden abgelöst. Hierfür wurde zuvor das Medium gegen 20 ml frisches RPMI-Medium ausgetauscht. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Makrophagen 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt tote Zellen blau an, dadurch konnte die Population lebendiger Makrophagen durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Die für die einzelnen Versuche jeweils benötigte Anzahl an Zellen wurde in den dort verwendeten Medien eingestellt.

HL-60:

Die humane leukämische Promyelozyten-Zelllinie HL-60 kann durch Zugabe von DMSO in Granulozyten-ähnliche Zellen differenziert werden (Birnie 1988). Davon sind ca. 90% Neutrophile Granulozyten. Zur Kultivierung wurde diese Zelllinie ebenfalls in 50 ml RPMI-Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sollte die Zelllinie zu Granulozyten-ähnlichen Zellen differenziert

werden, wurde DMSO zugegeben. Dafür wurden die Zellen aus der Kulturflasche abgenommen, für 5 min bei 1.100 upm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert, der Kulturüberstand abgenommen und 50 ml frisches RPMI-Medium zugegeben. Dem Ansatz wurde 650 µl DMSO zugegeben (Endkonzentration im Medium 1,3%) und anschließend für weitere drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach diesen drei Tagen wurde erneut DMSO zugegeben (wie oben beschrieben) und für weitere 24 h inkubiert. Am Versuchstag wurden die Zellen aus der Kulturflasche abgenommen, zentrifugiert und in 10 ml frischem RPMI-Medium aufgenommen. Eine Bestimmung der lebenden Zellen wurde wie oben beschrieben mit Trypanblau durchgeführt.

Primärzellen:

Humane Neutrophile Granulozyten wurden aus 50 ml frischem Blut eines gesunden Spenders wie beschrieben (Arana et al. 2007) isoliert (siehe Kapitel 4.2.27).

Humane Makrophagen von sechs unabhängigen Spendern wurden in RPMI-Medium von einer kooperierenden Klinik („Centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid“) zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 4.2.27).

4.2.4 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Untersuchung der Zellen wurden jeweils 10 µl der Kultur auf einen Objektträger gegeben und am Mikroskop Axiovert der Firma Zeiss betrachtet. Photos wurden mit der angeschlossenen Kamera AxioCam MRm von Zeiss aufgenommen.

4.2.5 Biotinylierung von Zellwandproteinen

- Markierungspuffer 50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃ – HCl pH 8.5
- Inaktivierungspuffer 100 mM Tris-HCl pH 8.0

Um bei Lokalisationsversuchen zwischen externem und cytosolischem Tsa1p zu unterscheiden, wurden die Zellen mit dem nicht-membrangängigen Biotin-Derivat Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert und somit lediglich Zellwandproteine mit Biotin markiert (Cappellaro et al. 1998, Casanova et al. 1992, Cole et al. 1987, Urban et al. 2003). Hierfür wurden Zellen von *S. cerevisiae* aus YPD Kulturen oder *C. albicans*

aus YPD bzw. α -MEM Kulturen für 3 min, 4°C bei 3.000 upm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert und im Anschluss dreimal mit 10 ml kaltem PBS pH 7.4 gewaschen. Die Markierung erfolgte in 250 μ l Markierungspuffer mit 10 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) für 75 min auf einem Überkopftrottierrad bei 4°C. Noch vorhandenes Biotin wurde nach der Markierungsreaktion durch Zugabe von 500 μ l Inaktivierungspuffer und anschließender Inkubation für 30 min bei 4°C auf dem Überkopftrottierrad inaktiviert. Die markierten Zellen wurden erneut mit 10 ml PBS gewaschen und im Anschluss mechanisch aufgeschlossen, um Gesamtproteinextrakte zu erhalten. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt.

4.2.6 Zellaufschluss und Proteinkonzentrationsbestimmung

- Waschpuffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- Aufschlusspuffer PBS pH 7.4, 1% Nonident NP40, 0,1% SDS

Um Gesamtproteinextrakte zu erhalten, wurden die (biotinylierten) Zellen mechanisch mittels Glasperlen aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen zunächst nochmals dreimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer gewaschen. Zum Aufschluss wurde zu einem Volumen Zellpellet ein Volumen Aufschlusspuffer, ein Volumen Glasperlen (Durchmesser 0,2 - 0,5 mm) und Proteaseinhibitor in einfacher Konzentration (complete Protease Inhibitor, Roche) zugegeben. Der Ansatz wurde im Anschluss für 15 min bei 4°C auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 13.000 upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand abgenommen, welcher daraufhin nochmals für 15 min unter denselben Bedingungen zentrifugiert wurde, um das Proteingemisch vollständig von Zellresten zu reinigen.

Die Proteinkonzentration wurde in abgewandelter Form nach Lowry (Lowry et al. 1951) mit Hilfe des Bio-Rad Dc-Protein Assay - Kitsystems nach Angaben des Herstellers bestimmt.

4.2.7 Immunfällung

- IP-Puffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP40, 0,1% SDS
- 4-fach Laemmli-Puffer
 - Tris-Cl, pH 8.0 40 mM
 - EDTA 4 mM
 - SDS 4% (w/v)
 - Glycerin 40% (v/v)
 - β-Mercaptoethanol 20%
 - Bromphenolblau

Zur Aufreinigung von Tsa1p aus dem Gesamtproteingemisch wurde eine Immunfällung durchgeführt. Hierfür wurden 300 µg des aus dem Zellaufschluss gewonnenen Proteingemisches mit je 15 µl affinitätsgereinigtem Anti-Tsa1p-Antikörper für 1 h auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde pro Proteinprobe 15 µl Protein-A-Sepharose (Invitrogen) mit 200 µl PBS pH 7.4 / 0,5% Milchpulver bei 4°C auf einem Rotierrad geblockt. Nach dem Blockieren wurde die Protein-A-Sepharose zweimal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen, in 30 µl IP-Puffer aufgenommen und zu dem Antikörper/Proteingemisch gegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Probe insgesamt viermal mit je 200 µl IP-Puffer und einmal mit 1 ml PBS zur Entfernung der Detergenzien gewaschen. Die Präzipitate wurden durch zweimalige Zugabe von je 30 µl 2-fachem Laemmli-Puffer und Inkubation bei 37°C unter Schütteln eluiert. Die Trennung der Protein-A-Sepharose von den eluierten Proteinen wurde durch Zentrifugation erreicht (1 min, 13.000 upm, Heraeus Biofuge pico). Die aufgereinigten Proteinextrakte konnten nun mittels SDS-PAGE und Gelfärbung bzw. Western Blot analysiert werden.

4.2.8 Generierung und Aufreinigung der Anti-Tsa1p-Antikörper

Zur Immunfällung von Tsa1p und Detektion des Proteins im Western Blot wurde ein polyklonaler Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper verwendet. Dieser wurde aus Serum Affinitäts-gereinigt (s.u.), welches von C. Urban (Urban et al. 2005) bereitgestellt wurde.

Allerdings konnte mit diesem Antikörper Tsa1p mit deletiertem C-Terminus nicht nachgewiesen werden; eines der Erkennungspeptide wurde durch die Deletion

entfernt und das zweite Peptid war für eine erfolgreiche Bindung des Antikörpers an das Protein nicht ausreichend (siehe Abb. 05, für diesen Antikörper verwendeten Peptide sind rot hervorgehoben). Aus diesem Grund wurde ein neuer polyklonaler Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper generiert, der mutiertes CaTsa1p detektieren sollte.

Auswahl der Peptide:

Um für den Antikörper möglichst zugängliche Bereiche auf der Oberfläche von Tsa1p zu finden, wurde die 3D-Struktur eines hochhomologen TSA-ähnlichen Proteins der Ratte (Hirotsu et al. 1999) zu Hilfe genommen. Ebenfalls wurde in der Aminosäuresequenz von Tsa1p nach antigenen Bereichen gesucht. Dies wurde mittels des Programms „Antigenicity Plot“ (www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7) erreicht, das hydrophile Bereiche in der Aminosäuresequenz von Proteinen auf der Basis des Algorithmus von Hopp und Woods ermittelt (Hopp and Woods 1981).

Anhand dieser Vorhersagen von möglichst antigenen Bereichen wurden zwei je 14 Aminosäuren lange Peptidsequenzen zur Generierung des Antikörpers ausgewählt: Peptid 1 mit APSFKKTAVVDGVF und Peptid 2 mit YGVLIEEEGVALRG. Abb. 05 zeigt die Aminosäuresequenz von CaTsa1p; die für den neuen Antikörper verwendeten Peptidsequenzen sind grün hervorgehoben. Um Verwechslungen der beiden für die Detektion von Tsa1p verwendeten polyklonalen Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper zu vermeiden, wird der von C. Urban (Urban et al. 2005) beschriebene und zur Verfügung gestellte Antikörper als AK-C (AK gegen den C-Terminus von Tsa1p gerichtet) und der in dieser Arbeit generierte Antikörper zur Detektion von mutiertem Tsa1p als AK-N (AK gegen den N-Terminus von Tsa1p gerichtet) bezeichnet. Wenn im Ergebnisteil nicht gesondert aufgeführt, handelt es sich bei dem verwendeten Antikörper immer um den Anti-Tsa1p-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist (AK-C). Beide Peptide wurden durch die Firma Eurogentec, Köln synthetisiert (je 20 mg, Reinheit über 70%) und an das Trägerprotein Keyhole limpet hemocyanin (KLH) gekoppelt. KLH wird als Antigen bei der Immunisierung von Tieren zur Erzeugung von Antikörpern eingesetzt, da es eine starke Immunantwort hervorruft (Dixon et al. 1967).

```
MAPVVQQPAPSFKKTAVVDGVFEEVTLEQYKGKVVLLAFIPLAFTFVCPSEIIAYSEAVK  
KFAEKDAQVLFASTDSEYTWLAWTNVARKDGGIGKVDFPVLADTNHLSLRDYGVLIEEEG  
VALRGIFLIDPKGVLRQITINDLPVGRSVEESLRLLEAFQFTEKYGEVCPANWHPGDETI  
KPSPEASKEYFNKVNK
```

Abb. 05: Aminosäuresequenz von CaTsa1p

Die für die Erzeugung der polyklonalen Antipeptid Anti-Tsa1p-Antikörper verwendeten Peptidsequenzen sind farbig unterlegt. Die beiden rot unterlegten Peptidsequenzen wurden für den AK-C verwendet (Peptid 10 und 12) - beschrieben in C. Urban et al. (Urban et al. 2005), die beiden grün unterlegten Peptidsequenzen wurden für die Erzeugung des AK-N (diese Arbeit) verwendet, um mutiertes Tsa1p detektieren zu können.

Immunisierung der Kaninchen:

Es wurden zwei Kaninchen jeweils viermal immunisiert (Eurogentec, Köln). Nach der ersten folgten weitere Immunisierungen nach insgesamt 14, 28 und 56 Tagen.

Untersuchung der verschiedenen Seren:

Präimmunserum und Seren der Immunisierungstage 37 und 65 wurden auf Reaktion mit den synthetisierten Peptiden im Dotblot untersucht. Dabei wurde das Verhältnis der beiden Peptide abgeschätzt, das für eine Bindung an Sepharose für die anschließende Affinitätsreinigung des Antikörpers aus Serum dient. Für den Dotblot wurden jeweils 1 µg von Peptid 1 und Peptid 2 sowie 1 µg einer BSA-Kontrolle auf einen Streifen Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Bio-Rad) gegeben, die Streifen eine Stunde in Roti[®]-Block (Carl Roth) geblockt und die Seren in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungen jeweils in Roti[®]-Block) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei RT und mehrmaligem Waschen mit Roti[®]-Block wurde als sekundärer Antikörper ein Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat (Amersham) 1:10.000 für 30 min zugegeben. Die Detektion wurde wie in 4.2.12 beschrieben durchgeführt.

Abb. 06 zeigt die Reaktion der einzelnen Seren beider Kaninchen auf die zwei synthetisierten Peptide. Das Präimmunserum zeigte bei beiden Tieren jeweils keine Reaktion auf die Peptide. Das Serum von Immunisierungstag 37 zeigte bei beiden Tieren eine Reaktion auf Peptid 2, weniger auf Peptid 1, wobei das Serum von Kaninchen B insgesamt eine stärkere Reaktion ergab. Serum von Immunisierungstag 65 zeigte eine gesteigerte Reaktion auf beide Peptide, die Reaktion auf Peptid 1 bei Serum des Kaninchens A war diesmal deutlich höher. Anhand der Dotblots wurde entschieden, dass für die Kopplung der Peptide an Sepharose zur Aufreinigung der

Antikörper aus Serum mehr Peptid 1 als Peptid 2 eingesetzt werden sollte. Die Kaninchen wurden nach 86 Tagen ausgeblutet und aufgrund besserer Ergebnisse im Dotblot Antikörper aus Serum von Tier A aufgereinigt.

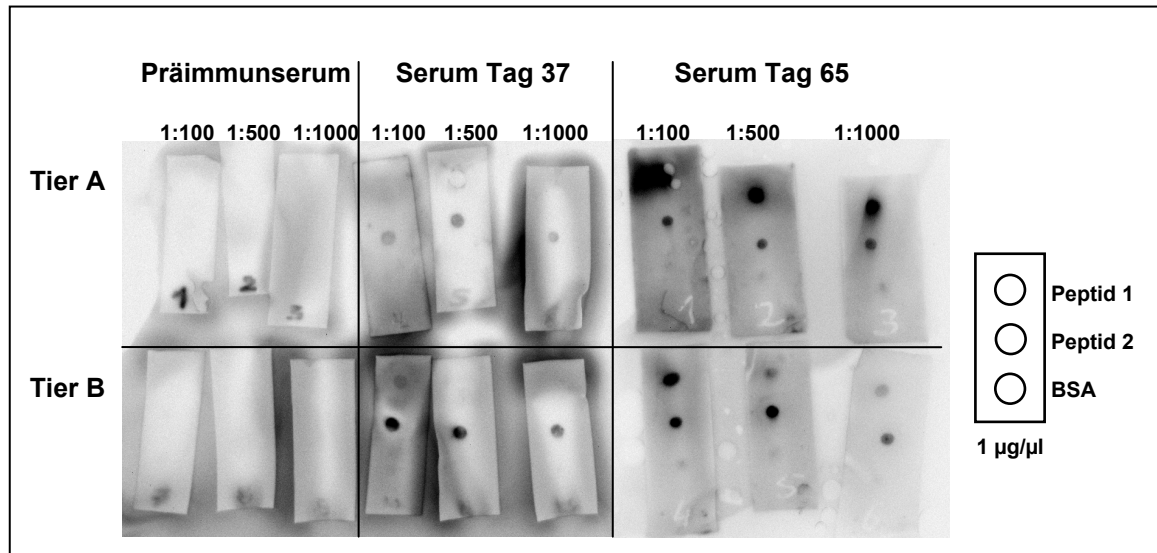


Abb. 06: Dotblot zur Überprüfung der Seren auf Spezifität

Je 1 µg Peptid 1 und Peptid 2 sowie 1 µg BSA wurden auf eine Nitrocellulosemembran getropft und die Membran mit den Seren der unterschiedlichen Tiere in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Präimmunseren zeigten keine Reaktion auf die Peptide, die Seren von Immunisierungstagen 37 und 65 zeigten dagegen eine Reaktion. Bei der BSA-Kontrolle blieb ebenfalls eine Reaktion mit den Seren aus.

Affinitätsreinigung der Antikörper aus Serum:

- Kopplungspuffer 0,1 M NaHCO₃ pH 8.3, 0,5 M NaCl
- Blockierungspuffer 1 M Ethanolamin pH 8.0
- Waschpuffer A 0,1 M Natriumacetat pH 4.0, 0,5 M NaCl
- Waschpuffer B 0,1 M Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M NaCl
- Elutionspuffer 0,1 M Glycin pH 2.8

Eine Isolierung der Antikörper aus Serum erfolgte mittels Affinitätsreinigung, bei der die synthetisierten Peptide an Sepharosekügelchen immobilisiert wurden. Hierfür wurden 0,3 g CNBr-aktivierter Sepharose™ 4B (GE Healthcare) in einer kleinen Aufreinigungssäule mit 5 ml 1 mM HCl versetzt und für 15 min quellen lassen. Im Anschluss wurde die Sepharose in der Säule mehrmals mit insgesamt 200 ml 1 mM HCl und nochmals mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. 3 mg von Peptid 1 und 2 mg von Peptid 2 wurden in 2 ml Kopplungspuffer gelöst, zur gewaschenen Sepharose gegeben und bei 4°C auf einem Überkopftrotter über Nacht inkubiert.

Überschüssiges Peptid wurde durch einmaliges Waschen mit 5 ml Kopplungspuffer entfernt. Durch Zugabe von 8 ml Blockierungspuffer und erneuter Inkubation für 2 h bei 4°C auf dem Rottierad wurden noch verbliebene aktivierte Gruppen der Sepharose geblockt. Das Produkt wurde anschließend je dreimal alternierend mit je 10 ml Waschpuffer A und Waschpuffer B, in Anschluss zweimalig mit PBS pH 7.4 gewaschen und bei 4°C in 5 ml PBS/0,02% Natriumazid gelagert.

Zur Aufreinigung wurden je 3 ml Serum verwendet; im Fall des AK-C wurde Serum von Tier 2 (120-ster Immunisierungstag) bereitgestellt von C. Urban (Urban et al. 2005), für den AK-N wurde Serum von Tier A, Tag 86 verwendet. Das Serum wurde auf die vorher dreimalig mit PBS pH 7.4-gewaschene Säule gegeben (für den AK-N Säule s.o., für den AK-C wurde die Säule bereitgestellt von C. Urban (Urban et al. 2005), dort Verwendung von je 2,5 mg Peptid 10 und 12 zur Kopplung an Sepharose) und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopftrotterad inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit PBS pH 7.4 gewaschen und mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Dabei wurden insgesamt 10 Fraktionen von je 1 ml in Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen bereits 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8.8 zur raschen Anhebung des pH-Wertes vorgelegt wurde. Die Säule wurde wiederum dreimalig gewaschen (PBS, pH 7.4) und bei 4°C in 5 ml PBS/0,02% Natriumazid bis zur nächsten Aufreinigung gelagert. Die Fraktionen wurden in UV-Küvetten bei 280 nm (Jasco V-630 Spectrophotometer) gemessen und die drei Fraktionen mit der höchsten Extinktion (in allen Fällen Fraktionen 1-3) vereinigt. Diese wurden erst 4 h, dann über Nacht gegen jeweils 2 l PBS pH 7.4 dialysiert (Dialyseschlauch für Proteine >12 kDa, Sigma). Die affinitätsgereinigten und dialysierten Antikörper wurden mit 0,02% Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert.

Testen des Anti-Tsa1p-Antikörpers, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet ist (AK-N) auf Erkennung von Tsa1p:

Zunächst erfolgte die Bestimmung der optimalen Konzentration des Antikörpers zur Detektion von Tsa1p auf einer Membran während des Western Blots. Für den AK-C wurde die von C. Urban (Urban et al. 2005) ermittelte Verdünnung von 1:10.000 verwendet. Die optimale Verdünnung des AK-N lag bei 1:5.000, was durch Verdünnungsreihen bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

Der affinitätsgereinigte AK-N wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, Tsa1p während einer Immunfällung zu binden bzw. auf einer Membran im Western Blot zu

detektieren. Hierfür wurden Proteinextrakte des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 entweder mittels des AK-C bzw. AK-N immungefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und die Membranen mit jeweils dem AK-C bzw. AK-N als primären Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle wurden nicht-immungefällte Gesamtproteinextrakte eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat verwendet (Durchführung Western Blot siehe 4.2.12). Abb. 07 zeigt einen Vergleich zwischen dem AK-C und dem AK-N im Western Blot. Spur 1 entsprechen Proben, die mit dem AK-C immungefällt wurden, Spur 2 sind nicht-immungefällte Gesamtproteinextrakte und die Proben in Spur 3 wurden mit dem AK-N immungefällt.

Der AK-C war in der Lage, immungefälltes Tsa1p auf der Membran zu detektieren (Spur 1), ebenso wie Tsa1p aus einem Gesamtproteinextrakt (Spur 2). Nicht detektierbar war hingegen Tsa1p, nachdem es mit dem AK-N immungefällt wurde (Spur 3). Bei Verwendung des AK-N zur Detektion von Tsa1p im Western Blot konnte ebenfalls nur Tsa1p nachgewiesen werden, dass entweder mit dem AK-C immungefällt wurde (Spur 1) oder als Gesamtproteinextrakt auf die Membran aufgetragen wurde (Spur 2). Mit dem AK-N immungefälltes Tsa1p konnte auch hierbei nicht auf der Membran nachgewiesen werden (Spur 3). Der AK-N war somit nicht in der Lage, natives Tsa1p zu binden und war deshalb nicht geeignet, um Tsa1p in einer Immunfällung aus dem Gesamtproteinextrakt aufzureinigen; für den Einsatz im Western Blot konnte dieser Antikörper aber durchaus eingesetzt werden. Beide Antikörper wurden ebenfalls an Proteinextrakten des Δ tsa1-Stammes getestet. In beiden Fällen war keine Bande auf Höhe von Tsa1p zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

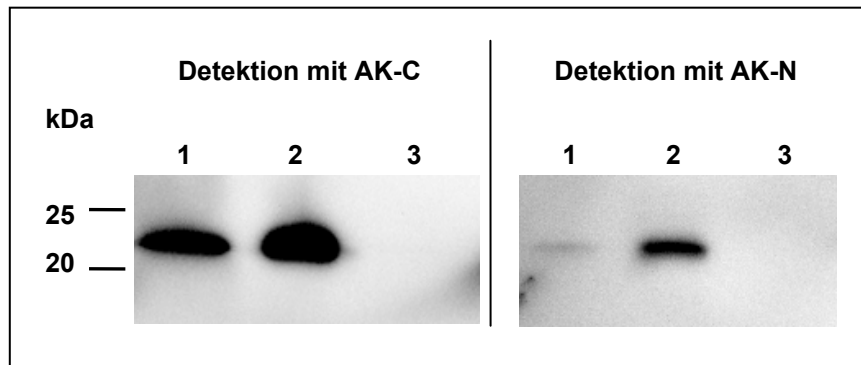


Abb. 07: Charakterisierung des gegen den N-Terminus von Tsa1p gerichteten Anti-Tsa1p-AK

Proteinextrakte des Wildtypstammes SC5314 wurden entweder mit dem AK-C (Spur 1) oder mit dem AK-N immungefällt (Spur 3). Ebenfalls wurden nicht-immungefällte Gesamtproteinextrakte auf das Gel aufgetragen (Spur 2). Die Detektion der Western Blot Membranen erfolgte entweder mit dem AK-C (links) oder dem AK-N (rechts). Der AK-N war nicht in der Lage, natives Tsa1p während der IP zu binden (Spur 3), konnte aber Tsa1p auf der Western Blot Membran binden (Spuren 1 und 2).

4.2.9 Alternative Methode zur Gewinnung von biotinyliertem Tsa1p

- | | |
|----------------------|---|
| • Kopplungspuffer | 0,1 M NaHCO ₃ pH 8.3, 0,5 M NaCl |
| • Blockierungspuffer | 1 M Ethanolamin pH 8.0 |
| • Waschpuffer A | 0,1 M Natriumacetat pH 4.0, 0,5 M NaCl |
| • Waschpuffer B | 0,1 M Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M NaCl |
| • Aufschlusspuffer | PBS pH 7.4, 1% Nonident NP40, 0,1% SDS |

Da der neu generierte Anti-Tsa1p-Antikörper natives Tsa1p nicht bindet (siehe Abb. 07, 4.2.8), war es somit nicht möglich, Tsa1p durch eine Immunfällung aus dem Gesamtproteinextrakt aufzureinigen. Um Tsa1p an der Zelloberfläche zu detektieren, wurde für den *C. albicans* Stamm, der Tsa1p mit deletiertem C-Terminus enthält, eine andere Methode der Gewinnung gewählt, da dieses Protein mit dem AK-C nicht detektierbar war. Hierfür wurden die Gesamtproteinextrakte über Neutravidin-Sepharose aufgereinigt. Neutravidin bindet spezifisch Biotin; eine Aufreinigung biotinylierter Proteine wurde durch eine Immobilisierung des Neutravidins an Sepharosekügelchen mit anschließender Elution erreicht.

Hierfür wurden 1,45 g CNBr-aktivierter Sepharose™ 4B (GE Healthcare) zusammen mit 5 ml 1 mM HCl zum hydratisieren in eine große Aufreinigungssäule gegeben. Nach dem Quellen der Sepharose wurde diese in der Säule mehrmals mit insgesamt 200 ml 1 mM HCl gewaschen. Im Anschluss wurde 20 mg NeutrAvidin™ Biotin-bindendes Protein (Pierce), das zuvor in 10 ml Kopplungspuffer gelöst wurde,

zur gequollenen Sepharose gegeben und für 2 h bei RT auf einem Rotierrad inkubiert. Überschüssiges Neutraavidin wurde durch zweimaliges Waschen mit je 12 ml Kopplungspuffer entfernt. Durch Zugabe von 12 ml Blockierungspuffer und erneuter Inkubation für 2 h bei RT auf dem Rotierrad wurden noch verbliebene aktivierte Gruppen der Sepharose geblockt. Das Produkt wurde anschließend je dreimal alternierend mit jeweils 20 ml Waschpuffer A und Waschpuffer B gewaschen und bei 4°C in 5 ml PBS/0,02% Natriumazid bis zur Verwendung gelagert.

Zur Aufreinigung biotinylierter Proteine aus einem Gesamtproteingemisch wurden diese nach dem Zellaufschluss zu 400 µl Neutraavidin-Sepharose, die zuvor einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen wurde, zugegeben und bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und viermal mit je 10 ml kaltem Aufschlusspuffer gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 4.000 upm, Heraeus Megafuge 1.0R). Die Probe wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit ca. 100 µl zweifachem Laemmli-Puffer überschichtet und bei 65°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe in ein 0,8 ml Zentrifugenröhrchen überführt (Pierce) und somit die mit Laemmli-Puffer eluierten Proteine durch Zentrifugation (1 min, 13.000 upm, Heraeus Biofuge pico) von der Neutraavidin-Sepharose getrennt. Zur Analyse wurde die gesamte Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Western Blot konnte durch Einsatz des AK-N als primären Antikörper biotinyliertes und somit an der Zelloberfläche befindliches Tsa1p auch in dem Stamm nachgewiesen werden, der Tsa1p mit deletiertem C-Terminus enthält.

4.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

• 4-fach Trenngel-Puffer	Tris-Cl, pH 8.8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
• 4-fach Sammelgel-Puffer	Tris-Cl, pH 6.8	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
• 10-fach Elektrophorese-Puffer	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1% (w/v)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie beschrieben in (Ausubel et al. 1987, Laemmli 1970) durchgeführt.

Zur Auftrennung der Proteinextrakte wurden dabei 12,8%-ige SDS-Gele verwendet.

Das Trenngel (ausreichend für jeweils 2 Gele) setzte sich dabei aus folgenden Komponenten zusammen: 4 ml H₂O, 3 ml Trenngel-Puffer, 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%, Bio-Rad), 100 µl 10% APS, 14 µl TEMED (Bio-Rad). Die Zusammensetzung für 2 Sammelgele betrug 3,03 ml H₂O, 1,25 ml Sammelgel-Puffer, 665 µl Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 50 µl 10% APS, 5 µl TEMED. Es wurden die Systeme „Mini Protean® Cell“ für Minigele oder „Protean® II xi Cell“ für große Gele (beides Bio-Rad) verwendet. Für große Gele wurden die Volumina für Trenn- und Sammelgel entsprechend angepasst.

Zur Auftrennung von immungefällten Proteinextrakten wurden 3 µl präzipitierte Probe auf insgesamt 15 µl mit einfachem Laemmli-Puffer aufgefüllt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Wurden Gesamtproteinextrakte elektrophoretisch aufgetrennt, so wurde 1 µg Gesamtprotein eingesetzt, auf 15 µl mit einfachem Laemmli-Puffer aufgefüllt und ebenfalls 5 min bei 95°C denaturiert.

Für Gele, die unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden, wurde der Laemmli-Puffer wie unter 4.2.7 beschrieben verwendet; für nicht-reduzierende Bedingungen wurde das β-Mercaptoethanol aus dem Puffer durch Wasser ersetzt. Als Größenstandards dienten die BenchMark™ Protein Ladder und die BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (beide Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V konstanter Spannung für etwa 90 min.

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurde das Gel entweder angefärbt oder die Proteine per Western Blot analysiert.

4.2.11 Methoden zur Gelfärbung

Coomassie:

- Färbelösung 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blau R250
- Entfärbelösung 25% Isopropanol, 10% Essigsäure

Zur Anfärbung von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Polyacrylamidgele für 2 h in Färbelösung unter langsamem Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung solange inkubiert, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O konnten die Gele eingescannt werden.

SYPRO[®] Ruby:

- Fixierlösung 50% Methanol, 7% Essigsäure
- Waschlösung 10% Methanol, 7% Essigsäure

Eine weitaus sensitivere Methode, um Proteine im Gel anzufärben als die Coomassie Färbung ist die Färbung mit SYPRO[®] Ruby. Hiermit können Proteinmengen von 1 ng im Gel nachgewiesen werden. Nach dem Gellauf wurde das Gel in 100 ml Fixierlösung unter langsamem Schütteln für 30 min inkubiert; im Anschluss wurde dieser Schritt mit 100 ml frischer Fixierlösung wiederholt. Zur Färbung wurde 60 ml SYPRO[®] Ruby Färbelösung (Molecular Probes) zugegeben und über Nacht im Dunklen unter Schütteln inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel in 100 ml Waschlösung für 30 min schüttelnd inkubiert und anschließend dreimal für je 5 min in ddH₂O geschwenkt. Das Einscannen des Gels erfolgte an einem Fluoreszenz-Laserscanner (FLA-5100, Fuji) unter den vom Hersteller angegebenen Wellenlängen.

Phosphoprotein Färbung:

- Fixierlösung 50% Methanol, 10% Essigsäure
- Entfärbelösung 20% Acetonitril, 50 mM Natriumacetat pH 4.0

Um phosphorylierte Proteine direkt im Gel nachzuweisen, wurde die Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gelfärbung (Molecular Probes) angewandt. Hiermit lassen sich an Tyrosin, Serin oder Threonin gekoppelte Phosphatgruppen bis zu einer Konzentration von 1 ng pro Spur nachweisen. Das Gel wurde hierfür je zweimal in 100 ml frischer Fixierlösung für je 30 min unter langsamem Schütteln inkubiert, anschließend dreimal mit je 100 ml ddH₂O für jeweils 10 min gewaschen. Zur Färbung wurden 50 ml Pro-Q[®] Diamond Färbelösung zum Gel zugegeben und für 90 min im Dunklen unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel dreimal für je 30 min in Entfärbelösung geschwenkt, anschließend zweimal mit je 100 ml ddH₂O für 5 min gewaschen und unter den vom Hersteller angegebenen Wellenlängen eingescannt (FLA-5100, Fuji).

Um die Gesamtproteinmenge auf dem Gel zu detektieren, wurde das Gel im Anschluss mit SYPRO[®] Ruby gefärbt.

4.2.12 Western Blot Analysen

- Towbin-Transferpuffer 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

Zum spezifischen Nachweis von Tsa1p wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore) transferiert (Trans-Blot® Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Vor dem Transfer wurde die Membran in 20 ml Methanol für 60 sec geschwenkt und im Anschluss zusammen mit sechs Whatman Filterpapieren derselben Größe in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Die Proteine wurden bei 2,5 mA/cm² Gel für 1 h transferiert.

Nach dem Transfer wurden noch freie Bindestellen auf der Membran durch Inkubation mit 5%-iger Magermilchpulverlösung in PBS für 1 h auf einem Orbitalschüttler bei RT blockiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion von Gesamt-Tsa1p wurde als primärer Antikörper ein spezifischer Anti-Tsa1p-Antikörper verwendet (siehe 4.2.8); je nach Fragestellung und zu untersuchendem Tsa1p entweder gegen den C-Terminus oder gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet. Dieser wurde in PBST-Puffer mit 1% BSA verdünnt (1:5.000 oder 1:10.000, siehe 4.2.8) und die Membran darin für 1 h bei RT unter langsamem Schütteln inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit PBST für jeweils 10 min wurde als sekundärer Antikörper ein Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase-Konjugat (Amersham) verwendet, der sich gegen den primären Anti-Tsa1p-Antikörper richtet. Dieser wurde ebenfalls in PBST-Puffer mit 1% BSA 1:10.000 verdünnt, zusammen mit der Membran erneut wie oben beschrieben für 30 min inkubiert und anschließend wurde nochmals gewaschen.

Zur Detektion von biotinyliertem, immunpräzipitiertem Oberflächen-Tsa1p wurde eine Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Sav-POD, Invitrogen) verwendet. Diese wurde ebenfalls in PBST-Puffer mit 1% BSA 1:2.000 verdünnt, für 1 h mit der Membran inkubiert und die Membran erneut gewaschen.

Zur Entwicklung der Membran wurde Luminol nach Angaben des Herstellers verwendet (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) und die dabei entstehende Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera dokumentiert (LAS-1000plus, Fujifilm).

4.2.13 Massenspektrometrische Analyse

4.2.13.1 Analyse von Tsa1p

Bei Western Blot Analysen wurde auf Höhe von Tsa1p teilweise eine zweite Bande knapp oberhalb des Proteins sichtbar. Um zu klären, ob es sich bei der höheren Bande um eine durch posttranslationale Modifikation erzeugte Isoform von Tsa1p wie etwa eine Phosphorylierung handelt, wurde eine massenspektrometrische Analyse beider Banden vorgenommen. Alle Schritte wurden mit frisch angesetzten Lösungen, Wasser in MS-Qualität (Fluka) und sterilen Materialien durchgeführt.

Tryptischer Im-Gel-Verdau und Extraktion der Peptide:

Die zu untersuchenden Banden wurden aus einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss wurden diese erst mit H₂O, dann mit 50 mM NH₄HCO₃ / Acetonitril im Verhältnis 1:1 für jeweils 15 min gewaschen. Nach Abnahme der Flüssigkeit erfolgte die Zugabe von Acetonitril, Inkubation für 5 min, anschließend erneute Rehydrierung in 50 mM NH₄HCO₃ und wiederum die Zugabe gleichen Volumens Acetonitril. Nachdem die Gelstücke nochmals mittels Acetonitril gewaschen wurden, wurden diese in einer Vakuumzentrifuge (Thermo Scientific, SpeedVac Concentrator SPD1010) getrocknet. Zur Reduktion und Alkylierung der Proben wurden die Gelstücke zunächst in 10 mM DTT / 50 mM NH₄HCO₃ für 45 min bei 56°C inkubiert und im Anschluss die Flüssigkeit gegen 55 mM IAA / 50 mM NH₄HCO₃ ausgetauscht und wiederum für 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 50 mM NH₄HCO₃ / Acetonitril im Verhältnis 1:1 für jeweils 15 min, dann wurden die Gelstücke erneut in Acetonitril inkubiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für den Verdau der Proteine im Gel wurde Trypsin in einer Konzentration von 25 ng/µl in 25 mM NH₄HCO₃ zugegeben, bis alle Gelstücke mit Flüssigkeit bedeckt waren und bei 37°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymlösung entfernt, ca. 2-3 µl 25 mM NH₄HCO₃ zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelstücke in 15 µl 1%-iger TFA-Lösung aufgenommen, für 1 min im Ultraschallbad belassen und anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Anreicherung von phosphorylierten Peptiden und deren Aufreinigung.

Anreicherung von Phosphopeptiden durch IMAC und Aufreinigung mittels ZipTip:

Um phosphorylierte Peptide anzureichern, wurde optional eine Immobilisierte Metall-Ionen Chromatographie (IMAC) durchgeführt. Dabei binden Phosphatreste reversibel an bestimmte Metallionen unter sauren Bedingungen. Diese Bindungen werden unter alkalischen Bedingungen wiederum aufgehoben (Stensballe et al. 2001). Für die Bindung wurde Galliumnitrat ausgewählt, die Anreicherung von Phosphopeptiden wurde mittels ZipTip_{MC} (Millipore) laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Proben weiter anzureichern und zu entsalzen, wurden die Peptide mittels ZipTip_{C18} (Millipore) laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elutionslösung wurde direkt für die Messung verwendet.

Massenspektrometrie:

Je 1,5 µl der aufgereinigten Peptide wurden direkt auf die kristalline Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) eines „prespotted AnchorChips“ aufgebracht. Nach kurzer Inkubation, bei der sich die Peptide an die Matrixkristalle anlagerten, wurden zur Entfernung von möglichen Verunreinigungen 7 µl Diammoniumhydrogenphosphatlösung auf die Matrix pipettiert und wieder abgesaugt. Zur Proteinidentifikation wurde der Massenspektrometer Bruker Daltonics Ultraflex II TOF/TOF verwendet. Die Bestimmung der Molekülmassen aller Peptide erfolgte im Reflektor-Modus unter Verwendung der Programme FlexControl und FlexAnalysis (Bruker). Für die Aufnahme der Massenspektren wurden pro Probe die Spektren von 500 Laserimpulsen aufsummiert und der Massenbereich von 700 bis 4000 Da analysiert. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Identifizierung der Proteine über die Software MASCOT (Matrix Science) mit der „*Candida* Genome Database“ (www.candidagenome.org) verglichen. Die verwendeten Suchparameter finden sich bei den Peptidsequenzen im Anhang.

4.2.13.2 Analyse des Sekretoms

Um nach Zugabe von Brefeldin-A (BFA) den Block des klassischen Sekretionswegs nachzuweisen, wurden die sekretierten Proteine mittels Massenspektrometrie untersucht. Hierfür wurden Zellen einer Übernachtskultur in YNB-Medium überführt, BFA in einer Konzentration von 40 µM zugegeben und für 3 h bei 30°C inkubiert. Parallel wurden zur Kontrolle Zellen ohne BFA inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände abgenommen, sterilfiltriert und die sekretierten Proteine mittels

Zentrifugation durch Amicon[®] Ultra Zentrifugenfilter (Millipore) aufkonzentriert. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Lowry sowie der tryptische Verdau der Proteine. Zur vergleichenden massenspektrometrischen Analyse wurden die Proben nach Angaben des Herstellers mittels der iTRAQ[™] Reagenzien (Applied Biosystems) markiert. Die massenspektrometrische Auswertung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

4.2.14 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden sämtliche Puffer und Lösungen mit DEPC-H₂O (0,1% v/v DEPC) hergestellt; bei DEPC handelt es sich um einen starken RNase-Inhibitor.

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus *C. albicans* Zellen wurden zunächst Zellperlen hergestellt. Hierfür wurden die Kulturen zu den zu untersuchenden Zeitpunkten zentrifugiert (5 min, 4.000 upm, Heraeus Megafuge 1.0), die Zellen im Mediumsüberstand resuspendiert und anschließend in flüssigen Stickstoff getropft. Die Zellperlen konnten so bei -80°C gelagert werden.

Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch in einer Kugelmühle (Typ MM 200, Retsch). Ein auf -170°C gekühlter Teflonbehälter samt Wolframcarbidkugel wurde bis etwa zur Hälfte mit Zellperlen befüllt und in die Kugelmühle eingespannt. Während 2 min bei 30 Schüttelbewegungen pro Sekunde wurden die gefrorenen Zellperlen durch die Wolframcarbidkugel zerstoßen.

Die anschließende RNA-Isolierung erfolgte mittels des RNeasy[®] Midi Kits (Qiagen) laut Angaben des Herstellers.

Um einen höheren Reinheitsgrad der RNA zu gewährleisten, wurde eine Lithiumchloridfällung durchgeführt. Zur Fällung wurde eine 4 M LiCl-Lösung 1:1 mit der eluierten RNA versetzt und bei -20°C über Nacht inkubiert. Anschließend folgten eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 upm und 4°C (Heraeus Biofuge fresco) und zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml eiskaltem 70%-Ethanol. Die erhaltenen Pellets wurden für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend je nach Größe in 50-100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde an Hand des RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies) mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers laut Angaben des Herstellers bestimmt.

4.2.15 Northern Blot Analysen

Die Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten Sonden zum Nachweis der Transkription der untersuchten Gene wurde nach Standardmethode (Sambrook et al. 1989) durchgeführt.

MOPS-Gel und Transfer:

• 10x MOPS-Puffer (pH 7.0)	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	200 mM
	Na-Acetat	80 mM
	EDTA	10 mM
• Farbstoffkomponente für Ladebuffer	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	EDTA, pH 8.0	1 mM
	Glycerin	50% (w/v)
• RNA-Ladebuffer	10x MOPS-Puffer	3 µl
	Formaldehyd (12,3 M)	5,5 µl
	Formamid	15 µl
	Farbstoffkomponente	5 µl
	H ₂ O	1,5 µl

Für den Einsatz in Northern-Blot Analysen wurde die RNA in einem MOPS-Gel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

Dafür wurden 1,5 g Agarose in 108 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und nach Abkühlung auf 65°C mit 15 ml 10-fach MOPS-Puffer, 27 ml 12,3 M Formaldehyd und 4 µl Ethidiumbromid versetzt. Zum Polymerisieren wurde diese Lösung in eine zuvor mit RNase-ZAP (Sigma) gereinigte Gelkammer gegeben. Anschließend wurde das Gel in einer ebenfalls mit RNase-ZAP behandelten Laufkammer mit 1-fach MOPS-Puffer überschichtet.

Es wurden jeweils 15 µg RNA mit der dreifachen Menge an RNA-Ladebuffer versehen und für 15 min bei 55°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte für 16 h bei 12 V. Zur Qualitätsüberprüfung wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. *C. albicans* besitzt 26S und 18S rRNA, welche als Banden bei 4.7 kb (26S) und bei 1.9 kb (18S) sichtbar werden.

Im Anschluss wurde die RNA aus dem Agarosegel durch Ausnutzung der

Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) transferiert. Dafür wurde das Gel auf drei mit 20-fachem SSC durchtränkte Whatman-Papiere gelegt. Darauf folgten die Membran und wiederum 3 durchtränkte Whatman-Papiere. Als Transferpuffer diente 20-fach SSC. Dieser Stapel wurde mit Hilfe von Parafilm abgedichtet, mit trockenen Papiertüchern bedeckt und anschließend mit einem Gewicht beschwert.

Nach 20 h wurde die Membran vom Gel abgenommen und die RNA durch UV-Crosslinking bei zweimal 1200 Kilojoule kovalent mit der Membran verbunden. Es folgte ein kurzes Waschen der Membran in 2-fachem SSC-Puffer.

Sondenmarkierung:

Radioaktiv markierte Sonden wurden mit Hilfe des Prime-It II Random Primer Labeling Kits (Stratagene) unter Verwendung des radioaktiven Nukleotids [α - 32 P]-CTP (Amersham) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die für die Sonden-PCR (4.2.18) verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tab. 10.

Hybridisierung:

- Church-Puffer 7% SDS (w/v)
 1% BSA (w/v)
 1 mM EDTA
 250 mM Na-Phosphat Puffer, pH 7.2
- Waschpuffer 1 1x SSC, 0,1% SDS
- Waschpuffer 2 0,1x SSC, 1% SDS

Vor der Hybridisierung wurde die Membran mit 15 ml Church-Puffer für 1 h äquilibriert. Anschließend wurde der Puffer gegen 10 ml frischen Church-Puffer gewechselt und die radioaktiv-markierte Sonde zugegeben. Nach 20 h Inkubation wurde die Nylon-Membran insgesamt dreimal für je 15 min gewaschen, zweimal mit Waschpuffer 1 und einmal mit Waschpuffer 2. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Drehrad bei 65°C durchgeführt.

Im Anschluss wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Detektion in eine lichtundurchlässige Kassette mit einer Phosphorbildplatte (Fujifilm) gegeben. Die Belichtung des Phosphorscreens dauerte zwischen 16 h und 20 h. Daraufhin erfolgte das Auslesen der Signale mit einem Fluoreszenz-Laserscanner (FLA-5100, Fuji).

Vor dem Aufbringen der Aktin-Sonde wurde die Membran dreimal mit 15 ml heißem Wasser für jeweils 15 min zur Entfernung der vorherigen Sonde gewaschen. Im Anschluss konnte die Membran erneut äquilibriert werden und die Hybridisierung erfolgen.

4.2.16 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden 7 ml einer Übernachtskultur mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers präpariert. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen.

4.2.17 Isolierung genomischer DNA aus *C. albicans*

• Hefe-Lysispuffer	Triton X-100	2% (v/v)
	SDS	1% (w/v)
	NaCl	100 mM
	Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

10 ml einer Übernachtskultur wurden für 2 min bei 2.000 upm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 500 µl sterilem H₂O gewaschen. Dem Zellpellet wurde zu gleichen Teilen Hefe-Lysispuffer, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Glasperlen (0,25-0,5 mm Durchmesser) zugegeben und das Gemisch dreimal für je 5 min gevortext. Zwischendurch wurde das Reaktionsgefäß für einige Zeit auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 4°C und 13.000 upm (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der Nukleinsäuren mit 1 ml eiskaltem 100%-igem Ethanol versetzt, gut vermischt und mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Präzipitierte DNA wurde erneut für 10 min bei 4°C zentrifugiert, das entstandene Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert und 30 µg RNase A (Roche) zur Degradation noch vorhandener RNA dazugegeben. Die Mischung wurde hierzu für 5 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA erneut durch Zugabe von 1 ml 100%-igem Ethanol gefällt, abzentrifugiert und das luftgetrocknete DNA-Pellet in 50 µl H₂O aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde im Spectrophotometer (Jasco V-630)

durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) bestimmt.

4.2.18 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von bestimmten DNA-Sequenzen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Geeignete Oligonukleotide wurden mit dem Programm Primer3 gewählt und sind in Tab. 06 - 10 aufgeführt.

Ein PCR-Ansatz setzte sich im Allgemeinen wie folgt zusammen:

MgCl ₂ (Gibco)	75 pmol
PCR Puffer (NEB)	einfache Konzentration
Primer forward	20 pmol
Primer reverse	20 pmol
Genomische DNA	50 ng
dNTP-Mix (Fermantas)	4 pmol (1 pmol je dNTP)
<i>Taq</i> -Polymerase	20 U
H ₂ O	ad. 50 µl

Bei der Durchführung einer Kolonie-PCR wurden anstelle der genomischen DNA Zellen einer Hefe- oder Bakterien-Kolonie direkt in das PCR-Reaktionsgefäß überführt. Auf diese Weise konnten viele Transformanten direkt überprüft werden, ohne vorher genomische DNA isolieren zu müssen.

Eine PCR-Reaktion verlief nach folgendem Programm in insgesamt 30 Zyklen:

1.	95°C	5 min	Denaturierung der DNA
2.	95°C	1 min	Denaturierung der DNA
3.	T _m variierend	1 min	Hybridisierung der Primer
4.	72°C	variierend	Elongation der Primer
5.	Rücksprung zu Punkt 2 (29 mal)		
6.	72°C	5 min	Auffüllen etwaiger Lücken
7.	8°C	∞	Abkühlung

Die Hybridisierungstemperatur T_m wurde den jeweiligen Primern angepasst, d.h. die

durch Primer3 berechnete Schmelztemperatur wurde um 2°C verringert. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Produktes. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass die *Taq*-Polymerase 1000 Nukleotide pro Minute synthetisieren kann.

Die Kolonie-PCR wurde nach gleichem Programm durchgeführt, lediglich der erste Denaturierungsschritt wurde auf 10 min verlängert, um einen besseren Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

Nach erfolgter PCR wurde ein Aliquot von 5 µl auf ein 0,8%-iges, Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (120 V, 30 min, Peqlab Biotechnologies GmbH) und unter UV-Licht betrachtet (Camilla, Raytest). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick® PCR-Purification Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Produkt wurde in 30 µl H₂O aufgenommen.

4.2.19 Restriktionsverdau von DNA und Ligation in Plasmide

Zur Integration von DNA-Fragmenten (Inserts) in Plasmide, wurden Plasmid und Insert mit Hilfe von jeweils 10 U Restriktionsenzymen über Nacht sowie am folgenden Tag nochmals für 2 h in einem Gesamtvolumen von 50 µl geschnitten. Die Temperatur des Restriktionsverdaus war abhängig vom jeweiligen Enzym und wurde laut Angaben des Herstellers eingestellt. Es wurden die jeweils optimalen Puffer des Herstellers für die Reaktion verwendet. Nach dem Verdau wurden Plasmide mittels zweimaliger Zugabe von jeweils 10 U Shrimp Alkaline Phosphatase (Roche) für je 15 min bei 37°C dephosphoryliert; die Phosphatase wurde im Anschluss für 20 min bei 65°C inaktiviert. Inserts und Plasmide wurden entweder mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt und anschließend der korrekte Verdau durch ein 0,8%iges Agarosegel bestätigt oder der gesamte Ansatz wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA, die einen korrekten Verdau anhand der Größe aufwies ausgeschnitten, und mittels des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Zur Ligation wurden Insert und Plasmid in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Dazu wurden beide in einem 0,8%-igen Agarosegel nochmals aufgetrennt und anhand der Bandenstärke das einzusetzende Verhältnis abgeschätzt. Der Ligationsansatz bestand aus Insert und Plasmid im Verhältnis 1:1, 1 U T4-DNA-Ligase sowie 1x T4-

DNA-Ligationspuffer (Roche) in einem Gesamtvolumen von 20 µl; ligiert wurde bei RT für 2 - 4 h. Direkt im Anschluss erfolgte die Transformation in *E. coli*, *S. cerevisiae* oder *C. albicans* - Zellen.

4.2.20 Transformation von Bakterien und Hefen

Transformation von *E. coli*:

Zur Transformation von *E. coli* wurden kompetente DH5α-Zellen (Invitrogen) verwendet. Diese wurden langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 100 µl kompetente Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min, im Anschluss wurden die Zellen sofort wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen für 45 min bei 37°C und 160 upm inkubiert, im Anschluss kurz zentrifugiert (1 min, 13.000 upm, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin). Diese wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Transformation von *S. cerevisiae*:

Zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde von einer Übernachtskultur am nächsten Tag 25 ml frisches YPD-Medium mit einer Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 angeimpft und für 3 h bei 30°C und 160 upm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 13.000 upm, Heraeus Biofuge pico) und das Pellet in 20 ml TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml 1xLiAc/0,5xTE aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Davon wurden 100 µl pro Transformationsansatz abgenommen und mit 1 µg Plasmid, 100 µg Lachssperma DNA (Eppendorf, zuvor 5 min bei 100°C), 700 µl 1xLiAc/1xTE/40% PEG3350 versetzt und gut resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 30°C und 160 upm inkubiert, im Anschluss mit 88 µl DMSO versetzt und für 7 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml TE-Puffer. Die Zellen wurden in 50 µl Sc-ura aufgenommen, auf Selektionsplatten (Sc-ura) ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Transformation von *C. albicans*:

Zur Transformation von *C. albicans* wurden 100 µl einer Übernachtskultur in 10 ml frisches YPD-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 für etwa 5 h bei 30°C und 160 upm angezogen. Nach Zentrifugation für 2 min bei 2.000 upm (Heraeus Megafuge 1.0) wurden die Zellen einmal mit 5 ml 1xLiOAc/TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert, 100 µg Lachssperma DNA (Eppendorf, zuvor 5 min bei 100°C) und 1 µg Plasmid zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 30°C und 160 upm inkubiert. Im Anschluss wurden 700 µl 1xLiAc/1xTE/40% PEG3350 zugegeben, der Ansatz gut vermischt und über Nacht bei 30°C und 160 upm inkubiert. Am nächsten Tag folgte der Hitzeschock bei 42°C für 1 h. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und in 50 µl Gesamtvolumen auf Selektionsmedium (Sc-ura) ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Positive Transformanden wurden jeweils durch Kolonie-PCR ermittelt.

4.2.21 Southern Blot Analysen

- 6x DNA-Ladepuffer 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanol
 30% Glycerin in Wasser
- Depurinierungspuffer 0,25 M HCl
- Denaturierungspuffer 1,5 M NaCl
 0,5 M NaOH
- Neutralisierungspuffer 1,5 M NaCl
 0,5 M Tris-HCl, pH 7.0

Mittels Southern-Hybridisierung wurde die auf einem Agarosegel aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran übertragen, um anschließend mit markierten Sonden komplementäre DNA zu detektieren (Southern 1975). Dazu wurden zunächst in einem 50 µl-Restriktionsansatz ca. 10 µg genomische DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen über Nacht bei 37°C gespalten. Anschließend wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 0,8%-igen Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch bei 80 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente die 2-Log

DNA-Leiter (0.1-10.0 kb, NEB). Zur Qualitätsüberprüfung wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

Im Anschluss wurde das Gel erst 10 min in Depurinierungspuffer geschwenkt (Erzeugung von Strangbrüchen in der DNA). Es folgten Inkubationen für je 30 min in Denaturierungspuffer (Erzeugung von Einzelsträngen) und Neutralisierungspuffer (Einstellung eines pH-Wertes unter 9 für erhöhte Bindungsfähigkeit der DNA an die Membran). Vor jedem Pufferwechsel wurde das Gel kurz in H₂O geschwenkt.

Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran, Sondenmarkierung und die anschließende Hybridisierung erfolgte wie unter 4.2.15 (Northern Blot Analysen) beschrieben. Die für die Sonden-PCR (4.2.18) verwendeten Oligonukleotide finden sich in Tab. 10.

4.2.22 Einbringen von *CaTSA1* in *S. cerevisiae*-Stämme

Es sollte überprüft werden, ob *CaTsa1p* auch in *S. cerevisiae* an die Zelloberfläche lokalisieren kann und somit universelle, Spezies-übergreifende Lokalisationsmechanismen für den *Tsa1p*-Transport an die Zelloberfläche existieren. Hierfür wurden *S. cerevisiae* Stämme verwendet, deren *TSA1* und *TSA2* deletiert sind (jeweils Einzelmutanten und die Doppelmutante, siehe Tab. 14). Als Kontrolle diente der Stamm BY4741, der Ausgangsstamm für die Erzeugung der Deletionen war.

Zur Amplifizierung von *TSA1* aus genomischer *C. albicans* DNA wurden die Primer *Tsa1_for_BamH1* und *Tsa1_rev_Xho1* verwendet (Tab. 06), die während der PCR-Reaktion Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamH1 und Xho1 anfügen, um eine anschließende Klonierung zu ermöglichen. Diese PCR wurde aufgrund der geringeren Fehlerrate der Phusion DNA Polymerase (NEB) abweichend vom Standardprotokoll (4.2.18) mit dieser Polymerase laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Produkt der Reaktion wurde durch Sequenzierung (GATC, Konstanz) auf seine korrekte Amplifizierung hin geprüft. Oligonukleotide hierfür waren *Seq_For1*, *Seq_Rev1*, *Seq_For2*, *Seq_Rev2* und finden sich in Tab. 07. Zum Einbringen des Gens in *S. cerevisiae* wurde das Plasmid *pRS426-TEF* gewählt. Dieses Plasmid enthält neben einem *ura3*-Selektionsmarker für Hefen auch den konstitutiv aktiven Promotor *TEF2*. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass *TSA1* direkt hinter diesen Promotor eingebracht wurde und somit später konstitutiv exprimiert wird. Dazu wurde das Plasmid ebenfalls mit den Restriktionsenzymen

BamH1 und Xho1 geschnitten, mit dem amplifizierten und geschnittenen *TSA1* ligiert und in kompetente DH5 α Zellen transformiert. Nach erfolgter Plasmidisolierung und Überprüfung der korrekten Plasmidzusammensetzung durch einen Test-Restriktionsverdau wurde das Plasmid pRS426-*TEF-TSA1* in die oben genannten *S. cerevisiae*-Stämme transformiert und positive Klone mittels Kolonie-PCR ermittelt. Zur Kontrolle wurde auch das Plasmid pRS426-*TEF* ohne *CaTSA1* in die jeweiligen Stämme transformiert. Primer für die Kolonie-PCR finden sich in Tab. 08; ScTSA1_for und ScTSA1_rev lieferten dabei ein Produkt von 837 bp, ScTSA2_for und ScTSA2_rev von 622 bp sowie CaTSA1_for und CaTSA1_rev von 322 bp. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel konnten die im Genom vorhandenen Gene aufgrund der unterschiedlich amplifizierten Fragmentgrößen gut unterschieden werden.

Die aus der Transformation resultierenden *S. cerevisiae* Stämme sind in Tab. 14 aufgeführt. Mit ihnen wurden Sensitivitätstests auf Agarplatten mit H₂O₂ sowie Lokalisationsstudien zu *CaTsa1p* durchgeführt.

4.2.23 Erzeugung von Punktmutationen in *CaTSA1*

Um gezielt Punktmutationen im *TSA1*-Gen zu setzen, wurde das QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Hierbei wurde mittels langer Primer während einer PCR die gewünschte Punktmutation Plasmid-basiert in das Gen eingebracht. Folgende Punktmutationen sollten in *TSA1* erzeugt werden: Austausch des Cysteins gegen Serin an AS-Position 47 (C47S-Mutante), Austausch des Cysteins gegen Serin an Position 168 (C168S-Mutante), Austausch beider Cysteine gegen Serin (Doppelmutante C47/168S) und Einfügen eines Stop-Codons an AS-Position 184 (Deletion der C-terminalen 12 AS).

Es wurde das Plasmid pCaEXP-*TSA1* verwendet; in diesem Plasmid befindet sich bereits der offene Leserahmen von *TSA1*, welches mittels der Restriktionsenzyme BamH1 und Xho1 inklusive 1000 bp upstream (Promotorregion) und 300 bp downstream (Terminator) des Gens eingebracht wurde (bereitgestellt von C. Urban (Urban et al. 2005)). *TSA1* wurde somit durch seinen eigenen Promoter reguliert. Zur Durchführung der Mutagenese-PCR wurde *TSA1* mittels der Restriktionsenzyme BamH1 und Xho1 in das kleinere und damit besser für die PCR geeignete Plasmid pUC18 eingebracht. Das Plasmid pUC18-*TSA1* wurde in DH5 α -Zellen transformiert

und mittels Kolonie-PCR positive Klone ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Mutagenese-PCR mit den Kit-Komponenten nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden ca. 45 bp lange Primer verwendet (siehe Tab. 09), die nach Angaben des Herstellers synthetisiert wurden. Nicht-mutierte Ausgangs-DNA wurde im Anschluss mit Dpn1 verdaut. Plasmide mit mutiertem *TSA1* wurden in XL1-Blue kompetente *E. coli* Zellen transformiert (im Kit enthalten). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch sequenzieren der Plasmide (GATC, Konstanz) und anschließendem Sequenzvergleich (Blast Ncbi) bestimmt. Oligonukleotide hierfür finden sich in Tab. 07. Zur Erzeugung der Doppelmutante C47/168S wurde der Prozess mit dem Plasmid pUC18-*TSA1*-C47S und den Mutageneseprimern für C168S wiederholt.

Vor der Rückklonierung in *C. albicans* wurde das mutierte *TSA1* samt 1000 bp upstream und 300 bp downstream erneut mittels der Restriktionsenzyme BamH1 und Xho1 in den integrativen Expressionsvektor pCaEXP (Care et al. 1999) umkloniert. Dieser Vektor trägt als Selektionsmarker *C. albicans URA3* unter seinem nativen Promoter und enthält Sequenzen, mit denen das Plasmid in den RP10-Lokus von *C. albicans* mittels homologer Rekombination integrieren kann. Die Plasmide pCaEXP-*TSA1*-C47S, pCaEXP-*TSA1*-C168S, pCaEXP-*TSA1*-C47/168S und pCaEXP-*TSA1*-AA184 wurden in den *URA3*-defizienten Δ *t**s**a**1* Stamm Can292 mittels ektopischer Reintegration durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Stu1 eingebracht. Positive Transformanden wurden durch Kolonie-PCR ermittelt; der Genotyp der Transformanden wurde mittels Southern Blot überprüft, die Expression von *TSA1* wurde durch Northern und Western Blots ermittelt (für die entsprechend verwendeten Oligonukleotide siehe Tab. 08 und 10). Die daraus resultierenden Stämme finden sich in Tab. 13.

4.2.24 Bestimmung der β -Glucan Exposition auf Zelloberflächen

Um die Exposition des Zellwandbestandteils β -1,3-Glucan an der Zelloberfläche verschiedener *Candida* Mutantenstämmen zu bestimmen, wurden diese über Nacht bis zur stationären Phase in YPD-Medium bei 30°C angezogen. Von diesen Vorkulturen wurden jeweils 1×10^7 Zellen abgenommen (ca. 100-200 μ l) und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin in 1 ml PBS/2%BSA für 1 h bei RT unter Schütteln blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem β -1,3-Glucan Antikörper (Konzentration 1 mg/ml, Biosupplies), der 1:100 in PBS/2%BSA

verdünnt wurde, für 1 h bei RT unter schütteln inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS. Als sekundärer Antikörper wurde der Alexa-Fluor488 Ziege-Anti-Maus Antikörper (Molecular Probes) eingesetzt, ebenfalls 1:100 verdünnt in PBS/2%BSA und wiederum für 1 h bei RT im Dunklen unter schütteln inkubiert. Nach erneutem viermaligen waschen mit PBS wurden die Zellen 1:10 mit PBS verdünnt und diese Verdünnung zur weiteren Analyse verwendet. Als Versuchskontrollen dienten Zellen, die ohne Antikörper lediglich mit PBS/2% BSA bzw. nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten wurden die Zellen in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Software: CellquestPro) analysiert. Gemessen wurde dabei die Fluoreszenzintensität pro Zelle. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software FlowJo (Fluoreszenzintensitäts-Mean). Eine Betrachtung der Zellen erfolgte ebenfalls im Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss).

Die Experimente wurden mit allen Stämmen mindestens viermal durchgeführt; die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erwies sich dabei als sehr hoch.

4.2.25 Ermittlung der Phagozytoserate von *Candida*-Zellen durch Immunzellen

Es sollte ermittelt werden, wie schnell unterschiedliche *Candida*-Mutantenstämme von Immunzellen phagozytiert werden. Dafür wurde die murine Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 eingesetzt.

Von den zu untersuchenden *Candida*-Stämmen wurde jeweils 1 ml einer Übernachtskultur abgenommen und zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden zur Markierung in 1 ml PBS resuspendiert und 2 µl Oregon Green488 (1 µM, Molecular Probes) addiert. Der Ansatz wurde 1 h bei RT im Dunklen unter schütteln inkubiert. Eine erfolgreiche Aufnahme des Farbstoffes durch die Zellen wurde mikroskopisch bestätigt (FITC-Filter, Axioplan 2, Carl Zeiss). Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal mit jeweils 1 ml PBS/100 mM Glycin gewaschen. Die exakte Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt und die Zellen schließlich in gewünschter Verdünnung in RPMI-Medium resuspendiert.

Jede Vertiefung einer 24-well Zellkulturplatte (Nunc) wurde mit einem Deckglas versehen, 5×10^5 murine Makrophagen und $2,5 \times 10^6$ *Candida*-Zellen (in RPMI-Medium, Verhältnis von 1:5) addiert. Zur Kultivierung und Vorbereitung der murinen Makrophagen siehe 4.2.3. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ im

Dunklen inkubiert, im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd für 30 min fixiert. Nach erfolgter Fixierung wurde einmal mit 1 ml PBS/100 mM Glycin gewaschen.

Um zwischen phagozytierten und nicht-phagozytierten *Candida*-Zellen zu unterscheiden, wurde der Ansatz mit 1 ml des Pilz-spezifischen Farbstoffes Calcofluor White M2R (2,5 μ M, Sigma) für 4 min im Dunklen gegengefärbt und anschließend dreimal mit je 1 ml PBS/100 mM Glycin gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit einem speziellen mounting Medium (DakoCytomation, Dänemark) auf Objektträger übertragen und für 24 h im Dunklen getrocknet.

Die Anzahl von grün-fluoreszierenden Zellen (phagozytierte *Candida*-Zellen, Oregon Green gefärbt) und blau-fluoreszierenden Zellen (externe *Candida*-Zellen, Calcofluor White gefärbt) wurde bestimmt. Die Quantifizierung fand durch Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen statt (Mikroskop: Axioplan-2, Carl Zeiss, Lampe: Hg HBO/100 Watt, Kamera: Spot-2, Diagnostic Instruments, Filter: FITC (480/535 nm) und DAPI (365/397 nm)). Zur Analyse der Bilder wurden die Programme Metamorph 5.0 (Universal Imaging Corp.) und ImageJ Version 9 verwendet.

Pro Stamm wurden drei Replikate angefertigt und jeweils mindestens 600 *Candida*-Zellen ausgezählt. Die Daten wurden als Prozentsatz der von Makrophagen internalisierten Zellen dargestellt.

Ebenfalls wurden murine Makrophagen der Zelllinie Raw 264.7 mit *Candida*-Zellen des *TSA1*-GFP Stammes Can257 (Urban et al. 2003) inkubiert und die Expression von *TSA1* während der Dauer der Infektion beobachtet. Bei diesem *Candida*-Stamm wurde GFP an den C-Terminus von *TSA1* fusioniert; die Expression von *TSA1*-GFP erfolgt dabei durch den nativen Promotor von *TSA1*. Die Makrophagen wurden wie oben beschrieben behandelt und ebenfalls im Verhältnis 1:5 zusammen mit Zellen einer Übernachtskultur des Stammes Can257 inkubiert (Zellzahlen wie oben beschrieben). Nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h wurden die Deckgläser mit den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die *TSA1*-Expression verfolgt.

4.2.26 Messung der Produktion von ROS durch Immunzellen

- HEPES-gepufferte BSA-Lösung, pH 7.3
 - 10 mM HEPES
 - 5,5 mM Glukose
 - 1 mM MgCl₂
 - 5 mM KCl
 - 145 mM NaCl
 - 4 mM NaHCO₃
 - 1 mM CaCl₂
 - 0,1% BSA

Es wurde bestimmt, ob sich die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Immunzellen als Abwehr gegen Pathogene bei den verschiedenen *Candida TSA1*-Mutantenstämmen unterschiedlich verhält.

Dafür wurde die murine Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 nach Bestimmung der Zellzahl zu 2×10^6 Zellen/ml in HEPES-gepufferten BSA-Lösung eingestellt. Davon wurden 50 μ l (1×10^5 Zellen) in eine 96-well Zellkulturplatte (weiß, Nunc) gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ für 30 min im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurden 16 U einer Meerrettich-Peroxidase (HRP Typ VI, Sigma) addiert und schließlich 5×10^5 *Candida*-Zellen des zu untersuchenden Stammes zugegeben. Die *Candida*-Zellen wurden zuvor in YPD-Medium herangezogen und befanden sich für diesen Versuch in exponentieller Wachstumsphase. Als Positivkontrolle wurde 100 μ g Zymosan (ein *S. cerevisiae* Zellwandextrakt, Sigma) in 50 μ l HEPES-gepufferten BSA-Lösung eingesetzt, als Negativkontrolle diente HEPES-gepufferte BSA-Lösung ohne den Stimulus Zymosan bzw. *Candida*-Zellen. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 50 μ l Luminol (0,4 mM, Sigma); der Ansatz wurde gut vermischt.

Emittierte Chemilumineszenz wurde sofort im Dunklen bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h in 150 sec-Intervallen gemessen (Synergy 2, BioTek). Die Lumineszenz wurde als relative Lumineszenz-Einheiten min^{-1} dargestellt.

4.2.27 Ermittlung der Überlebensrate von *Candida*-Zellen nach Kontakt mit Immunzellen

Um zu untersuchen, wie hoch die Überlebensrate verschiedener *Candida*-Mutantenstämme nach Kontakt mit Immunzellen ist und in wieweit sich die Stämme

darin untereinander unterscheiden, wurden verschiedene Arten von Immunzellen eingesetzt. Für diese Versuche wurden frisch isolierte humane Neutrophile Granulozyten und Makrophagen verwendet sowie die humane Promyelozyten Zelllinie HL-60 und die murine Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 eingesetzt.

Neutrophile Granulozyten wurden aus 50 ml frischem Blut eines gesunden Spenders wie beschrieben (Arana et al. 2007) isoliert. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung ermittelt (ca. 70 Millionen in 40 ml Medium), diese wurden dann in benötigter Konzentration in RPMI-Medium aufgenommen. Humane Makrophagen von sechs unabhängigen Spendern wurden in RPMI-Medium von einer kooperierenden Klinik („Centro de transfusiones de la Comunidad de Madrid“) zur Verfügung gestellt (von dieser Klinik wurden Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert, durch magnetische Zellsortierung mittels CD14 Microbeads aufgereinigt und für 7 Tage in RPMI-Medium mit 1000 U/ml GM-CSF zur Differenzierung der Zellen zu Makrophagen inkubiert). HL-60 und Raw 264.7 Zellen wurden wie in 4.2.3 beschrieben angezogen; HL-60 Zellen wurden durch DMSO zu Granulozyten-ähnlichen Zellen differenziert, die Zellzahl bestimmt und entsprechend in RPMI-Medium eingestellt.

Infektionsversuche wurden in 24-well Zellkulturplatten (Nunc) durchgeführt. Dafür wurde jeweils 1 ml Übernachtskultur des zu untersuchenden *Candida*-Stammes zentrifugiert (1 min, 13.000 upm, Heraeus Biofuge pico), in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Die Infektion wurde in einem Verhältnis von 40:1 durchgeführt (1×10^6 Immunzellen in 500 μ l RPMI-Medium : $2,5 \times 10^4$ *Candida*-Zellen in 100 μ l RPMI-Medium). Zur Kontrolle wurden in gleich vielen Ansätzen *Candida*-Zellen ohne Immunzellen inkubiert. Die Ansätze wurden für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, im Anschluss 500 μ l steriles H₂O zur Lyse der Immunzellen addiert und nochmals für 15 min bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert. Im Fall der HL-60 Zellen war zusätzlich eine Zugabe von 2 μ l SDS (Endkonzentration 0,05%) vor der Zugabe des H₂O und eine weitere Inkubation für 15 min zur Lyse nötig. Alle Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers aus der Zellkulturplatte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend in sterilem H₂O eine 1:10-Verdünnung angefertigt. Davon wurden 100 μ l auf YPD-Agarplatten ausgebracht (pro Platte theoretisch 250 *Candida*-Zellen) und die Platten im Anschluss für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Auswertung wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (cfu) der einzelnen Stämme

gezählt. Die Sterberate der Zellen der einzelnen *Candida*-Stämme wurde nach folgender Formel ermittelt:

$[(\text{cfu ohne Immunzellen}) - (\text{cfu mit Immunzellen}) / (\text{cfu ohne Immunzellen})] \times 100$.

Die Versuche wurden jeweils zweimal mit humanen Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, HL-60 und Raw 264.7 Zellen durchgeführt, wobei jeweils 12 unabhängige Replikate pro Stamm angefertigt wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Bedingungen der Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche

Bei einem biochemischen Screen, mit dem Detergenz-extrahierbare, lösliche Proteine der Zellwand von *C. albicans* identifiziert wurden, konnte das Protein Tsa1p identifiziert werden. Tsa1p wurde dabei als ein differentiell lokalisiertes Protein beschrieben: sowohl bei Blastosporen als auch bei Hyphen wird Tsa1p im Nukleus und im Cytoplasma gefunden, jedoch nur bei Hyphen konnte Tsa1p auch an der Zellwand nachgewiesen werden. Es wird dabei nicht signifikant ins Medium sezerniert, sondern bleibt mit der Zellwand assoziiert (Urban et al. 2003).

Zur Aufreinigung und Detektion von Tsa1p wurde die in C. Urban et al. (Urban et al. 2003) charakterisierte Aufreinigungs- und Anreicherungsmethode verwendet. Hierbei wurden zuerst Zellwandproteine mit einem nicht-membrangängigen Biotin-Derivat markiert, die Zellen im Anschluss mittels Glaskugeln in Detergenz-haltigem Puffer aufgeschlossen und schließlich Tsa1p mittels Immunfällung aus dem komplexen Proteingemisch aufgereinigt. Nach Auftrennung der Proteine im reduzierenden SDS-Gel und anschließendem Western Blot konnte Gesamt-Tsa1p mittels eines Anti-Tsa1p-Antikörpers nachgewiesen werden, Tsa1p welches sich zum Zeitpunkt der Zellernte an der Zelloberfläche befand und somit biotinyliert wurde, konnte mittels Streptavidin-Peroxidase (Sav-POD) nachgewiesen werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass intrazelluläre Proteine in der Regel nicht unspezifisch an die Zelloberfläche intakter Zellen binden und somit nicht als Kontamination auftreten. Dieser Nachweis wurde auch speziell für Tsa1p mittels Tsa1p-GFP erbracht (Urban et al. 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch die Markierung mit Biotin spezifisch Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p nachgewiesen wird, das aus der Zelle stammt.

Im Folgenden sollte geklärt werden, unter welchen Bedingungen Tsa1p an die Zelloberfläche lokalisiert und ob dieses Phänomen durch externe Faktoren induziert werden kann.

5.1.1 Tsa1p wird auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche transportiert

Tsa1p besitzt keine N-terminale Signalsequenz, die es dem Protein ermöglichen würde, in den klassischen, ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg einzutreten und somit an die Zelloberfläche zu gelangen. Um auszuschliessen, dass Tsa1p nicht zu einem späteren Zeitpunkt in den klassischen Sekretionsweg eintritt, sollte dieser durch Brefeldin-A (BFA) blockiert werden. BFA ist ein Fettsäurederivat, das durch einige Pilze synthetisiert wird (Hayashi et al. 1982). Es inhibiert die Aktivierung von *ARF1* („ADP-ribosylation factor 1“) auf Golgi-Membranen und blockiert dadurch den vesikulären Transport durch Golgi-Vesikel (Lippincott-Schwartz et al. 1989, Orci et al. 1991). Dieser Block tritt sofort nach Zugabe von BFA zu *Candida*-Zellen ein (Arioka et al. 1991).

Um einen Block der klassischen Sekretion zu erreichen, wurden Zellen des Wildtypstammes SC5314 einer YPD-Übernachtskultur in frisches Medium (YPD und YNB) überführt und BFA in einer Konzentration von 40 μM zugegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen auch ohne BFA inkubiert. Nach 3 h Inkubation bei 30°C wurden Zelloberflächenproteine biotinyliert, Tsa1p immungefällt und die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Abb. 08 zeigt die Western Blot-Membranen. Gesamt-Tsa1p war bei allen Ansätzen in gleichen Mengen in den Zellen enthalten. Ebenso konnte Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob BFA zugesetzt wurde oder nicht. In YNB-Medium war nach Zugabe von BFA sogar mehr Tsa1p an der Zelloberfläche lokalisiert. Ebenfalls konnten nach Zugabe von BFA zwei Banden mittels Streptavidin-POD auf der Membran nachgewiesen werden. Dies entspricht möglicherweise einer zweiten Isoform von Tsa1p (siehe Kapitel 5.1.5).

BFA war demnach nicht in der Lage, den Transport von Tsa1p an die Zelloberfläche zu inhibieren, teilweise wurde nach Zugabe dieses Inhibitors bei gleichbleibender Gesamt-Tsa1p Menge in der Zelle sogar verstärkt Tsa1p an die Zelloberfläche transportiert. Dies zeigt, dass Tsa1p nicht in den klassischen Sekretionsweg eintritt und somit auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche transportiert wird.

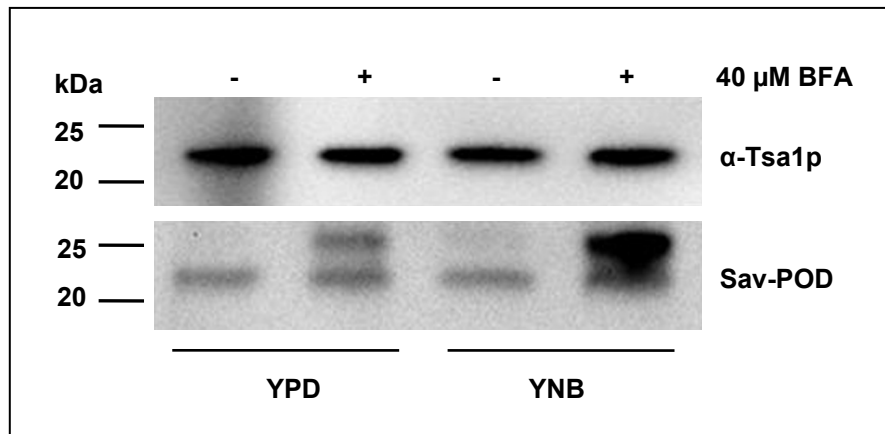


Abb. 08: Tsa1p wird auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche transportiert

Western Blot mit Anti-Tsa1p-Antikörper und Streptavidin-POD. Der klassische Proteinsekretionsmechanismus wurde durch Zugabe von BFA blockiert. Tsa1p war trotzdem in der Lage, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Die Menge an Gesamt-Tsa1p in der Zelle war bei allen untersuchten Proben gleich groß.

Um nach Zugabe von BFA den korrekten Block der klassischen Sekretion zu bestätigen, wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, weiterhin Proteine zu sekretieren. Hierfür wurden Zellen des Stammes SC5314 wie oben beschrieben mit und ohne BFA in YNB bei 30°C inkubiert und im Anschluss die Überstände des Zellmediums abgenommen, sterilfiltriert und die sekretierten Proteine aufkonzentriert. Das so gewonnene Sekretom der Zellen wurde nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass nach Zugabe von BFA zwar immer noch Proteine sekretiert werden konnten, die Menge war jedoch im Vergleich zu Zellen, die ohne BFA inkubiert wurden um mehr als ein Drittel verringert. Die Zusammensetzung des Sekretoms entsprach hierbei den Proteinen, die sonst überlicherweise auch von den Zellen sekretiert werden bzw. von der Zellwand ablösen (Sekretom ist im Anhang aufgeführt). Die Gesamtmenge des Sekretoms war nach Zugabe von BFA demnach signifikant geringer. Der Transport von Tsa1p an die Zelloberfläche war davon nicht betroffen. Wie in Abb. 08 zu erkennen war nach Zugabe von BFA sogar mehr Tsa1p an der Zelloberfläche lokalisiert.

Für einen Block der klassischen Sekretion spricht ebenfalls, dass nach Zugabe von BFA keine signifikante Teilung der Zellen beobachtet werden konnte; ebenfalls erschienen die Zellen im Mikroskop leicht vergrößert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine Ansammlung von sonst sekretierten Proteinen im Cytosol der Zellen hindeuten. Es wurde bereits beschrieben, dass mit BFA inkubierte Zellen im Mikroskop dichter erscheinen (Arioka et al. 1991).

5.1.2 Die Tsa1p-Oberflächenlokalisation ist abhängig von der Wachstumsphase

Tsa1p wurde bisher als differenziell lokalisiertes Protein beschrieben, das lediglich bei Hyphen an der Zelloberfläche gefunden werden konnte, nicht aber bei Blastosporen (Urban et al. 2003). Die Hyphenbildung galt hierbei u. a. als induzierender Faktor für die Lokalisation des Proteins an die Oberfläche. Bei diesen Studien wurden jedoch nur spätere Zeitpunkte des exponentiellen Wachstums von *Candida*-Zellen bzw. Zellen die sich in der stationären Phase befanden auf Tsa1p-Oberflächenlokalisation hin untersucht.

Um die Kinetik des Transportes von Tsa1p an die Zelloberfläche zu klären, wurden Zeitreihen mit dem Wildtypstamm SC5314 in verschiedenen Medien durchgeführt. Untersucht wurden hierbei Zellen, die als Blastosporen in YPD-Medium bei 30°C kultiviert wurden sowie Hyphen, die in α -MEM-Medium bei 37°C angezogen wurden. Abb. 09 A zeigt die Western Blots dieser Zeitreihen. Die in Spuren 3-6 und 10-13 angegebenen Zeiten entsprechen den jeweils mittels OD-Messung bestimmten Zeitpunkten der Zellverdopplung des *Candida* Wildtypstammes SC5314.

Bei den Zellen der Übernachtskultur (YPD, 30°C; entspricht stationärer Phase) konnte kein Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Spur 1). Von dieser Kultur ausgehend wurden die Zellen in frisches YPD-Medium bzw. α -MEM-Medium umgesetzt. Wuchsen die Zellen unter Hyphen-induzierenden Bedingungen (α -MEM, 37°C), so war nach 30 min noch kein Tsa1p an der Zelloberfläche nachweisbar (Spur 9). Jedoch war ab der ersten Zellverdopplung nach 120 min Tsa1p an der Zelloberfläche zu finden (Spur 10). Nach der zweiten (Spur 11), dritten (Spur 12) und vierten (Spur 13) Zellverdopplung war Tsa1p immer an der Zelloberfläche lokalisiert. Selbst nach 15 Stunden Wachstum (Spur 14) war Tsa1p dort nachweisbar. Die Gesamt-Tsa1p Menge veränderte sich im getesteten Zeitraum dagegen wenig, wie der Nachweis mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper zeigte.

Wurden die Zellen als Blastosporen kultiviert (YPD, 30°C), so zeigte sich bereits nach 30 min ein starkes Tsa1p-Oberflächensignal (Spur 2). Im Verlauf des Wachstums der Zellen nahm dieses Signal immer mehr ab (Spuren 3-5), bis nach der vierten Zellverdopplung kein Tsa1p mehr an der Zelloberfläche nachzuweisen war (Spur 6). Wenn Zellen aus diesem Wachstumsstadium erneut in frisches YPD-Medium umgesetzt wurden, so war Tsa1p wiederum in großen Mengen an der Zelloberfläche zu finden (Spur 7). Nach insgesamt 15 Stunden Wachstum unter

Blastosporen-Bedingungen konnte kein Tsa1p an der Zelloberfläche gefunden werden (Spur 8). Die Menge an Gesamt-Tsa1p in der Zelle war auch hier relativ konstant zu den gemessenen Zeitpunkten.

Es zeigte sich demnach, dass Tsa1p ebenfalls bei Blastosporen an die Zelloberfläche lokalisiert, jedoch ist dies nur in den frühen Phasen des exponentiellen Wachstums zu beobachten, wenn die Zellen aus einer Kultur in frisches Medium umgesetzt wurden und es zur Wiederaufnahme des Wachstums kam.

Es handelte sich hierbei um eine verstärkte Lokalisation des Proteins aus dem Cytosol an die Zellwand und nicht um eine verstärkte Expression von *TSA1* zu den getesteten Zeitpunkten. Dies wurde anhand von Northern Blot Analysen bestätigt, die in Abb. 09 B zu sehen sind. Die *TSA1*-Transkriptmenge blieb über den getesteten Zeitraum hinweg konstant.

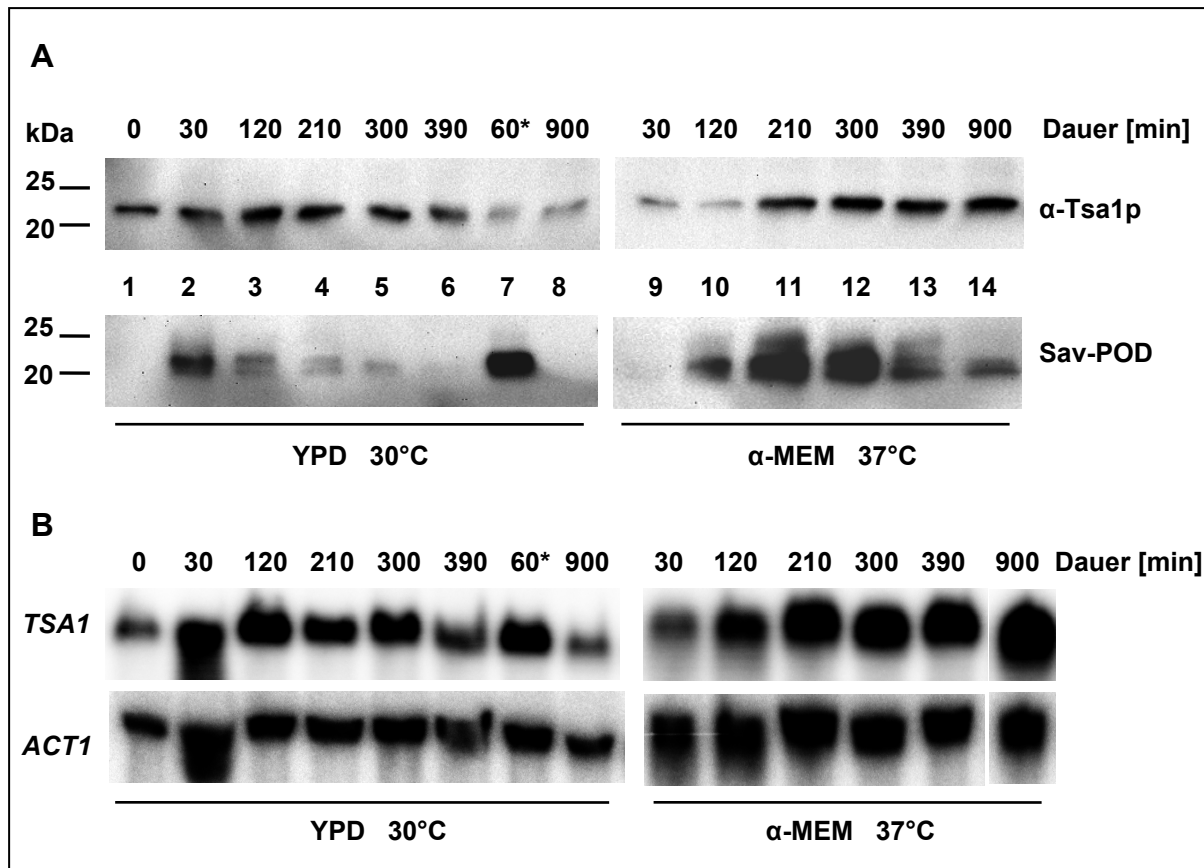


Abb. 09: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p in Zeitreihen

(A) Western Blot von Zeitreihen: Zellen des Wildtypstammes SC5314 wurden in frischem YPD oder α -MEM-Medium angezogen, nach jeder Zellverdopplung die Oberflächenproteine biotinyliert. Bei in α -MEM kultivierten Zellen konnte Tsa1p ab der ersten Zellverdopplung an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bei Zellen in YPD-Medium war Tsa1p bereits nach 30 min an der Zelloberfläche zu finden, die Menge an Tsa1p nahm aber im Verlauf des Wachstums immer mehr ab, bis nach der vierten Zellverdopplung kein Tsa1p an der Zelloberfläche mehr zu finden war (Spur 6). Wurden die Zellen erneut in frisches Medium umgesetzt (*), lokalisierte Tsa1p wieder an die Zelloberfläche.

(B) Northern Blot von Wildtypzellen in YPD und α -MEM-Medium in Zeitreihe. Die Tsa1p-Transkriptmenge blieb über den getesteten Zeitraum über konstant. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.1.3 Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Oberflächenlokalisierung

Die Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche von in YPD-Medium gewachsenen Blastosporen verläuft transient, d.h. das Protein ist nur an der Zelloberfläche zu finden, wenn Zellen der stationären Phase in frisches Medium umgesetzt werden und diese das Wachstum wieder aufnehmen. In späteren Phasen des Wachstums jedoch nicht. Es stellte sich die Frage, ob hier ein Zusammenhang mit Komponenten des Mediums, wie z. B. der Glukose besteht. Um dies zu klären, wurde Medium einer Übernachtskultur, so genanntes konditioniertes Medium verwendet. In diesem Medium sind die meisten Nährstoffe, inklusive der Glukose von den Zellen

aufgebraucht worden und zudem reichern sich Stoffwechselprodukte der Zellen im Medium an.

Die Zellen des Wildtypstammes SC5314 einer YPD-Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, das Medium sterilfiltriert und die Zellen verdünnt wieder in dieses Medium überführt. Um einen Effekt der Glukose auszuschließen, wurde dem Medium einmal Glukose in Endkonzentration 2% zugesetzt und einmal das Medium so belassen. Zur Kontrolle diente frisches YPD-Medium, mit und ohne 2% Glukose. Die Zellen wurden nach der zweiten Zellverdopplung biotinyliert.

Abb. 10 zeigt das Ergebnis des Western Blots. Wurden die Zellen in frisches YPD-Medium überführt, so war Tsa1p wie schon unter 5.1.2 beschrieben, nach der zweiten Zellverdopplung an der Zelloberfläche zu finden. Es machte dabei keinen Unterschied, ob das Medium Glukose als Nährstoffquelle besaß oder nicht. Das gleiche war für das konditionierte Medium zu beobachten: Tsa1p lokalisierte auch hier an die Oberfläche, unabhängig vom Glukosegehalt des Mediums. Die Gesamtmenge an Tsa1p schien hier im Vergleich mit dem frischen Medium sogar noch etwas größer zu sein.

Die transiente Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche, nachdem die Zellen das Wachstum wieder aufgenommen haben, ist demnach unabhängig vom Glukosegehalt des Mediums und ist nicht auf frische Mediumskomponenten zurückzuführen.

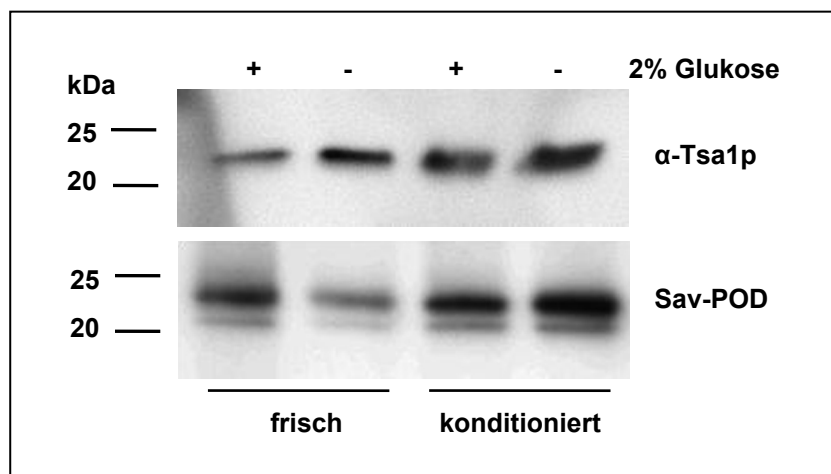


Abb. 10: Einfluss von frischem Medium auf die Oberflächenlokalisierung

Western Blot mit Anti-Tsa1p-Antikörper und Streptavidin-POD. YPD-Medium einer Übernachtskultur wurde nach abzentrifugieren der Zellen sterilfiltriert und entweder mit Glukose in Endkonzentration 2% versetzt oder so belassen (konditioniertes Medium). Als Kontrolle wurde frisches YPD-Medium mit und ohne 2% Glukose verwendet. Wildtypzellen vom Stamm SC5314 wurden in die jeweiligen Medien gegeben und nach der zweiten Zellverdopplung biotinyliert. Tsa1p lokalisierte sowohl beim frischen als auch beim konditionierten Medium an die Zelloberfläche, unabhängig vom Glukosegehalt.

5.1.4 Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf die Oberflächenlokalisation

Wie bereits in 3.2 beschrieben, sind *C. albicans* Zellen in der Lage, die Zelldichte der umliegenden Population chemisch zu messen, was als Quorum sensing bezeichnet wird. Dies wird durch kleine Signalmoleküle vermittelt, die sich in der extrazellulären Umgebung ansammeln. Zu bekannten Quorum sensing Molekülen (QSM) von *C. albicans* zählen Farnesol und Tyrosol. Dodecanol ist eine zu Farnesol ähnliche Substanz.

Bei Blastosporen lokalisiert Tsa1p nur während der lag-Phase und frühen Phase des exponentiellen Wachstums an die Zelloberfläche, nicht aber zu späteren Zeitpunkten. Es sollte untersucht werden, ob hier ein Zusammenhang mit der Ansammlung bzw. Verdünnung von Quorum sensing Molekülen nach Ausdünnen der Zellpopulation durch Transfer in frisches Medium besteht.

Hierfür wurden Zellen des Wildtypstammes SC5314 aus einer Übernachtskultur in YPD-Medium überführt. Dem Medium wurden Farnesol, Tyrosol sowie Dodecanol in den Konzentrationen 50 μM sowie 300 μM zugegeben und nach der zweiten Zellverdopplung biotinyliert. Als Referenz dienten Zellen ohne Zusatz (Abb. 11 A). Wurde den Zellen 50 μM Farnesol oder Dodecanol zugegeben, so kam es zu einer verstärkten Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche im Vergleich zur Referenz. Bei einer Konzentration von 300 μM wurde dies sogar nochmals verstärkt. Dagegen hatte die Zugabe von 50 μM Tyrosol keinen Effekt auf die Zelloberflächenlokalisation von Tsa1p. Auch eine Erhöhung der Konzentration auf 300 μM erbrachte nur eine sehr geringe Steigerung im Vergleich zur Referenz. Die Menge an Gesamt-Tsa1p der Zelle variierte ebenfalls, wie die Inkubation der Membran mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper zeigte. Bei der Zugabe von 300 μM Farnesol und Dodecanol konnte ungefähr doppelt soviel Tsa1p in den Zellen nachgewiesen werden (visuelle Abschätzung, nicht quantifiziert): bei diesen Ansätzen wurde eine zweite Bande oberhalb der für Tsa1p bekannten Größe von 21 kDa durch den Antikörper markiert (siehe Kapitel 5.1.5). Diese zweite Bande tauchte nicht bei Inkubation der Zellen mit 300 μM Tyrosol auf.

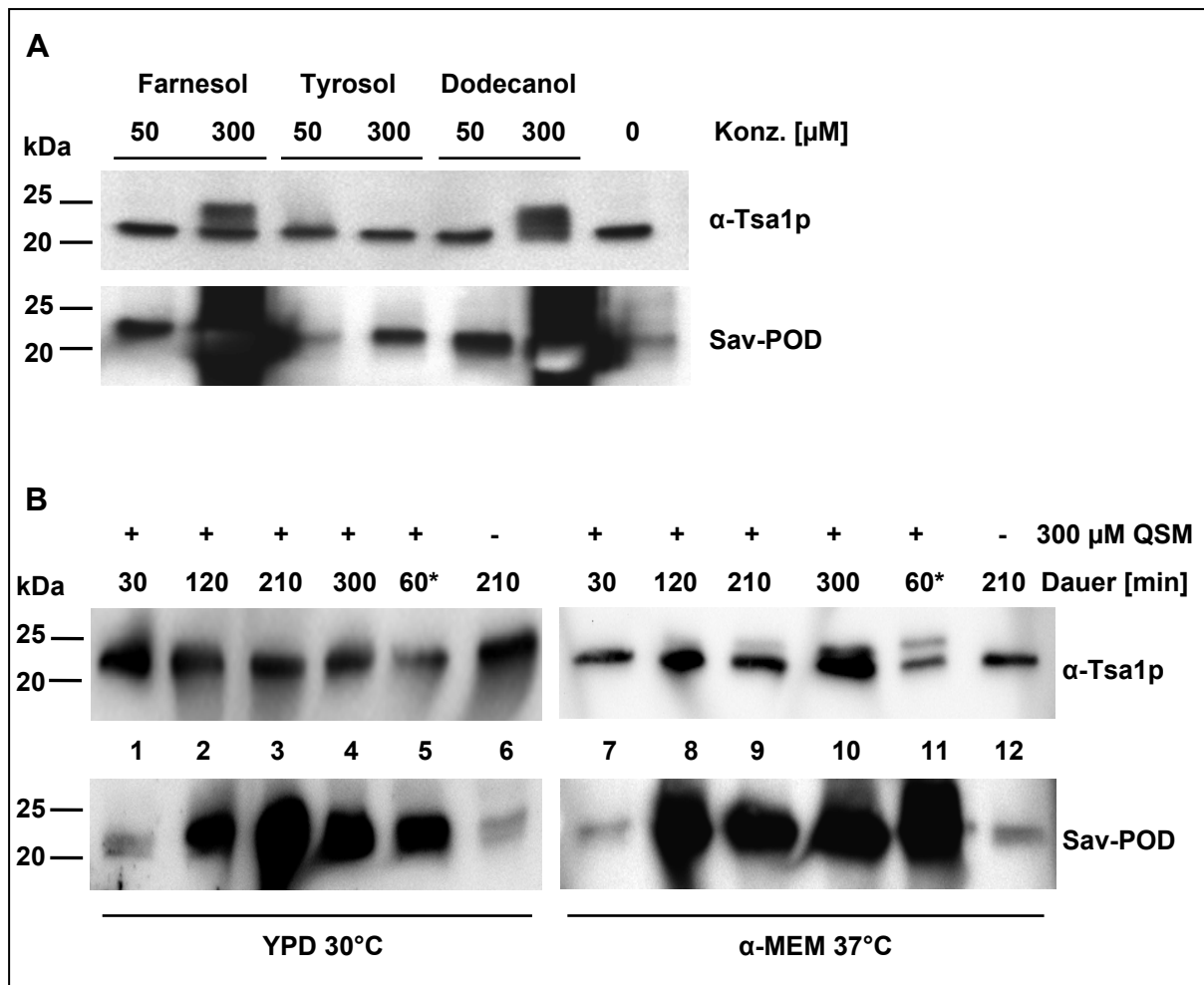


Abb. 11: Einfluss von Quorum sensing Molekülen auf die Oberflächenlokalisierung

(A) Western Blot von Zellen des Stammes SC5314, die mit Farnesol, Tyrosol und Dodecanol in den Konzentrationen 50 μM und 300 μM inkubiert wurden. Die Zugabe von Farnesol und Dodecanol führte zu einer verstärkten Ansammlung von Tsa1p an der Zelloberfläche, je höher die Konzentration, desto mehr Tsa1p fand sich dort. Tyrosol hatte keinen signifikanten Einfluss darauf.

(B) Western Blot einer Zeitreihe mit Zellen des Stammes SC5314 in YPD und $\alpha\text{-MEM}$ Medium unter Zugabe von jeweils 300 μM Farnesol. Farnesol führte zu einer verstärkten und länger andauernden Ansammlung von Tsa1p an der Zelloberfläche, unabhängig von Medium. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

Inkubation der Zellen mit Farnesol und Dodecanol, nicht aber mit Tyrosol, führte demnach zu einer verstärkten Lokalisation von Tsa1p an die Zellwand.

Dies sollte über einen längeren Zeitraum in einer Zeitreihe mit Farnesol in verschiedenen Medien nochmals genauer untersucht werden. Es wurden Zellen des Wildtypstammes SC5314 aus einer Übernachtskultur entweder in YPD oder $\alpha\text{-MEM}$ -Medium überführt und Farnesol in einer Konzentration von 300 μM zugegeben. Abb. 11 B zeigt die Western Blots dieser Zeitreihen. Biotinyliert wurde nach 30 min (Spuren 1 und 7) und anschließend nach jeder Zellverdopplung (Spuren 2-4 und 8-10). Nach der dritten Zellverdopplung wurden wiederum Zellen in frisches Medium mit Farnesol überführt und nach 60 min biotinyliert (Spuren 5 und 11). Als Referenz

dienten Zellen, die ohne den Zusatz Farnesol bis zur zweiten Zellverdopplung im jeweiligen Medium angezogen wurden (Spuren 6 und 12). Die Zugabe von Farnesol zu YPD und α -MEM-Medium hatte zur Folge, dass Tsa1p im Vergleich zur Referenz (Spuren 6 und 12) in sehr großen Mengen an die Zelloberfläche lokalisiert. Auch das sonst charakteristische Muster der transienten Lokalisation bei Blastosporen blieb nach Zugabe von Farnesol aus: Tsa1p war über einen längeren Zeitraum konstant in großen Mengen an der Zelloberfläche nachweisbar. Die Gesamtmenge an Tsa1p blieb wiederum über den gesamten getesteten Zeitraum konstant. Auch hier tauchte bei Inkubation der Membran mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper bei einigen Zeitpunkten wieder eine zweite Bande über der für Tsa1p bekannten Bande auf.

5.1.5 Untersuchung auf posttranslationale Modifizierung von Tsa1p

Bei Western Blot Analysen wurde bei Inkubation der Membran mit Streptavidin-POD, teils auch mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper eine zweite Bande knapp oberhalb der für Tsa1p bekannten Bande bei 21 kDa sichtbar. Da es sich bei den auf die Gele aufgetragenen Proben um mittels Anti-Tsa1p-Antikörper immungefällte Proteinextrakte handelt, von dem keine unspezifischen Reaktionen bekannt sind, ist der Nachweis im Western Blot spezifisch für Tsa1p.

Es wurde beschrieben, dass sich die Polypeptidketten der Proteine trotz Denaturieren in β -Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer zurückfalten und Inter-Polypeptid Aggregate bilden, was zu Doppelbanden im Gel führen kann (Westermeier 2007). Um auszuschließen, dass die zweite Bande im Gel durch Aggregatbildung entstanden ist, wurden immungefällte und in β -Mercaptoethanol-haltigem Ladepuffer aufgenommene Proteinextrakte des Wildtypstammes SC5314 nach denaturieren für 5 min bei 100°C mit 5 mM Iodacetamid (IAA) versetzt, für 20 min inkubiert und dann auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Referenz dienten Proben ohne den Zusatz von IAA. Abb. 12 zeigt die mit Streptavidin-POD inkubierte Membran. Trotz Zugabe von IAA war deutlich die zweite Bande erkennbar, folglich ist eine Rückfaltung oder Aggregatbildung von Tsa1p über Disulfidbrücken als Grund für die Molekulargewichtsverschiebung auszuschließen.

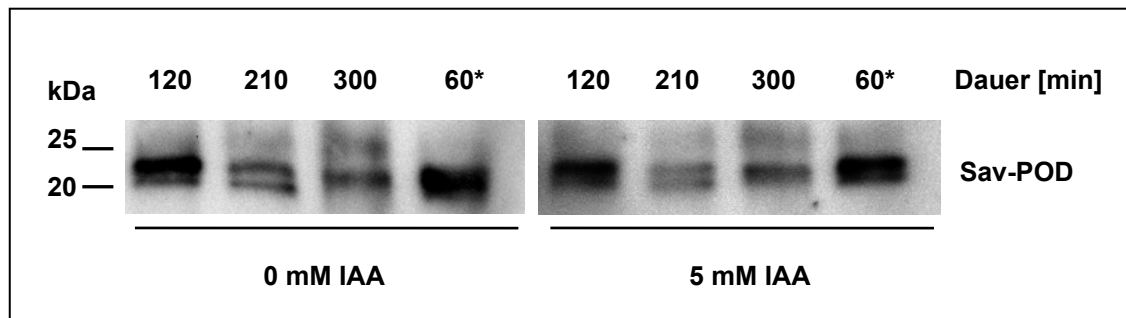


Abb. 12: Doppelbande stammt nicht von rückgefaltetem Tsa1p

Western Blot inkubiert mit Streptavidin-POD. Zellen des Wildtypstammes SC5314 wurden in Zeitreihe biotinyliert und Proteinextrakte immungefällt. Nach Denaturieren der Proteine wurde ein Teil der Proben mit 5 mM IAA inkubiert, um eine mögliche Rückfaltung von Tsa1p zu verhindern. Die Zugabe von IAA hatte jedoch keinen Einfluss auf das Vorhandensein der zweiten Bande. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

Die zweite Bande könnte posttranslational modifiziertes Tsa1p repräsentieren. Bis heute sind mehr als 300 verschiedene Arten posttranslationaler Modifikationen von Proteinen bekannt (Jensen 2004). Posttranslationale Modifikationen von Proteinen führen zu einer Massenzu- oder abnahme des Proteins. Eine der häufigsten Modifikationen ist die Phosphorylierung - ca. ein Drittel des gesamten Proteoms sind zu einem gegebenen Zeitpunkt davon betroffen (Zolnierowicz and Bollen 2000). Die am häufigsten phosphorylierten Aminosäuren sind jene mit einer Hydroxygruppe in ihrer Seitenkette: Serin, Threonin und Tyrosin. Die Phosphorylierung eines Serinrestes führt zum Beispiel zu einer Massenzunahme von 80 Da (Jensen 2004) und einer Ladungsveränderung, was die zweite Bande knapp oberhalb von Tsa1p erklären könnte. Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine Phosphorylierung von Tsa1p durch die Kinase Yak1p (persönliche Kommunikation C. d'Enfert).

Um Tsa1p auf eine mögliche Phosphorylierung zu untersuchen, wurden immungefällte Proteinextrakte von Zellen des Wildtypstammes SC5314 auf ein reduzierendes SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie gefärbt. Bei diesem Ansatz wurde ebenfalls untersucht, ob die zweite Bande durch markieren der Proteine mit Biotin entstanden sein könnte. Die Zellen wurden entweder nach der zweiten Zellverdopplung mit Biotin markiert oder so belassen. Abb. 13 zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel. Deutlich zu erkennen sind die beiden durch den Anti-Tsa1p-Antikörper immungefällten Proteinbanden und die schwere Kette des primären Antikörpers. In beiden Ansätzen waren deutlich zwei Banden erkennbar, demnach kann ausgeschlossen werden, dass die Markierung der Proteine mit Biotin für die höhere Bande verantwortlich war.

Beide Banden wurden mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Trypsin schneidet hinter den basischen AS Lysin und Arginin. Ein Teil der Proben wurde einer Immobilisierten Metallionen Chromatographie (IMAC) unterzogen. Hierbei wurden mögliche Phosphoproteine angereichert, indem die Bindungsaffinität von Metallionen an Phosphatgruppen ausgenutzt wird (Stensballe et al. 2001). Nach Entsalzung der Proben wurden diese massenspektrometrisch analysiert. Dadurch konnten beide Proteinbanden zweifelsfrei als Tsa1p identifiziert werden. Durch die massenspektrometrische Analyse der Peptide konnte jedoch keine Modifizierung von Tsa1p festgestellt werden, die eine Massenzunahme des Proteins im SDS-Gel erklären könnte. Jedoch konnten bei allen Wiederholungen der Messungen jeweils nur bis zu 55,6% der Tsa1p-Sequenz durch Peptide abgedeckt werden. Es blieben in etwa dieselben Sequenzlücken; so wäre es möglich, dass eine Modifikation des Proteins in den nicht identifizierten Sequenzabschnitten vorliegt (durch MS identifizierte Peptidsequenzen befinden sich im Anhang).

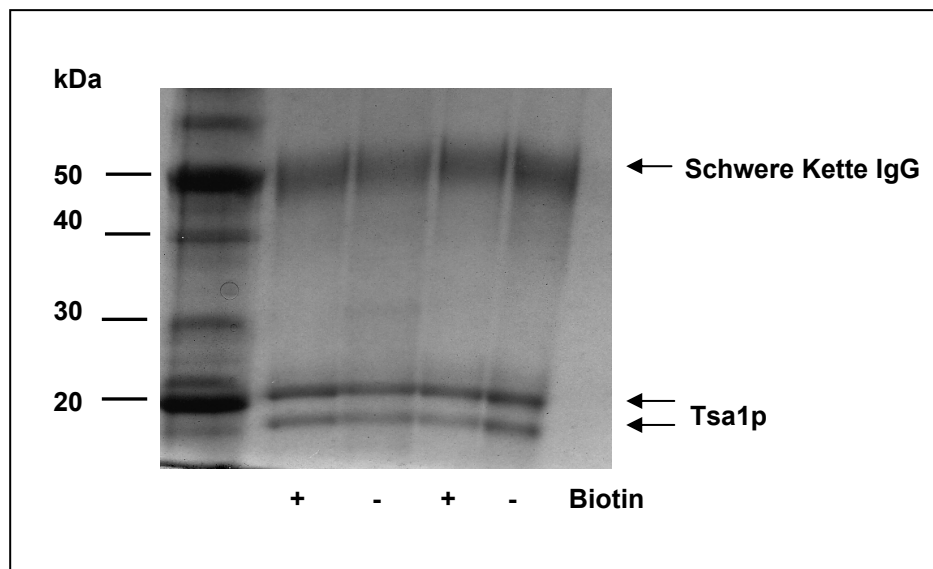


Abb. 13: Doppelbande stammt nicht von der Markierung mit Biotin

Coomassie-gefärbtes, reduzierendes SDS-Gel. Zellen des Wildtypstammes SC5314 wurden nach der zweiten Zellverdopplung entweder mit Biotin markiert oder so belassen und im Anschluss immungefällt. Bei beiden Proben (in unabhängigen Replikaten) waren zwei Banden im Gel zu erkennen, demnach stammt die zweite Bande auf Höhe von Tsa1p nicht von der Markierung des Proteins mit Biotin.

Eine weitere Möglichkeit, um Phosphorylierungen an Proteinen nachzuweisen, ist die direkte Färbung von an Serin, Tyrosin oder Threonin gekoppelte Phosphatgruppen im Gel (Patton 2002). Hierfür wurden Proteinextrakte wiederum immungefällt, auf ein reduzierendes SDS-Gel aufgetragen, welches im Anschluss mittels der

Phosphoprotein-Färbelösung Pro-Q Diamond gefärbt wurde. Auch hier konnte jedoch keine Phosphorylierung von Tsa1p festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine vorherige Behandlung der Proben mit Phosphatase-Inhibitoren zeigte hierbei keine Wirkung, so dass davon ausgegangen werden muß, dass eine Phosphorylierung als Grund für die auftretende Isoform ausscheidet.

5.1.6 Die Oberflächenlokalisierung ist durch verschiedene Faktoren induzierbar

In *S. cerevisiae* ist das zu CaTsa1p homologe Protein ScTsa1p eine thiol-spezifische Peroxidase, die Wasserstoffperoxid sowie Thiyl-Radikale in der Zelle unschädlich macht (Chae et al. 1993). Es wurde bereits gezeigt, dass Tsa1p in *C. albicans* ebenfalls die Funktion übernimmt, die Zelle gegen H₂O₂ sowie die Thiol-Verbindung Dithiotreitol (DTT) zu schützen (Urban et al. 2005).

Wenn die Zellen oxidativem Stress in Form von H₂O₂ ausgesetzt sind, kommt es zu einer transkriptionellen Induktion von *TSA1*, die abhängig vom Transkriptionsfaktor Cap1p ist (Urban et al. 2005). Die Substanzen DTT sowie β -Mercaptoethanol reduzieren Disulfidbrücken zu freien Thiolen und können durch Bildung von Thiyl-Radikalen ähnliche Zellschäden wie Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachen (Giles and Jacob 2002). Tsa1p wird unter diesen Bedingungen aber nur geringfügig transkriptionell induziert (Urban et al. 2005).

Frühere Experimente haben gezeigt, dass unter Einwirkung von H₂O₂ sowie DTT Tsa1p nicht an die Zellwand lokalisiert (Urban et al. 2005). Aufgrund neu gewonnener Erkenntnisse zur Lokalisation von Tsa1p zu frühen Zeitpunkten des Wachstums der Zellen als Blastosporen wurden die Versuche unter Einwirkung verschiedener Agenzien in einer Zeitreihe wiederholt.

Abb. 14 zeigt die Western Blots der Zeitreihen mit Zellen des Wildtypstammes SC5314. Die angegebenen Zeiten entsprechen erneut den Zellverdopplungen nach Start der Kulturen, an denen die Zellen mit Biotin markiert wurden. Bei Spuren 5, 9, 12, 16 und 20 wurden die Zellen nach der dritten Zellverdopplung in frisches Medium überführt und nach 60 min biotinyliert. Spuren 1-5 entsprechen der Zeitreihe in YPD-Medium ohne Zugabe von Agenzien. Es zeigte sich das gleiche transiente Lokalisationsmuster für Tsa1p wie unter 5.1.2 beschrieben: nur zu Beginn der Kultivierung befand sich Tsa1p an der Zelloberfläche, danach wurde das Signal schwächer bis es ganz verschwand. Wenn dem Medium von Kulturstart an 5 mM

H₂O₂ zugesetzt wurden, war signifikant mehr Tsa1p an der Zelloberfläche zu finden (Spuren 6-9). Dieses Signal wurde nochmals deutlich verstärkt bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 mM H₂O₂ (Spuren 10-12). Tsa1p war nicht nur in deutlich größeren Mengen an der Zelloberfläche lokalisiert, sondern war auch relativ konstant im Verlauf der Zeit dort nachweisbar.

Wenn DTT in einer Konzentration von 20 mM den Zellen zugegeben wurde, war ebenfalls eine stark erhöhte Menge an Tsa1p an der Zelloberfläche zu finden (Spuren 13-16). Die Menge an Oberflächen-Tsa1p schien sogar im Verlauf der Zeit zuzunehmen. Dagegen hatte die Zugabe von 5 mM β -Mercaptoethanol nur einen geringen Einfluss auf die Lokalisation von Tsa1p (Spuren 17-20). Die Bandenstärke und das transiente Lokalisationsmuster entsprachen in etwa dem der Zellen, die ohne Zugabe von Agenzien inkubiert wurden. Die Gesamtmenge an Tsa1p der Zellen war bei allen Ansätzen in etwa gleich groß, wie die Entwicklung der Membran mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper zeigte.

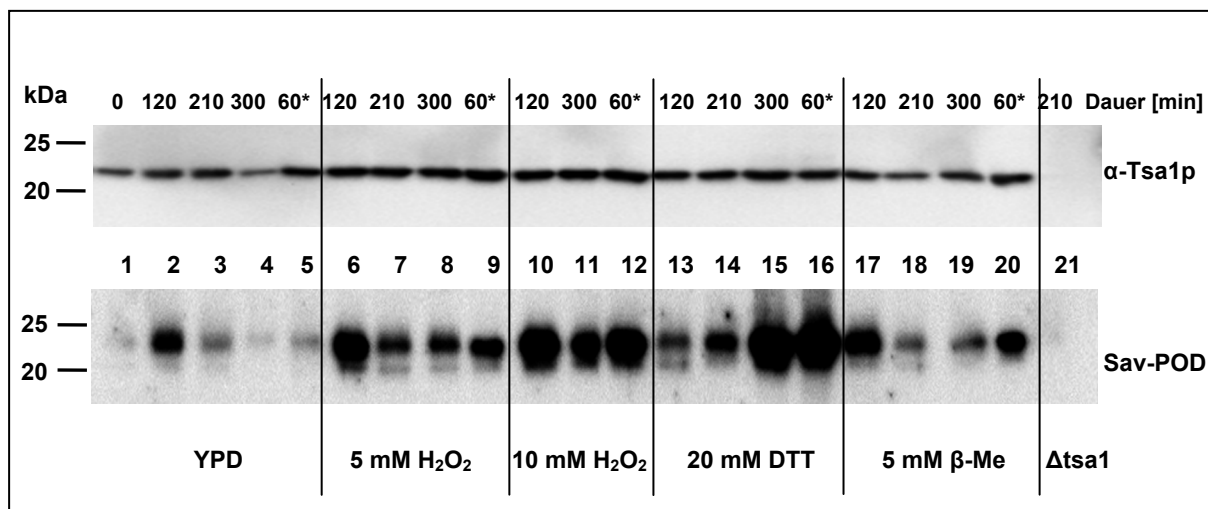


Abb. 14: Oberflächenlokalisierung ist durch Redox-aktive Substanzen induzierbar

Western Blot von Zeitreihen mit Zellen des Stammes SC5314 unter Zugabe der angegebenen Agenzien. Die angegebenen Zeiten entsprechen den Zeiten einer jeweiligen Zellverdopplung des Stammes. Bei Spuren 5, 9, 12, 16 und 20 wurden die Zellen nach der dritten Zellverdopplung in frisches Medium überführt und nach 60 min biotinyliert.

Die Zugabe von H₂O₂ und DTT führte zu einer verstärkten Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche (Spuren 6-16), β -Mercaptoethanol dagegen hatte keinen signifikanten Einfluss (Spuren 17-20). Die Gesamtmenge an Tsa1p der Zellen war bei allen Ansätzen in etwa gleich groß.

5.1.7 Tsa1p-Oberflächenlokalisierung findet sich bei einer Vielzahl von *C. albicans* Isolaten

Bisher wurden sämtliche Lokalisationsstudien von Tsa1p mit dem Wildtypstamm SC5314 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche nicht nur bei diesem Stamm auftritt, wurden verschiedene klinische Isolate auf Tsa1p-Lokalisation hin untersucht. Bei den Isolaten handelte es sich jeweils um zwei orale, vaginale und systemische Isolate, die aus Biopsiematerial von Patienten isoliert wurden. Die Stämme wurden in YPD-Medium bei 30°C kultiviert und nach der zweiten Zellverdopplung die Oberflächenproteine biotinyliert. Unter den verwendeten Kulturbedingungen lagen die Zellen als Blastosporen vor (Daten nicht gezeigt).

Die über den Anti-Tsa1p-Antikörper bestimmbaren Mengen an Gesamt-Tsa1p in der Zelle variierten bei den unterschiedlichen klinischen Isolaten nur leicht (Abb. 15). Bei allen getesteten Stämmen konnte Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden, wenn auch in stark unterschiedlichen Mengen. Die Herkunft des Isolats spielte für die Menge an Oberflächen-lokalisiertem Tsa1p keine Rolle. Es wurden jeweils stark unterschiedliche Mengen von Tsa1p an der Zelloberfläche sowohl beider oraler Isolate (Spuren 1 und 2) als auch der systemischen Isolate (Spuren 5 und 6) gefunden. Beide vaginale Isolate (Spuren 3 und 4) zeigten in etwa dieselbe Menge Oberflächen-Tsa1p wie der Referenzstamm SC5314 (Spur 7).

Bei allen getesteten klinischen Isolaten konnte demnach Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Deshalb muss von einer grundsätzlichen Funktion von Tsa1p in *C. albicans* an der Zellwand ausgegangen werden.

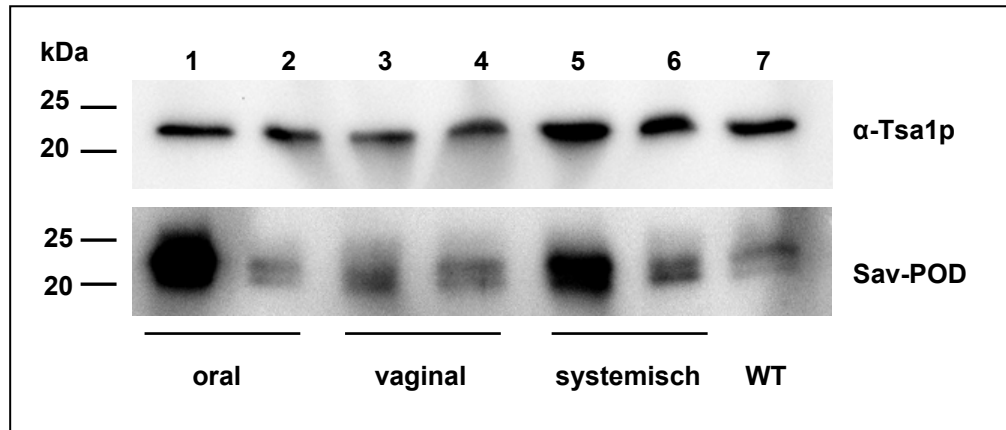


Abb. 15: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p bei klinischen Isolaten

Western Blot inkubiert mit Anti-Tsa1p-Antikörper (oben) und Streptavidin-Peroxidase (unten). Zellen verschiedener klinischer Isolate wurden in YPD-Medium bei 30°C bis zur zweiten Zellverdopplung kultiviert, dann biotinyliert.

Spur1: orales Isolat Can437, Spur 2: orales Isolat Can440, Spur 3: vaginales Isolat Can439, Spur 4: vaginales Isolat Can448, Spur 5: systemisches Isolat Can501, Spur 6: systemisches Isolat Can503, Spur 7: Wildtyp-Referenzstamm SC5314. Bei allen Stämmen war Tsa1p in unterschiedlichen Mengen an der Zelloberfläche nachweisbar; die Gesamtproteinmenge an Tsa1p war bei allen Stämmen nahezu gleich.

5.1.8 CaTsa1p lokalisiert auch in *S. cerevisiae* an die Zelloberfläche

Wie sich herausstellte, lokalisierte Tsa1p bei allen getesteten klinischen Isolaten an die Zelloberfläche; diese Translokation ist demnach weit verbreitet bei *C. albicans* (siehe 5.1.7). Um zu untersuchen, ob Tsa1p auch bei anderen Hefen an die Zelloberfläche lokalisieren kann, wurde die Lokalisation von CaTsa1p in *S. cerevisiae* untersucht. *S. cerevisiae* ist verwandt mit *C. albicans* und besitzt ein zu CaTsa1p zu 88% homologes Protein ScTsa1p. In *S. cerevisiae* existiert ebenfalls ein zweites, homologes Protein ScTsa2p, welches in *C. albicans* nicht vorkommt. ScTsa1p wird als eine Thioredoxin Peroxidase beschrieben, die als Antioxidant aber auch als Chaperon in der Zelle wirken kann. ScTsa2p agiert zusammen mit ScTsa1p bei der Entfernung von ROS. Deletion von ScTSA2 verstärkt den Phänotyp von ScTsa1-Deletionsmutanten (Wong et al. 2002).

Es wurde CaTSA1 mittels des Plasmids pRS426-TEF in folgende *S. cerevisiae*-Stämme eingebracht: *tsa1Δ*, *tsa2Δ* und *tsa1Δtsa2Δ*. CaTSA1 wird in diesen Stämmen konstitutiv durch den TEF2-Promotor exprimiert. Als Kontrolle wurden die Stämme ebenfalls mit dem Plasmid pRS426 ohne CaTSA1 transformiert.

Zuerst wurde überprüft, ob CaTsa1p in *S. cerevisiae* ebenfalls die Funktion des ScTsa1p im Hinblick auf die Peroxidase-Funktion des Proteins übernehmen kann.

Hierfür wurden die Mutanten oxidativem Stress in Form von 0,5 mM H₂O₂ ausgesetzt (Abb. 16 B). Als Kontrolle wurden die Stämme auf YPD-Medium ohne Stressinduktor kultiviert (Abb. 16 A).

Spuren 1, 6 und 11 entsprechen den jeweiligen *S. cerevisiae* Stämmen *tsa1Δ*, *tsa2Δ* und *tsa1Δ tsa2Δ*. Spuren 2/3, 7/8 und 12/13 entsprechen den jeweiligen *S. cerevisiae* Deletionsstämmen transformiert mit dem Plasmid pRS426, resultierend in den Stämmen *tsa1Δ*-pRS426, *tsa2Δ*-pRS426 und *tsa1Δtsa2Δ*-pRS426. Diese Stämme wurden in Replikaten auf die Platten aufgebracht. Spuren 4/5, 9/10 und 14/15 entsprechen den jeweiligen *S. cerevisiae* Deletionsstämmen transformiert mit dem Plasmid pRS426-*CaTSA1*, was die Stämme *tsa1Δ*-*CaTSA1*, *tsa2Δ*-*CaTSA1* und *tsa1Δtsa2Δ*-*CaTSA1* ergab. Diese Stämme wurden ebenfalls in Replikaten auf die Platten aufgebracht und enthielten *CaTSA1*, welches konstitutiv exprimiert wurde. Auf YPD-Platten wuchsen alle Stämme in etwa gleich gut (Abb. 16 A). Unter oxidativem Stress konnte der *tsa1Δ* Stamm nicht wachsen, da die wichtige Thioredoxin Peroxidase *ScTsa1p* in der Zelle fehlte. Gleiches galt auch für die Stämme, die lediglich mit dem Plasmid pRS426 transformiert wurden. Im Fall des *tsa2Δ* Stammes konnten die Zellen trotz des oxidativem Stress wachsen, da *ScTsa1p* in der Zelle vorhanden ist und H₂O₂ unschädlich machte. Wurde in die *Δtsa1 S. cerevisiae* Deletionsstämmen *CaTsa1p* eingebracht, so waren diese wieder in der Lage, unter oxidativem Stress zu wachsen.

CaTsa1p konnte demnach unter den getesteten Bedingungen den *ScΔtsa1* und *ScΔtsa1Δtsa2* Phänotyp unter oxidativem Stress komplementieren.

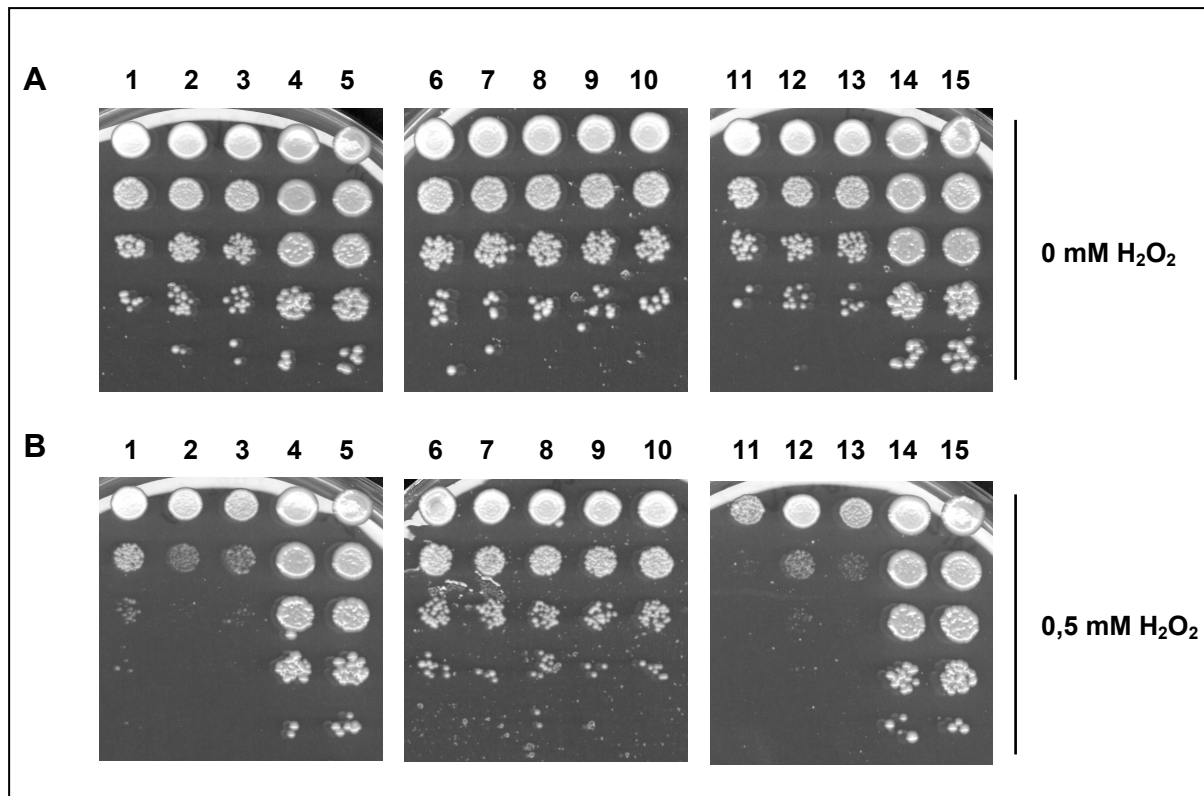


Abb. 16: CaTsa1p komplementiert den ScΔtsa1 Phänotyp unter oxidativem Stress

Sensitivitätstests von diversen *S. cerevisiae* Stämmen auf YPD-Platten (A) und YPD-Platten versetzt mit 0,5 mM H₂O₂ (B). Beginnend mit 10⁵ Zellen wurden Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 auf die Platten aufgebracht.

Spur 1: *tsa1Δ*, Spur 2 und 3: *tsa1Δ*-pRS426, Spur 4 und 5: *tsa1Δ*-CaTSA1, Spur 6: *tsa2Δ*, Spur 7 und 8: *tsa2Δ*-pRS426, Spur 9 und 10: *tsa2Δ*-CaTSA1, Spur 11: *tsa1Δ tsa2Δ*, Spur 12 und 13: *tsa1Δ tsa2Δ*-pRS426, Spur 14 und 15: *tsa1Δ tsa2Δ*-CaTSA1. Unter oxidativem Stress ist CaTsa1p in der Lage, den ScΔtsa1 Phänotyp zu komplementieren.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob CaTsa1p auch in *S. cerevisiae* in der Lage ist, an die Zelloberfläche zu lokalisieren und demnach in beiden Organismen homologe Wege des Proteintransportes für Tsa1p existieren. Untersucht wurden die jeweiligen Deletionsstämme, sowie die mit dem Plasmid pRS426 transformierten Stämme (mit und ohne CaTSA1). Als Kontrollen wurden die *C. albicans* Stämme SC5314 sowie Can312 (CaΔtsa1) verwendet.

Die Zellen der jeweiligen Stämme wurden in YPD-Medium angezogen, nach der zweiten Zellverdopplung biotinyliert und Tsa1p mittels Immunfällung aufgereinigt. Im Western Blot zeigte sich nach Inkubation der Membran mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper, dass CaTsa1p in den Zellen der Stämme *tsa1Δ*-CaTSA1 (Spur 3), *tsa2Δ*-CaTSA1 (Spur 6) und *tsa1Δtsa2Δ*-CaTSA1 (Spur 9) vorhanden war (Abb. 17). Der Antikörper ist spezifisch für CaTsa1p: weder ScTsa1p noch ScTsa2p wurden durch ihn immungefällt bzw. auf der Membran gebunden. Bei den *S. cerevisiae* Deletionsstämmen *tsa1Δ* (Spur 1), *tsa2Δ* (Spur 4) und *tsa1Δtsa2Δ* (Spur 7) und den

dazugehörigen Stämmen transformiert mit dem „leerem“ Plasmid pRS426 (Spuren 2, 5 bzw. 8) ergaben sich demnach auch keine Banden im Western Blot. Wurde die Membran mit Streptavidin-POD inkubiert, so konnte CaTsa1p an der Zelloberfläche bei allen mit dem Plasmid pRS426-*CaTSA1* transformierten Stämmen nachgewiesen werden. CaTsa1p war demnach auch in *S. cerevisiae* in der Lage, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Es existieren also homologe Transportmechanismen für dieses Protein in beiden Organismen.

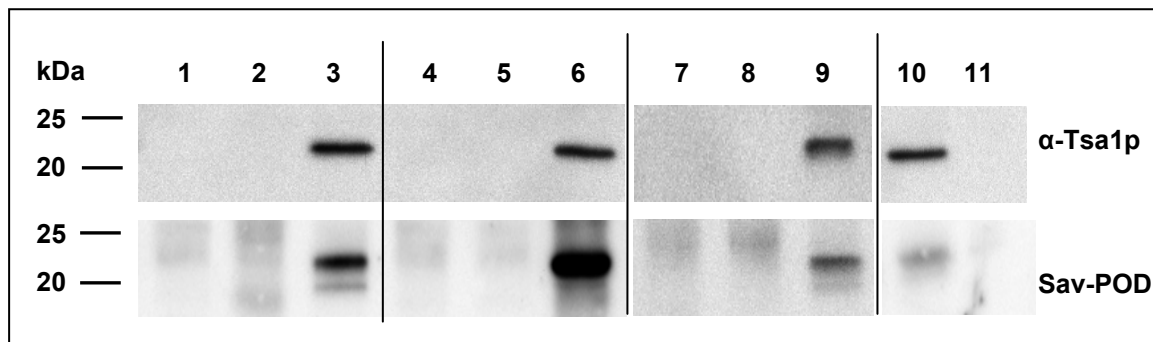


Abb. 17: CaTsa1p lokalisiert in *S. cerevisiae* ebenfalls an die Zelloberfläche

Western Blot detektiert mit Anti-Tsa1p-Antikörper und Streptavidin-POD. Zellen von verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen wurden nach der zweiten Zellverdopplung biotinyliert, Gesamtproteinextrakte immungefällt.

Spur 1: *tsa1Δ*, Spur 2: *tsa1Δ*-pRS426, Spur 3: *tsa1Δ*-*CaTSA1*, Spur 4: *tsa2Δ*, Spur 5: *tsa2Δ*-pRS426, Spur 6: *tsa2Δ*-*CaTSA1*, Spur 7: *tsa1Δtsa2Δ*, Spur 8: *tsa1Δtsa2Δ*-pRS426, Spur 9: *tsa1Δtsa2Δ*-*CaTSA1*, Spur 10: *C. albicans* SC5314, Spur 11: *C. albicans* Δ *tsa1* (Can312). Der Anti-Tsa1p-Antikörper ist spezifisch für *CaTsa1p*; er bindet *ScTsa1p* und *ScTsa2p* nicht. *CaTsa1p* ist auch in *S. cerevisiae* in der Lage, an die Zelloberfläche zu lokalisieren.

5.2 Signaltransduktionswege und molekulare Determinanten der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung

Tsa1p besitzt keine bekannte N-terminale Signalsequenz, die es dem Protein ermöglichen würde in den klassischen Sekretionsweg einzutreten und somit über das Endoplasmatische Retikulum und Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche zu gelangen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Transport von Tsa1p nicht durch die Zugabe von BFA, einem Inhibitor des klassischen Proteinsekretionsweges unterbunden werden konnte (siehe Kapitel 5.1.1). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Protein auf nicht-klassische Weise transportiert wird. Der Mechanismus der Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche ist bis heute nicht bekannt.

Im Folgenden sollten bekannte Signaltransduktionswege auf ihren Einfluß auf die

Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche untersucht werden sowie die für eine Translokation entscheidenden molekularen Determinanten von *TSA1* identifiziert werden.

5.2.1 Relevante Signaltransduktionswege der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung

Um die für eine Tsa1p-Lokalisation relevanten Signaltransduktionswege zu identifizieren, wurden diverse *C. albicans* Stämme mit Deletionen in verschiedenen morphogenetischen und Stress-assoziierten Signalwegen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Tsa1p an die Zelloberfläche zu transportieren. Viele Mutanten morphogenetischer Signaltransduktionswege weisen signifikante Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung auf. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit dieser Signalwege für eine einwandfrei aufgebaute Zellwand. Da Tsa1p ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert ist und somit ein Teil der Zellwand darstellt, stellte sich die Frage, in wie weit diese Signaltransduktionswege einen Einfluss auf die Translokation des Proteins an die Oberfläche haben. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Signaltransduktionswege, deren beteiligter Komponenten sowie einen Überblick über ihr Zusammenwirken liefert Kapitel 3.1.

Die Zellen der einzelnen Deletionsstämme wurden jeweils in YPD-Medium bei 30°C kultiviert und Oberflächenproteine nach jeder Zellverdopplung biotinyliert. Die Detektion von Gesamt-Tsa1p der Zelle sowie Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p erfolgte mit der bereits beschriebenen Methode. Um die Mengen an Tsa1p vergleichen zu können, wurden entweder Zellen des Wildtypstammes SC5314 oder, wenn verfügbar, der zur Deletion jeweilige Reversionsstamm parallel kultiviert und Tsa1p detektiert. In Tab. 16 zusammengefasst sind die jeweils getesteten Deletionsstämme wichtiger Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege, eine kurze Beschreibung des Proteins und dessen Funktion in der Zelle sowie das Ergebnis der Western Blots zur Oberflächenlokalisierung von Tsa1p in diesen Stämmen. Die Ergebnisse von sechs Mutantenstämmen, die Auffälligkeiten bei der Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche zeigten, sind gesondert in Kapiteln 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4 und 5.2.1.5 aufgeführt.

Tab. 16: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p bei verschiedenen Mutanten

Protein	Beschreibung und Funktion	Tsa1p Oberflächenlokalisierung im jeweiligen Deletionsstamm
Ras1p	- Signaltransduktions-GTPase - Reguliert cAMP und MAPK Signalwege	Dominant-aktiv und dominant-negativ kein grosser Unterschied zu SC5314, siehe 5.2.1.1
Pde2p	- Phosphodiesterase - Vermittelt Signalübertragung durch cAMP	Bei Deletion verstärkt Tsa1p an Zelloberfläche im Vergleich zum Reversionsstamm, siehe 5.2.1.2
Tpk2p	- Katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase A - Morphogenese und Stressantwort	Wie SC5314
Efg1p	- Transkriptionsfaktor der HLH-Familie - Transkriptioneller Repressor und Aktivator - Morphogenese	Wie SC5314 in YPD, in α -MEM abweichend, siehe 5.2.1.3
Cek1p	- MAPK - Übergang von Blastosporen zu Hyphen	Wie SC5314
Hog1p	- MAPK - Reaktion auf osmotischen und oxidativen Stress	Verstärkt Tsa1p an der Zelloberfläche; jedoch verhält sich Deletionsstamm wie Reversionsstamm
Sho1p	- Adapterprotein - Adaption an oxidativen Stress, Morphogenese	Wie SC5314
Msb2p	- Mucin Familie - Möglicher Sensor von Zellwandschäden - Hyphenwachstum, Zellwandbiogenese - kontrolliert Aktivierung der Cek1 MAPK	Beim Deletionsstamm ist Tsa1p in großen Mengen an der Zelloberfläche, Reversionsstamm wie SC5314, siehe 5.2.1.4
Tec1p	- Transkriptionsfaktor der TEA/ATTS Familie - Reguliert hyphale Entwicklung	Wie SC5314
Tup1p	- Transkriptioneller Repressor - Unterdrückt Hyphenbildung	Mehr Tsa1p an der Zelloberfläche als bei SC5314, auch bei ü.N.-Kultur
Nrg1p	- Transkriptionsfaktor mit Zinkfinger-Domäne - Reprimiert Hyphen-spezifische Gene	Tsa1p bei ü.N.-Kultur an Zelloberfläche (einziger getesteter Zeitpunkt)
Chk1p	- „Zwei-Komponenten“-Histidin-Kinase - Reguliert Zellwandbiogenese	Wie SC5314
Yak1p	- Serin-Threonin Kinase - Reguliert hyphales Wachstum	Deletionsstamm und Reversionsstamm verhalten sich wie SC5314
Hst6p	- ABC Transporter - Homolog von ScSte6p (Pheromon-Transporter)	Im Deletionsstamm ist im Vergleich zum Reversionsstamm sehr viel mehr Tsa1p an der Zelloberfläche, siehe 5.2.1.5
Sap9p	- Sekretierte Aspartyl Proteinase - Zellintegrität und Adhäsion	Wie SC5314

5.2.1.1 Ras1p

Die Signaltransduktions-GTPase Ras1p reguliert den cAMP/PKA Signalweg und wirkt ebenfalls oberhalb der *CEK1* MAP-Kinase. Ras1p ist ein Regulator des hyphalen Wachstums: eine dominant-negative Ras1-Mutation [Ras1(A16)] führt zu Defekten bei der Filamentbildung während eine dominant-aktive Mutation [Ras1(V13)] die Bildung von Hyphen verstärkt (Feng et al. 1999). Tsa1p Lokalisation an die Zelloberfläche wurde bei der dominant-aktiven sowie der dominant-negativen Mutation von Ras1p überprüft. Beide Stämme wurden in YPD-Medium kultiviert, zur jeweiligen Zellverdopplung (ZV) biotinyliert und Oberflächen-assoziiertes Tsa1p wurde wie beschrieben mittels Streptavidin-POD im Western Blot sichtbar gemacht. Abb. 18 zeigt die Western Blot Membranen beider Stämme inkubiert mit Streptavidin-POD. Die Menge an Gesamt-Tsa1p war zu allen getesteten Zeitpunkten gleich groß (Daten nicht gezeigt). Weder die dominant-aktive [Ras1(V13)] Mutation noch die dominant-negative [Ras1(A16)] Mutation von Ras1p hatten einen grossen Einfluss auf die Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche. Vergleicht man jeweils die Menge an Oberflächen-assoziiertem Tsa1p der Mutantenstämmen mit der von Zellen des Stammes SC5314 zur zweiten Zellverdopplung (ZV), so waren die Mengen in etwa gleich groß. Nach dem Umsetzen in frisches Medium (1. ZV und 60 min* nach der 3. ZV) zeigten beide Mutantenstämmen eine verstärkte Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche, wie dies schon bei SC5314 gezeigt wurde. Beide Mutationen von Ras1p scheinen lediglich einen Einfluss auf die Lokalisation von Tsa1p bei der stationären Phase zu haben, da in der Übernachtskultur ebenfalls Tsa1p an der Zelloberfläche detektierbar war. Dies war bei der dominant-negativen [Ras1(A16)] Mutation von Ras1p etwas deutlicher ausgeprägt.

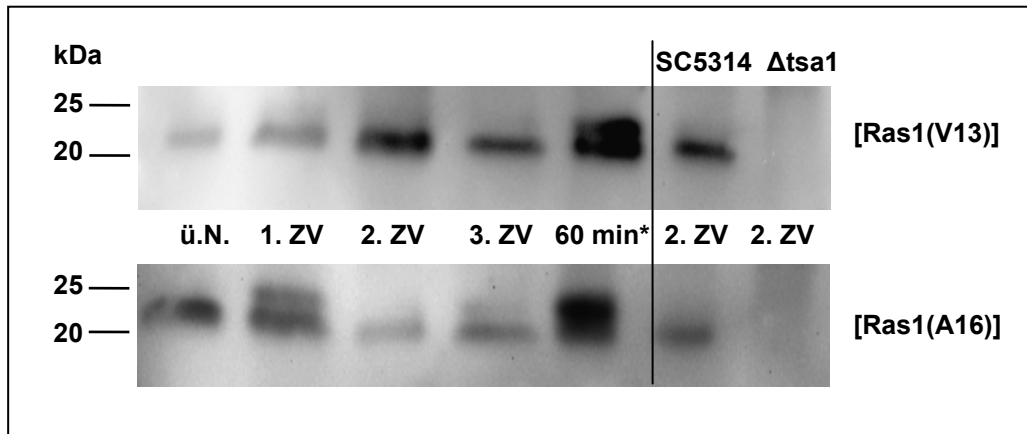


Abb. 18: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei *ras1* - Mutanten

Western Blot inkubiert mit Streptavidin-POD. Zellen wurden nach jeder Zellverdopplung (ZV), bzw. 60 min* nach der 3. ZV in frischem Medium biotinyliert. Weder die dominant-aktive [Ras1(V13)], noch die dominant-negative [Ras1(A16)] Mutation von *RAS1* hatten einen großen Effekt auf die Zelloberflächenlokalisierung von Tsa1p, wie der Vergleich mit Wildtypzellen des Stammes SC5314 zur zweiten ZV zeigen. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.2.1.2 Pde2p

Pde2p ist eine Phosphodiesterase, die benötigt wird, um den cAMP Gehalt der Zelle zu regulieren. Die Deletion des Gens bewirkt einen erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle und dadurch eine verstärkte Aktivierung des PKA Signalwegs. Dies führt zu einer verstärkten Sensitivität des Stammes gegenüber Zellwand-schädigenden Agenzien sowie zu einer Reduzierung der Zellwanddicke durch Veränderung der Ergosterol- und Glucan-Zusammensetzung (Jung et al. 2005).

Abb. 19 zeigt Oberflächen-assoziiertes Tsa1p detektiert mit Streptavidin-POD. Im $\Delta pde2$ Stamm war zu allen getesteten Zeitpunkten der Zeitreihe eine verstärkte Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche zu beobachten. Im Vergleich dazu verhielt sich der Reversionsstamm $\Delta pde2$ -*PDE2* wie der Wildtypstamm SC5314, der eine transiente Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche aufweist. Die Gesamtmenge an Tsa1p war bei beiden Stämmen zu den getesteten Zeitpunkten jeweils gleich groß (Daten nicht gezeigt).

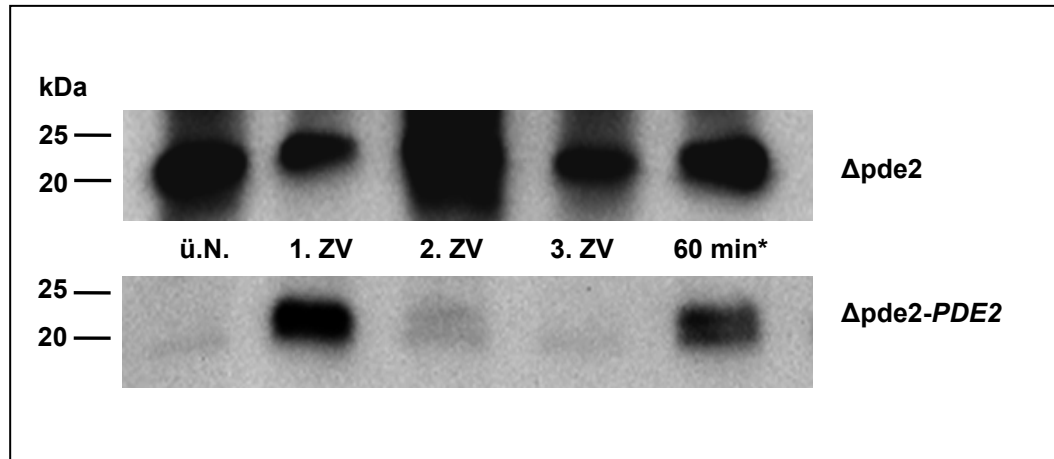


Abb. 19: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei *pde2* - Mutanten

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD. Zellen wurden nach jeder Zellverdopplung (ZV), bzw. 60 min* nach der 3. ZV in frischem Medium biotinyliert. Der $\Delta pde2$ -Stamm zeigt im Vergleich zum $\Delta pde2$ -*PDE2* Reversionsstamm eine verstärkte Tsa1p-Oberflächenlokalisierung. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.2.1.3 Efg1p

Der Transkriptionsfaktor Efg1p spielt eine zentrale Rolle bei der Morphogenese von *C. albicans* (Doedt et al. 2004). Eine Deletion von *EFG1* führt zur Veränderung der Zellwandzusammensetzung in Blastosporen sowie Hyphen (Korting et al. 2003, Lo et al. 1997, Sohn et al. 2003). Frühere Ergebnisse haben gezeigt, dass Tsa1p im $\Delta efg1$ Stamm nicht mehr in der Lage ist, an die Zelloberfläche zu lokalisieren (Urban et al. 2005). Es wurde angenommen, dass für die Oberflächenlokalisierung entweder die Hyphenform, *EFG1* oder beides notwendig ist. Diese Versuche wurden jedoch mit Zellen der stationären Phase durchgeführt. Da durch Zeitreihen von Wildtypzellen in YPD-Medium bereits gezeigt wurde, dass Tsa1p auch in Blastosporen in der Lage ist, an die Zellwand zu lokalisieren, wurden Zeitreihen mit dem $\Delta efg1$ Stamm durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung von *EFG1* auch zu den frühen Phasen des Wachstums zu untersuchen. Zeitreihen wurden sowohl in YPD sowie α -MEM-Medium durchgeführt. Abb. 20 zeigt die mit Streptavidin-POD inkubierten Western Blot Membranen, um Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p sichtbar zu machen. Es zeigte sich, dass die Zellen des $\Delta efg1$ Stammes das gleiche transiente Muster der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung wie die Zellen des Wildtypstammes SC5314 in YPD-Medium aufweisen. Die Mengen an Oberflächen-Tsa1p zur zweiten Zellverdopplung (ZV) waren ebenfalls vergleichbar mit denen der Wildtypzellen SC5314. Interessanterweise traf dieses transiente Lokalisationsmuster auch für Zellen zu, die

in α -MEM-Medium kultiviert wurden. In α -MEM-Medium war Tsa1p bei Wildtypzellen ständig an der Oberfläche lokalisiert (siehe 5.1.2). Dies erklärt die Diskrepanz zu früheren Ergebnissen, bei denen Tsa1p im Δ efg1 Stamm nicht an der Oberfläche zu detektieren war, denn es wurden lediglich späte Zeitpunkte der Wachstumsphase untersucht. Die Menge an Gesamt-Tsa1p der Zellen war bei den Stämmen zu allen getesteten Zeitpunkten gleich groß (Daten nicht gezeigt).

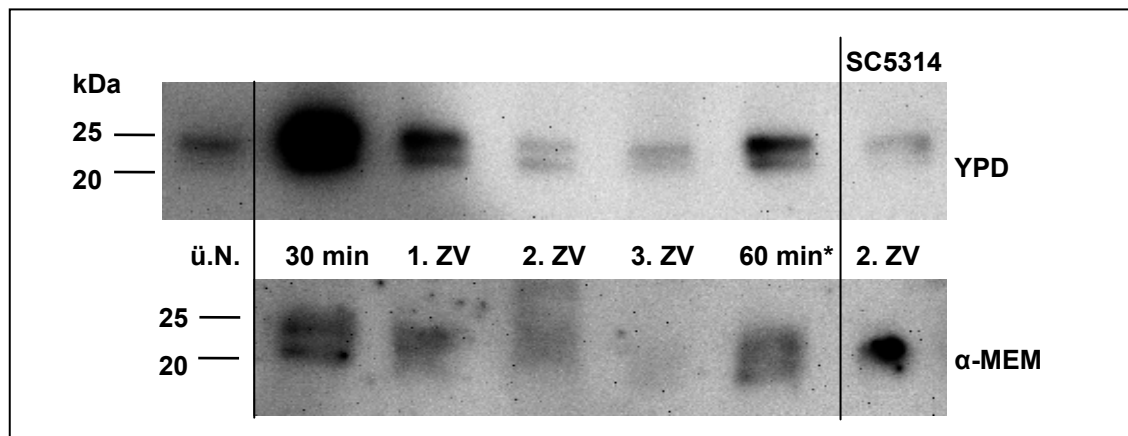


Abb. 20: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei *efg1* - Mutanten

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD. Zellen wurden nach jeder Zellverdopplung (ZV), bzw. 60 min* nach der 3. ZV in frischem Medium biotinyliert. Zeitreihen wurden in YPD-Medium (oben) und in α -MEM Medium (unten) durchgeführt. Der Δ efg1-Stamm weist das gleiche transiente Lokalisationsmuster von Tsa1p in YPD-Medium auf wie der Wildtyp SC5314. Die Mengen von Tsa1p an der Zelloberfläche waren auch gleich groß, wie ein Vergleich der beiden Stämme zur zweiten ZV zeigte. In α -MEM Medium wiesen die Zellen des Δ efg1 Stammes ebenfalls ein transientes Lokalisationsmuster auf. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.2.1.4 Msb2p

Das Mucin Msb2p wird als möglicher Sensor von Zellwandschäden beschrieben, das die Aktivierung der CEK1 MAPK zusammen mit Sho1p kontrolliert. Msb2p wird für die Zellwandbiogenese benötigt und spielt eine Rolle beim Hyphenwachstum (Roman et al. 2009).

Abb. 21 zeigt Oberflächen-assoziiertes Tsa1p detektiert mit Streptavidin-POD. Im Δ msb2 Stamm war zu allen getesteten Zeitpunkten der Zeitreihe eine gleich bleibend starke Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche zu beobachten. Im Vergleich dazu verhielt sich der Reversionsstamm Δ msb2-MSB2 eher wie der Wildtypstamm SC5314: die Menge an Oberflächen-Tsa1p nahm im Vergleich zur ersten Zellverdopplung ab. Allerdings war im Δ msb2-MSB2-Stamm bei der Übernachtskultur ebenfalls Tsa1p an der Zelloberfläche detektierbar. Die Gesamtmenge an Tsa1p war

bei beiden Stämmen zu den getesteten Zeitpunkten jeweils gleich groß (Daten nicht gezeigt).

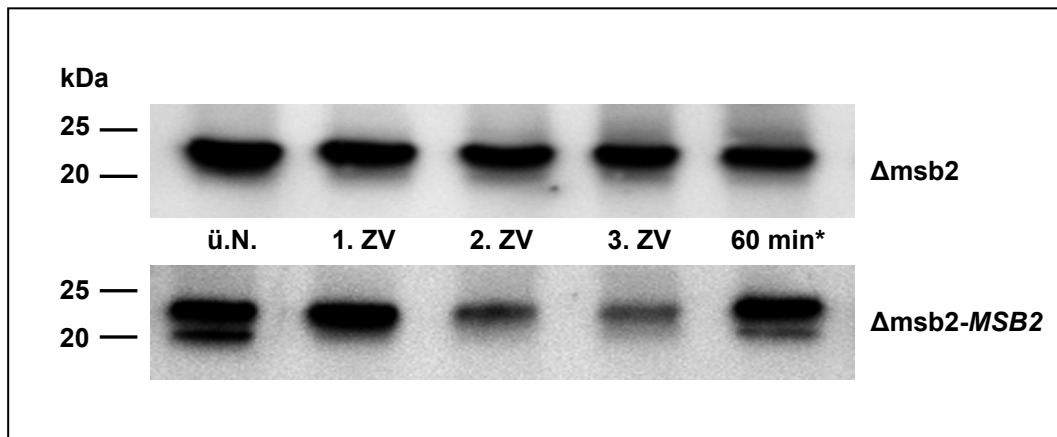


Abb. 21: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei *msb2* - Mutanten

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD. Zellen wurden nach jeder Zellverdopplung (ZV), bzw. 60 min* nach der 3. ZV in frischem Medium biotinyliert. Der Δ msb2-Stamm zeigt im Vergleich zum Δ msb2-MSB2 Reversionsstamm eine gleich bleibend starke Tsa1p-Oberflächenlokalisation zu allen getesteten Zeitpunkten. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.2.1.5 Hst6p

Das *C. albicans* Protein Hst6p ist ein ABC-Transporter. Es ist das funktionelle Homolog zu Ste6p aus *S. cerevisiae*, einem ABC-Transporter, der für die Sekretion des α -Faktors verantwortlich ist. Der α -Faktor ist ein 12 Aminosäuren umfassendes mating-Pheromon von *S. cerevisiae*. Dieses Peptid besitzt keine Signalsequenz, wird aber trotzdem von den Zellen sekretiert. Der Membrantransporter Ste6p ist für die Translokation des Peptids durch die Plasmamembran verantwortlich (Ketchum et al. 2001). Es stellte sich die Frage, ob das Homolog Hst6p möglicherweise für die Translokation von Tsa1p an die Zelloberfläche verantwortlich sein könnte.

Abb. 22 zeigt Oberflächen-assoziiertes Tsa1p detektiert mit Streptavidin-POD. Im Δ hst6 Stamm war zu allen getesteten Zeitpunkten sehr viel Tsa1p an der Oberfläche lokalisiert, die Menge war über den Zeitraum hinweg konstant sehr groß. Im Vergleich dazu war die Menge von Tsa1p an der Zelloberfläche im Δ hst6-HST6 Reversionsstamm geringer und entsprach in etwa den Mengen, die bei Wildtypzellen zur zweiten Zellverdopplung beobachtet werden konnten. Die Gesamtmenge an Tsa1p war bei beiden Stämmen zu den getesteten Zeitpunkten jeweils gleich groß (Daten nicht gezeigt).

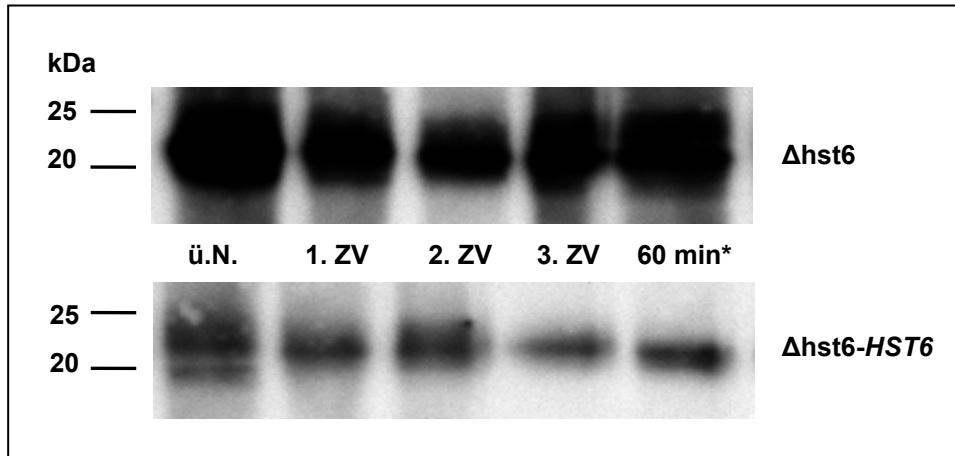


Abb. 22: Zelloberflächen-assoziiertes Ts1p bei *hst6* - Mutanten

Western Blot detektiert mit Streptavidin-POD. Zellen wurden nach jeder Zellverdopplung (ZV), bzw. 60 min* nach der 3. ZV in frischem Medium biotinyliert. Der $\Delta hst6$ -Stamm zeigt im Vergleich zum $\Delta hst6$ -*HST6* Reversionsstamm eine verstärkte Ts1p-Oberflächenlokalisierung zu allen getesteten Zeitpunkten. (*) bedeutet der Zeitpunkt 60 min nach erneutem Umsetzen der Zellen in frisches Medium.

5.2.2 Molekulare Determinanten der Ts1p-Oberflächenlokalisierung

Basierend auf Literaturstudien wurden zwei Domänen von Ts1p auf ihre Funktion beim Transport von Ts1p an die Zelloberfläche untersucht: der C-Terminus und das katalytische Zentrum des Proteins.

Für humanes Ts1p (hTs1p) wurde beschrieben, dass es mit der Plasmamembran von Erythrozyten interagiert (Cha et al. 2000). Diese Interaktion ist abhängig vom C-Terminus des Proteins: eine Sequenz bestehend aus 13 Aminosäuren bindet an die Phospholipidschicht der Membran. Die Lokalisation von hTs1p scheint abhängig von der Spaltung des C-Terminus zu sein. Dabei hat der C-Terminus weder einen Einfluss auf die Oligomerisierung des Proteins noch dessen katalytische Aktivität, was auf eine primäre Funktion des C-Terminus zur Lokalisation des Proteins hindeutet. Es sollte untersucht werden, ob in CaTs1p ebenfalls der C-Terminus an der Translokation des Proteins an die Zelloberfläche beteiligt ist und ob eine Deletion des C-Terminus einen Einfluss auf Oligomerisierung und die katalytische Aktivität des Proteins hat.

In *S. cerevisiae* fungiert Ts1p entweder als Peroxidase oder als Chaperon. Wenn der Organismus oxidativem Stress ausgesetzt ist, kommt es zu einer reversiblen Oligomerisierung von Ts1p, für die die beiden katalytisch aktiven Cysteine des Proteins benötigt werden. Diese Oligomerisierung tritt auch unter Hitzestress auf, jedoch werden hierfür die aktiven Cysteine nicht benötigt (Jang et al. 2004).

Demnach scheint Tsa1p in *S. cerevisiae* eine Funktion zu haben, die unabhängig von den katalytisch aktiven Cysteinen ist.

Es sollte überprüft werden, ob die katalytisch aktiven Cysteine für eine Funktion des Proteins an der Zellwand von *C. albicans* benötigt werden und ob diese an der Lokalisation des Proteins dorthin beteiligt sind.

5.2.2.1 Einbringen gezielter Punktmutationen in TSA1

Gezielte Punktmutationen wurden Plasmid-basiert in *TSA1* eingebracht und anschließend das mutierte *TSA1* in den Δ tsa1 Stamm Can292 integriert (siehe 4.2.23).

In *C. albicans* liegen die katalytisch aktiven Cysteine des Proteins an Aminosäureposition 47 und 168; diese wurden durch Serin ausgetauscht. Es wurden jeweils die Einzelmutanten C47S und C168S hergestellt, sowie die Doppelmutante C47/168S. Ebenfalls wurde der C-Terminus des Proteins durch Einfügen eines Stop-Codons an Aminosäureposition 184 deletiert.

Abb. 23 zeigt die Basenabfolge von *TSA1*. Die Positionen, an denen Basen verändert wurden, um die gewünschten Mutationen zu erzeugen, sind hervorgehoben. Aus TGC (Cystein) an Position 47 wurde TCC (Serin), an Position 168 wurde aus TGT (Cystein) TCT (Serin) und an Position 184 wurde statt GAA (Glutamat) ein Stopcodon TAA eingefügt.

```

ATGGCTCCAGTCGTTCAACAACCAGCTCCAAGTTTCAAGAAAACCGCCGTCGTTGATG
GTGTCTTTGAAGAAGTCACTTTAGAACAATACAAAGGTAATGGGTCTTGTGGCCTT
TATCCATTGGCCTTACATTCGTCTGCCCATCAGAAATTATTGCTTATTCCGAAGCT
GTAAAGAAATTTGCCGAAAAGGATGCTCAAGTTTGTGGCCTCTACTGACTCCGAAT
ACACCTGGTTGGCTTGGACCAATGTCGCCAGAAAAGACGGTGGTATTGGCAAAGTCG
ACTTCCAGTCTTGGCTGACACCAACCACTCCTTGTCCAGAGACTACGGTGTCTTAATT
GAAGAAGAAGGTGTTGCCTTGAGAGGTATTTTCTTGATTGATCCAAAGGGTGTCTTGA
GACAAATCACCATCAATGACTTGCCAGTCGGTAGATCTGTTGAAGAATCCTTGAGATT
GTTGGAGGCTTCCAATCACTGAAAAATACGGTGAAGTTTGTCCAGCTAACTGGCA
CCCAGGTGATGAAACCATCAAGCCAAGCCCAGAAGCATCCAAGGAATACTTCAACA
AAGTCAACAAATAA

```

Abb. 23: Basenabfolge von TSA1

Es wurden gezielte Punktmutationen in *TSA1* eingefügt, um u.a. deren Beteiligung an der Lokalisation des Proteins zu untersuchen: Austausch von Cystein gegen Serin an den Positionen 47 und 168 (jeweils Einzelmutanten und Doppelmutante) sowie Deletion des C-Terminus durch Einfügen eines Stopcodons an Position 184. Die betroffenen Aminosäuretripletts sind hervorgehoben.

Nach Erzeugung der Mutationen wurden die resultierenden Stämme auf korrekte Reintegration der Sequenz in das Genom mittels Southern Blot überprüft. Von den hergestellten Stämmen mit mutiertem *TSA1* wurden jeweils zwei bis drei unabhängige Transformanden auf die korrekte ektopische Reintegration in den RP10-Lokus von *C. albicans* überprüft. Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Die verwendete Sonde, um *TSA1* im Genom nachzuweisen, wurde mittels der in Tab. 10 angegebenen Oligonukleotide gewonnen. Abb. 24 zeigt den Southern Blot mit den überprüften Stämmen. Die Sonde ergab für den Wildtyp SC5314 eine Bande bei 1864 bp (Spur 1). Für den Δ tsa1 Stamm Can292 ergab sich eine Bande bei 1273 bp (Spur 2), was der Wildtypbande minus der Größe von *TSA1* (591 bp) entspricht. Diese Bande ist auch bei den Revertanten zu erkennen, da der Δ tsa1 Stamm der Ausgangsstamm für die Reintegration war und mutiertes *TSA1* mittels des Plasmids pCaEXP ektopisch in den RP10-Lokus des Genoms eingebracht wurde. Für die korrekte Reintegration des Plasmids in den RP10-Lokus ergab sich eine Bande bei 4803 bp. Spuren 3-5 entsprechen Transformanden, die *TSA1* mit deletiertem C-Terminus enthalten, Spuren 6 und 7 die mit der C47S Mutation, Spuren 8-10 C168S und Spuren 11-13 die der Doppelmutante C47/168S.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde jeweils nur mit einem der Stämme pro Mutation weitergearbeitet. Dies waren Δ tsa1-*TSA1*-AS184 (Spur 3), Δ tsa1-*TSA1*-C47S (Spur 6), Δ tsa1-*TSA1*-C168S (Spur 8) und Δ tsa1-*TSA1*-C47/168S (Spur 11).

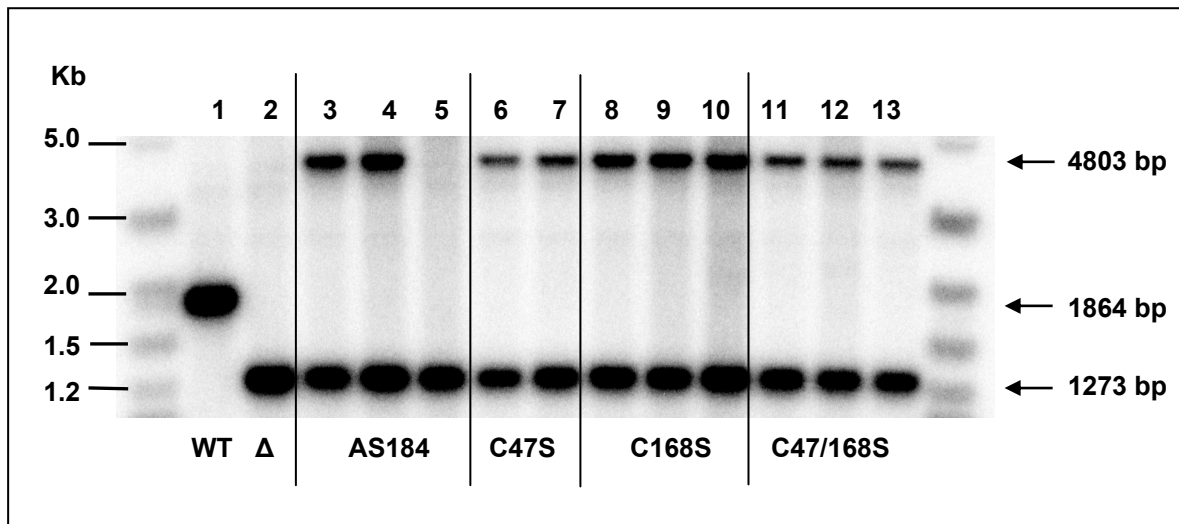


Abb. 24: Southern Blot der Reintegration von mutiertem *TSA1*

Genomische DNA der einzelnen Stämme wurde mit *EcoRI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Für wildtypisches *TSA1* des Stammes SC5314 (Spur 1) ergab sich daraus eine Bande von 1864 bp, für den Δ *tsa1* Stamm Can292 (Spur 2) bei 1273 bp, da die 591 bp von *TSA1* fehlen. Die mit mutiertem *TSA1* rekonstituierten Stämme weisen ebenfalls die Bande bei 1273 bp auf und haben zusätzlich durch die ektopische Reintegration in den PR10-Lokus noch eine Bande bei 4803 bp. Spuren 3-5 entsprechen drei unabhängigen Transformanten mit *TSA1* mit deletiertem C-Terminus, Spuren 6 und 7 zwei Transformanten mit der C47S Mutation im *TSA1* Gen, Spuren 8-10 denen mit C168S und Spuren 11-13 die Doppelmutanten C47/168S.

Die Expression des mutierten *TSA1* Gens in den rekonstituierten Stämmen wurde ebenfalls mittels Northern Blot überprüft. Das mutierte Gen wurde in allen Stämmen gleichmäßig gut exprimiert (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.2 *TSA1*-Mutanten sind katalytisch inaktiv

Tsa1p wird unter anderem in der Zelle benötigt, um H_2O_2 und dessen Abbauprodukte unschädlich zu machen. Von ScTsa1p Cys/Ser - Mutanten ist bekannt, dass das Cystein an Position 47, aber nicht das an Position 170 für die katalytische Aktivität essentiell ist (Chae et al. 1994). Bei hTsa1p hatte die Deletion des C-Terminus keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins (Cha et al. 2000). Um dies für CaTsa1p zu überprüfen, wurden die in 5.2.2.1 erzeugten Stämme mit mutiertem *TSA1* auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht.

Hierfür wurden die Stämme über Nacht in YPD-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden die Stämme auf eine Zellzahl von 10^5 eingestellt, in Verdünnungsreihen entweder auf YPD-Platten (Abb. 25 A) oder auf YPD-Platten mit 5 mM H_2O_2 (Abb. 25 B) aufgebracht und bei 30°C inkubiert. Die Stämme zeigten auf YPD-Medium alle ein

gleichmäßig gutes Wachstum. Wurden die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt, so waren nur der Stamm *CAI4-URA3* (Spur 1) und der mit wildtypischem *TSA1* rekonstituierte Stamm *Can315* (Spur 3) in der Lage unter diesen Bedingungen zu wachsen. Der $\Delta tsa1$ Stamm *Can312* (Spur 2) konnte unter oxidativem Stress nicht mehr wachsen. Gleiches galt auch für die Stämme mit mutiertem *TSA1*: weder die C47S (Spur 4) noch die C168S (Spur 5) oder die C47/168S (Spur 6) Mutation im *TSA1*-Gen erlaubten es, dem jeweiligen Stamm unter oxidativem Stress zu wachsen. Auch wenn der C-Terminus des Proteins deletiert ist, kam es zu einer verstärkten Sensitivität des Stammes gegenüber H_2O_2 (Spur 7).

Alle mutierten Formen von *TSA1* zeigten denselben Phänotyp wie der $\Delta tsa1$ Stamm auf, waren demnach katalytisch inaktiv.

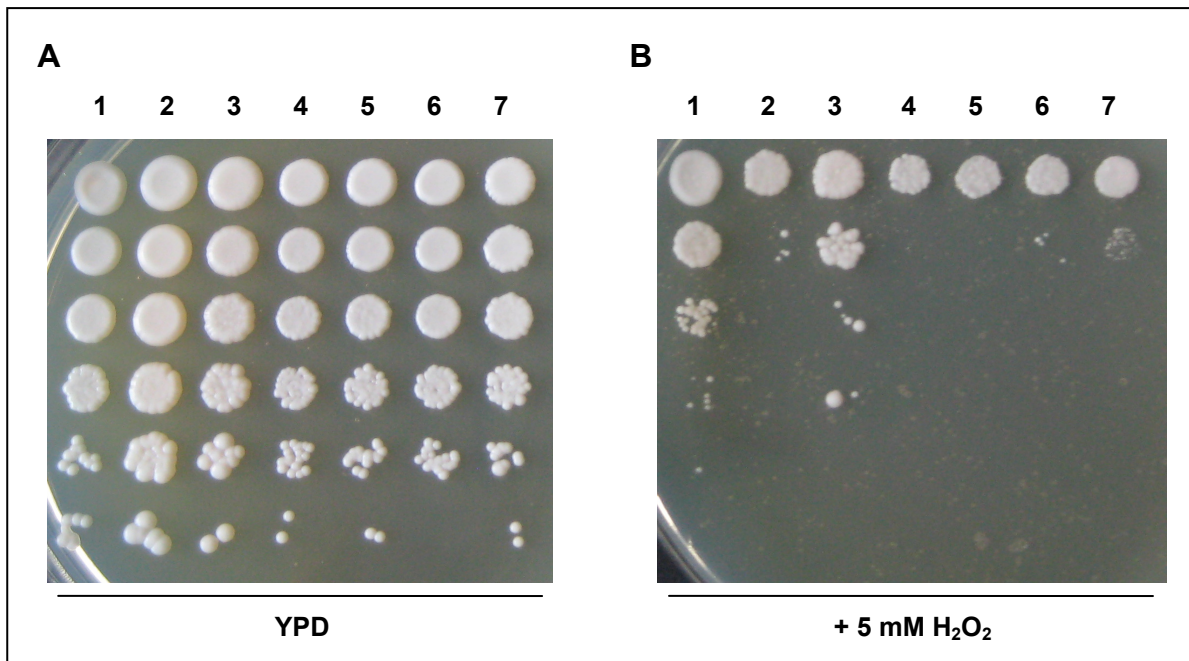


Abb. 25: Mutiertes Tsa1p ist katalytisch inaktiv

Die unter 5.2.2.1 hergestellten *TSA1*- Mutanten des aktiven Zentrums bzw. die Mutante mit deletiertem C-Terminus wurden auf YPD (A) und YPD-Medium mit 5 mM H_2O_2 (B) in Verdünnungsreihen mit Faktor 10 beginnend mit 10^5 Zellen ausplattiert. Spur 1: *CAI4-URA3*, Spur 2: $\Delta tsa1$ Stamm *Can312*, Spur 3: mit wildtypischem *TSA1* rekonstituierter Stamm *Can315*, Spur 4: C47S Mutante, Spur 5: C168S Mutante, Spur 6: C47/168S Mutante, Spur 7: AS184 Mutante. Unter oxidativem Stress weisen die Mutanten des aktiven Zentrums und der Stamm mit *Tsa1p* mit deletiertem C-Terminus denselben Phänotyp wie der $\Delta tsa1$ Stamm auf. Die Mutanten sind demnach katalytisch inaktiv.

Für die Stämme mit mutiertem *Tsa1p* wurden Wachstumskurven aufgenommen, um festzustellen, ob die Mutationen einen Einfluss auf die Teilungsrate der Zellen in flüssigem Medium haben. In Abb. 26 sind die Wachstumskurven dargestellt. Der

Wildtypstamm SC5314, der $\Delta tsa1$ Stamm Can312 und der mit wildtypischem *TSA1* rekonstituierte Stamm Can315 zeigten annähernd gleiche Wachstumsraten. Alle drei Mutanten des aktiven Zentrums (C47S, C168S und C47/168S), der Stamm mit Tsa1p mit deletiertem C-Terminus (AS184) und der Ausgangsstamm CAI4-*URA3* zeigten eine etwas geringere Wachstumsrate. Für die einzelnen Stämme ergaben sich dabei zwischen den Zeitpunkten 0 und 9 Stunden die folgenden Teilungsraten: SC5314 – 0,607, CAI4-*URA3* – 0,537, $\Delta tsa1$ – 0,602, $\Delta tsa1$ -*TSA1* – 0,583, C47S – 0,496, C168S – 0,532, C47/168S – 0,521, AS184 – 0,503. Nach 24 h Wachstum erreichten die Zellen aller getesteten Stämme eine Optische Dichte (600 nm) zwischen 8,0 und 9,2 (Daten nicht gezeigt).

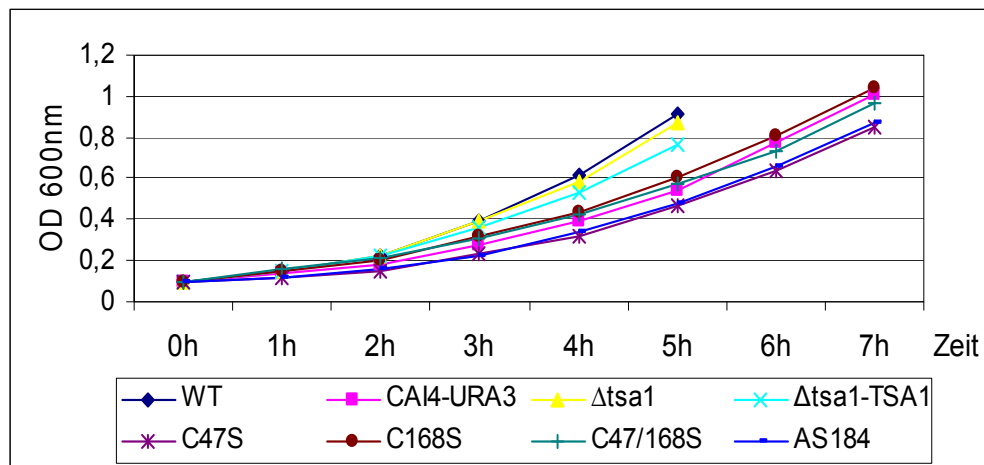


Abb. 26: Wachstumskurven der *TSA1*-Mutanten

Ausgehend von einer Optischen Dichte (600 nm) von 0,1 wurde nach jeder Stunde bis 24 h die OD_{600nm} gemessen und Wachstumskurven erstellt. Die Mutanten des aktiven Zentrums (C47S, C168S und C47/168S), der Stamm AS184 (deletierter C-Terminus von Tsa1p) und der Stamm CAI4-*URA3* (Ausgangsstamm für alle Mutationen) zeigten anfangs ein etwas langsames Wachstum als der Wildtypstamm SC5314, der $\Delta tsa1$ Stamm Can312 und der mit wildtypischem *TSA1* rekonstituierte Stamm Can315.

5.2.2.3 Fähigkeit zur Ausbildung multimerer Komplexe wird beeinflusst

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die beiden Cysteine von ScTsa1p in oxidiertem Zustand intermolekulare Disulfidbrücken mit den Cysteinen eines zweiten ScTsa1p ausbilden können (Chae et al. 1994). Somit existiert Tsa1p vorwiegend als Dimer in der Zelle, ist aber unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage, multimere Strukturen auszubilden (Jang et al. 2004, Wood et al. 2002). Bei ScTsa1p Cys/Ser-Mutanten wurde beobachtet, dass beide Cysteine des Proteins benötigt werden, damit das Protein dimere Strukturen ausbilden kann (Chae et al. 1994). Ähnliches

wurde bei hTsa1p beobachtet. Eine Deletion des C-Terminus hatte bei hTsa1p hingegen keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins, multimere Strukturen auszubilden (Cha et al. 2000).

Auch in *C. albicans* kann CaTsa1p über die beiden Cysteine Disulfidbrücken ausbilden und somit multimere Strukturen ausbilden (Urban et al. 2005). Die in 5.2.2.1 erzeugten Tsa1p-Mutantenstämme (Cys/Ser-Mutanten und deletierter C-Terminus) sollten auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, zu multimerisieren.

Hierfür wurden Zellen in YPD-Medium bei 30°C kultiviert. Nach der zweiten Zellverdopplung wurden die Zellen aufgeschlossen und je 10 µg Gesamtzellextrakt auf SDS-Gele aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde einmal unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt und einmal unter nicht-reduzierenden Bedingungen, wobei bestehende Disulfidbrücken erhalten bleiben. Die Gele wurden nachfolgend geblottet und die Membranen jeweils mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper inkubiert, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet ist.

Unter reduzierenden Bedingungen lag Tsa1p bei allen getesteten Stämmen als Monomer vor und war als eine Bande in Höhe von 21 kDa erkennbar (Abb. 27 A). Deutlich zu sehen war die durch Deletion der 12 Aminosäuren des C-Terminus entstandene Verringerung des Molekulargewichts um 1,46 kDa bei dem Stamm Δ tsa1-TSA1-AS184 (Spur 7).

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen blieben gebildete Disulfidbrücken erhalten (Abb. 27 B). Die Sämme CAI4-URA3 Can100 (Spur 1), der mit wildtypischem TSA1 rekonstituierte Stamm Can315 (Spur 3), sowie der Stamm Δ tsa1-TSA1-AS184 (Spur 7) waren in der Lage, multimere Strukturen auszubilden: im Bereich zwischen 35 und 45 kDa ergaben sich jeweils zwei Proteinbanden. Über die möglichen Kombinationsmöglichkeiten der Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken und deren unterschiedlichen Molekulargewichte wurde bereits berichtet (Chae et al. 1994). Die Tsa1p-Mutanten des aktiven Zentrums C47S (Spur 4), C168S (Spur 5) sowie die Doppelmutante C47/168S (Spur 6) konnten keine Multimere ausbilden und lagen auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen als Monomer vor. Ein Unterschied zwischen C47S und C168S konnte nicht festgestellt werden. Für den Δ tsa1 Stamm Can312 (Spur 2) konnte keine dieser Banden auf dem Gel nachgewiesen werden.

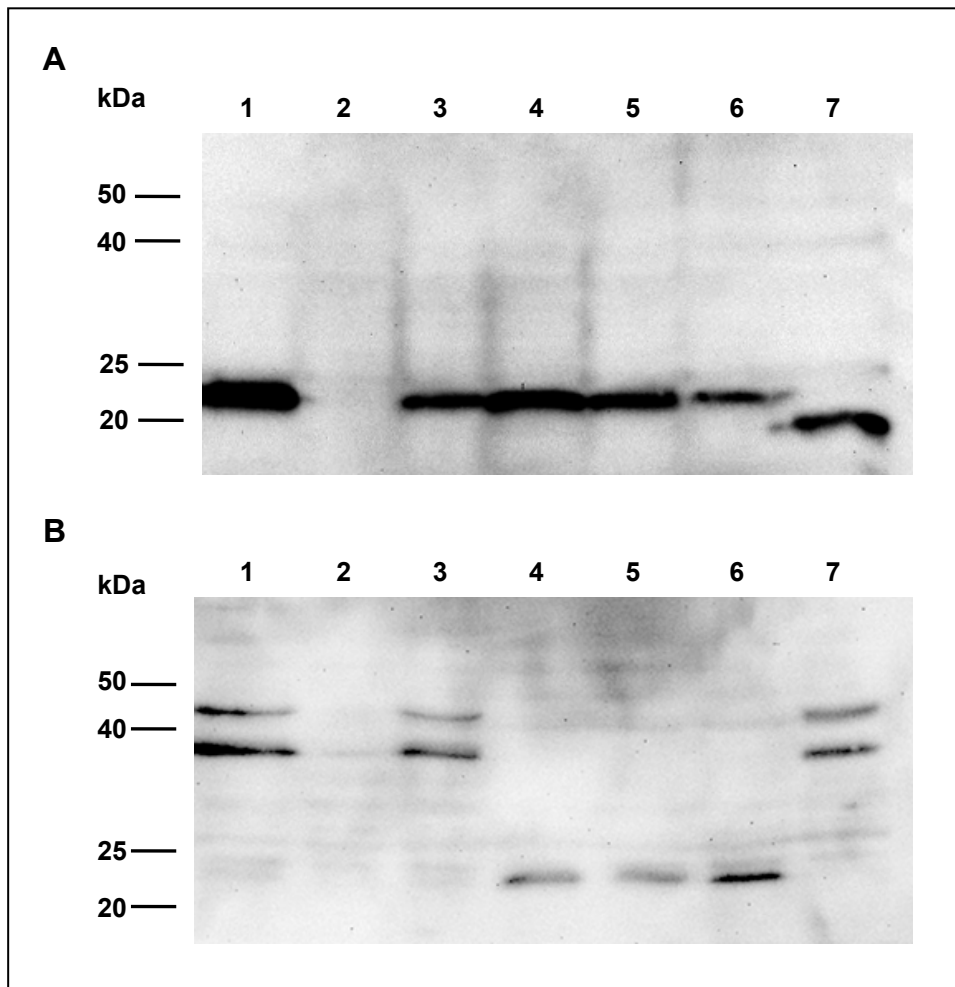


Abb. 27: Ausbildung multimerer Strukturen wird beeinflusst

10 µg Gesamtzellextrakte wurden entweder unter reduzierenden Bedingungen (A) oder nicht-reduzierenden Bedingungen (B) auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mittels des gegen den N-Terminus des Proteins gerichteten Anti-Tsa1p-Antikörpers detektiert. Spur 1: CAI4-URA3 Can100, Spur 2: Δ tsa1 Can312, Spur 3: Δ tsa1-TSA1 Can315, Spur 4: Δ tsa1-TSA1-C47S, Spur 5: Δ tsa1-TSA1-C168S, Spur 6: Δ tsa1-TSA1-C47/168S, Spur 7: Δ tsa1-TSA1-AS184. Unter reduzierenden Bedingungen lag Tsa1p als Monomer vor (21 kDa). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte Tsa1p multimeren Strukturen ausbilden (zwischen 35 und 45 kDa); lediglich die Mutationen des aktiven Zentrums erlaubten es Tsa1p nicht mehr, diese Strukturen auszubilden.

5.2.2.4 Mutationen haben einen Einfluss auf die Zelloberflächenlokalisierung

Die Mutationen des aktiven Zentrums sowohl der individuellen Cysteine wie auch beider Cysteine führten zur katalytischen Inaktivität von Tsa1p und verhinderten eine Oligomerisierung des Proteins. Um zu testen, ob die Redox-aktiven Cysteine, also ein katalytisch aktives Protein bzw. die Fähigkeit zur Ausbildung von multimeren Strukturen für die Lokalisation des Proteins an die Zelloberfläche benötigt werden, wurden die Zellen in YPD-Medium bis zur zweiten Zellverdopplung kultiviert,

Oberflächenproteine biotinyliert und nach dem Zellaufschluss Tsa1p mittels des Anti-Tsa1p-Antikörpers, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist, immunpräzipitiert. Die über SDS-PAGE aufgetrennten Immunpräzipitate wurden nach Transfer auf Membranen mit Streptavidin-POD bzw. mit Anti-Tsa1p-Antikörper analysiert (Abb. 28 A).

Gesamt-Tsa1p war in allen Proben enthalten, durch den Gen-Dosis-Effekt ist bei der Referenz SC5314 (Spur 4) mit insgesamt 4 Kopien *TSA1* mehr Tsa1p in den Zellen enthalten als bei den Mutanten des aktiven Zentrums (Spuren 1-3) mit jeweils nur einer Kopie. Tsa1p der Mutanten C47S (Spur 1), C168S (Spur 2) und der Doppelmutante C47/168S (Spur 3) war unter den getesteten Bedingungen nicht mehr an der Zelloberfläche detektierbar. Tsa1p der Wildtypzellen hingegen war wie unter diesen Bedingungen schon beschrieben an der Zelloberfläche zu finden.

Die Mutante, die eine Deletion des C-Terminus von Tsa1p aufweist, konnte mit dem Anti-Tsa1p-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist (AK-C) nicht detektiert werden, da eines der Erkennungspeptide des Antikörpers deletiert wurde. Zur Detektion des C-terminal deletierten Tsa1p wurde ein zweiter Antikörper generiert, der N-terminale Peptide von Tsa1p erkennt. Dieser AK-N kann natives Tsa1p nicht binden und ist somit nicht für den Einsatz in einer Immunfällung geeignet (siehe 4.2.8). Jedoch ist dieser Antikörper in der Lage, Tsa1p in denaturierter Form nach SDS-PAGE und Transfer auf Membranen zu binden. Daher musste Tsa1p-AS184 mittels einer anderen Methode an der Zelloberfläche detektiert werden. Nach der zweiten Zellverdopplung wurden Oberflächenproteine mittels Biotin markiert, im Anschluss alle mit Biotin markierten Proteine mittels Neutravidin-Sepharose aus dem Proteingemisch aufgereinigt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotten konnte Zellwand-assoziiertes Tsa1p mittels des AK-N detektiert werden. In Abb. 28 B ist dieser Western Blot dargestellt. Tsa1p von Zellen des Wildtypstammes SC5314 war an der Oberfläche zu finden (Spur 1), ebenso wie Tsa1p mit deletiertem C-Terminus (Spur 2). Zur Kontrolle wurden Zellen des Stammes mit der C47/168S Mutation in *TSA1* nochmals auf Zelloberflächenlokalisation getestet. Auch mittels dieser Aufreinigungsmethode konnte kein Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Spur 3). Der Δ tsa1-Stamm Can312 ergab ebenfalls kein Signal nach Inkubation der Membran mit dem AK-N (Spur 4).

Die Deletion des C-Terminus von Tsa1p hatte also folglich unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins an die Zelloberfläche.

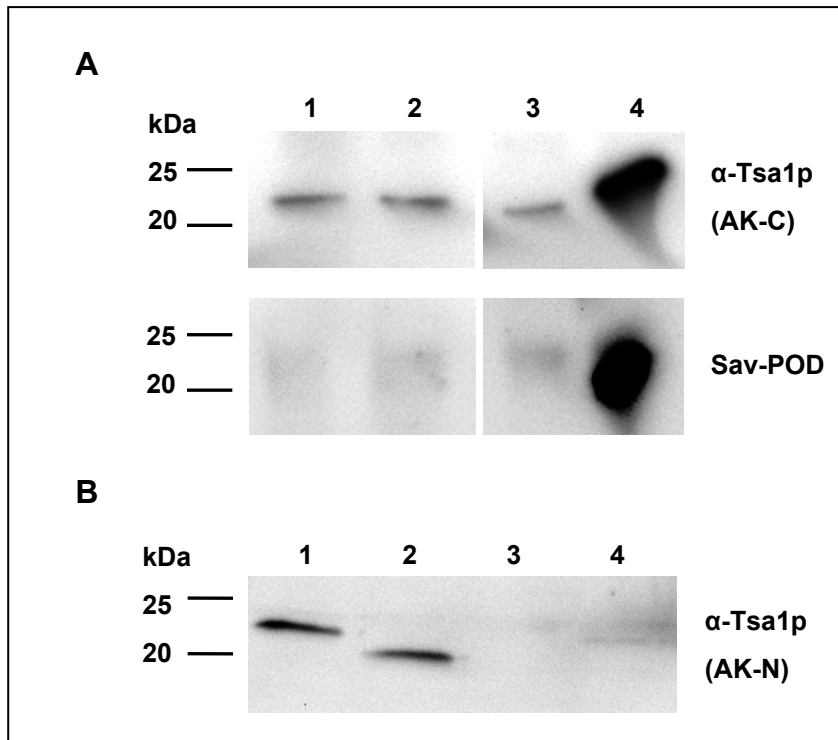


Abb. 28: Zelloberflächenlokalisierung von mutiertem Ts1p

(A) Western Blot detektiert mit dem Anti-Ts1p-Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist (AK-C). Ts1p mit Mutationen des aktiven Zentrums waren nicht in der Lage, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Spur 1: Δ tsa1-TSA1-C47S, Spur 2: Δ tsa1-TSA1-C168S, Spur 3: Δ tsa1-TSA1-C47/168S, Spur 4: SC5314.

(B) Biotinylierte Zelloberflächenproteine wurden mittels Neutravidin aufgereinigt, gelelektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mittels des Anti-Ts1p-Antikörpers, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet ist (AK-N) detektiert. Ts1p mit deletiertem C-Terminus konnte an die Zelloberfläche lokalisieren. Spur 1: SC5314, Spur 2: Δ tsa1-TSA1-AS184, Spur 3: Δ tsa1-TSA1-C47/168S, Spur 4: Δ tsa1 Can312.

5.3 Einfluss von Ts1p auf die Zellwand von *C. albicans* und die Immunantwort des Wirtes

Die Zellwand von *C. albicans* ist nicht nur Form- und Strukturgebend, sondern interagiert als äußerste Schicht des Organismus auch mit der Umgebung. Sie bildet somit die Kontaktstelle zwischen dem Pathogen und den Immunzellen des Wirtes. Als Hauptbestandteil der Zellwand dienen β -Glucane als antigene Strukturen, die von Rezeptoren der Immunzellen erkannt werden. Nach Erkennung eingedrungener Pathogene versuchen Immunzellen, diese unter anderem durch Phagozytose und die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abzutöten.

Im Folgenden sollten die *Candida*-Stämme mit unterschiedlich mutiertem Ts1p auf ihre Interaktion mit Immunzellen des Wirtes untersucht werden.

Für diese Versuche wurde als Modellsystem für Immunzellen die murine Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 verwendet. Teilweise kamen auch frisch isolierte humane Immunzellen (Neutrophile Granulozyten und Makrophagen) bzw. die Promyelozyten Zelllinie HL-60 zum Einsatz.

5.3.1 Tsa1p und die β -Glucan Exposition der Zellwand

Der Zellwandbestandteil β -Glucan macht etwa 50-60% der gesamten Zellwand von *C. albicans* aus (Arana et al. 2009). Immunzellen sind in der Lage, β -1,3-Glucan unter anderem durch den Rezeptor Dectin-1 zu erkennen. *C. albicans* Zellen maskieren aus diesem Grund das β -1,3-Glucan an ihrer Zellwand, um somit der Erkennung durch Immunzellen entgehen zu können. Exponiertes β -1,3-Glucan tritt normalerweise nur an den Knospungsnarben von Blastosporen auf, bei Hyphen ist es in der Regel gar nicht zugänglich (Gantner et al. 2005). Da Tsa1p ein Bestandteil der Zellwand ist, sollte untersucht werden, in wie weit dieses Protein einen Einfluss auf die Zusammensetzung, insbesondere der Exposition von β -1,3-Glucan an der Zellwand besitzt.

Um den Anteil an exponiertem β -1,3-Glucan der Zellwand verschiedener Stämme mit mutiertem Tsa1p zu bestimmen, wurden Zellen einer Übernachtskultur mit einem Anti- β -1,3-Glucan Antikörper inkubiert, welcher an zugängliches β -1,3-Glucan der *C. albicans* Zellwand bindet. Als sekundärer Antikörper wurde ein Fluoreszenzantikörper zur weiteren Analyse der Zellen verwendet.

Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie vermessen, wobei jeweils die Fluoreszenzintensität pro Zelle bestimmt wurde. Die β -1,3-Glucan Exposition von Zellen des Δ tsa1-Stammes, des Δ tsa1-*TSA1* Stammes sowie den unter 5.2.2.1 hergestellten Stämmen mit Punktmutationen in *TSA1* wurde bestimmt und mit der des Stammes CAI4-*URA3* verglichen. Als Negativkontrollen wurden die Zellen jeweils ohne primären und sekundären Antikörper inkubiert. Abb. 29 zeigt das Ergebnis der Durchflusszytometrie. Die Anzahl an fluoreszierenden Zellen in Prozent wurde gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die grüne Kurve in der Abbildung entspricht jeweils der Fluoreszenzintensität an Zellen des CAI4-*URA3* Stammes, die blaue die der Mutanten und die rote Kurve stellt nicht-markierte Zellen dar (Negativkontrolle). Es wurden jeweils vier biologische Replikate angefertigt, die Ergebnisse waren dabei jedes Mal übereinstimmend.

Der $\Delta tsa1$ -Stamm zeigte im Vergleich zum CAI4-*URA3* Stamm eine geringere β -1,3-Glucan Exposition an der Zellwand (Abb. 29 A). Im Reversionsstamm $\Delta tsa1$ -*TSA1* war ebenfalls weniger β -1,3-Glucan exponiert (Abb. 29 B). Die Cystein zu Serin Mutationen beider aktiven Cysteine in *TSA1* hatten zur Folge, dass im Vergleich zum CAI4-*URA3* Stamm etwas mehr β -1,3-Glucan an der Zelloberfläche zugänglich war (Abb. 29 C). Die Einzelmutante C47S zeigte geringfügig mehr, die C168S Mutante gleich viel β -1,3-Glucan an der Zellwand wie der CAI4-*URA3* Stamm (Daten nicht gezeigt). Wurde der C-Terminus von *TSA1* deletiert, so war bei den Zellen dieses Stammes im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen am meisten β -1,3-Glucan an der Zelloberfläche exponiert (Abb. 29 D).

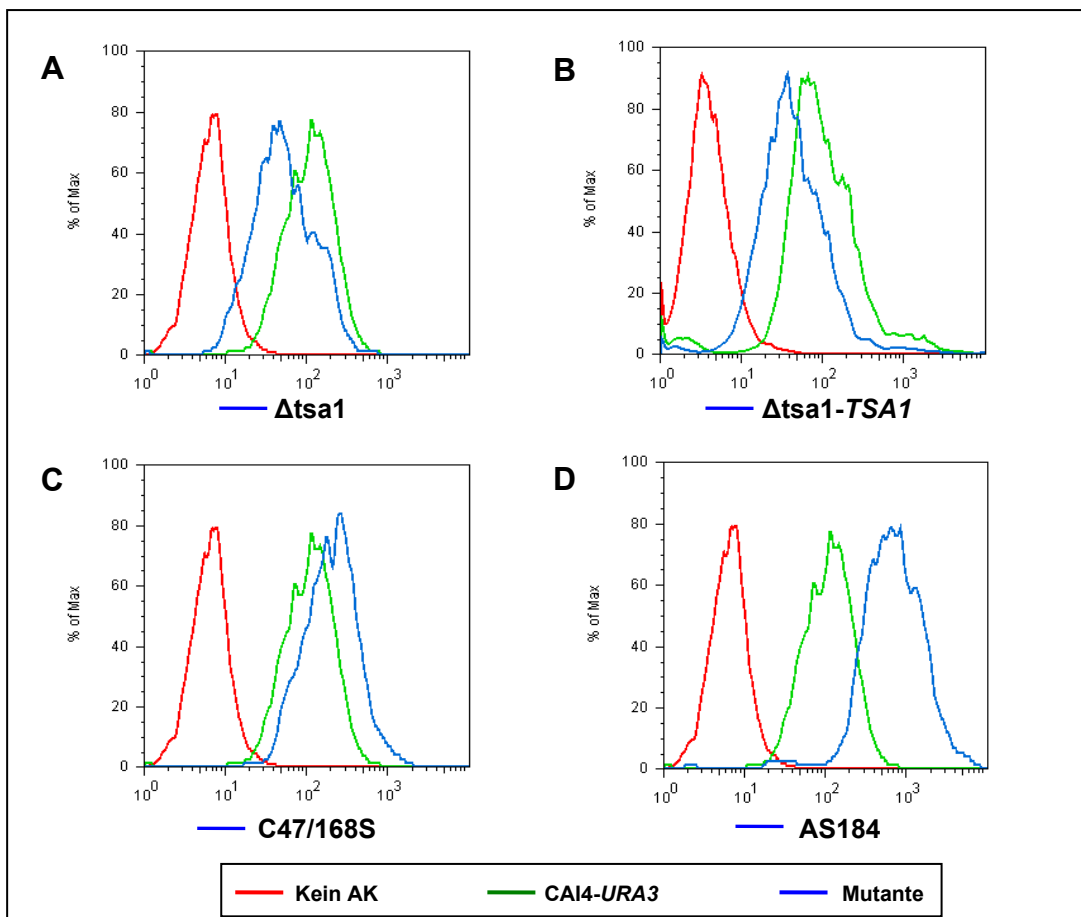


Abb. 29: Ermittlung der β -1,3-Glucan Exposition mittels Durchflusszytometrie

Zellen verschiedener Stämme wurden mit einem Anti- β -1,3-Glucan Antikörper inkubiert, um deren β -1,3-Glucan Exposition an der Zellwand zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie vermessen, wobei jeweils die Fluoreszenzintensität pro Zelle bestimmt wurde. Die Menge an fluoreszierenden Zellen in Prozent (Y-Achse) wurde gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse) aufgetragen. Die roten Kurven entsprechen Zellen, die ohne Antikörper inkubiert wurden. Grün entspricht der Fluoreszenzintensität von Zellen des Stammes CAI4-*URA3*. In blau dargestellt sind die Intensitäten der einzelnen Mutantenstämme. Der $\Delta tsa1$ Stamm (A) und der $\Delta tsa1$ -*TSA1* Stamm (B) exponieren weniger β -1,3-Glucan an ihrer Zelloberfläche, der Stamm C47/168S (C) etwas mehr und der Stamm AS184 (D) sehr viel mehr als der CAI4-*URA3* Stamm.

Die mit dem Glucan-Antikörper markierten Zellen wurden ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei konnten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie visuell bestätigt werden. Abb. 30 zeigt repräsentative Ausschnitte der hergestellten Zellpräparationen.

Bei den Stämmen CAI4-*URA3* (Abb. 30 B), Δ *tsa1* (Abb. 30 D) und C47/168S (Abb. 30 F) war deutlich erkennbar, dass sich die β -1,3-Glucan Exposition auf die Knospungsnarben der Blastosporen beschränkte. Bei Zellen des Stammes AS184 (Abb. 30 H) war nicht nur die deutlich verstärkte β -1,3-Glucan Exposition an der Zellwand zu erkennen; das β -1,3-Glucan war auch über die gesamte Zelloberfläche hinweg gleichmäßig für den Antikörper zugänglich und beschränkte sich nicht nur auf die Knospungsnarben.

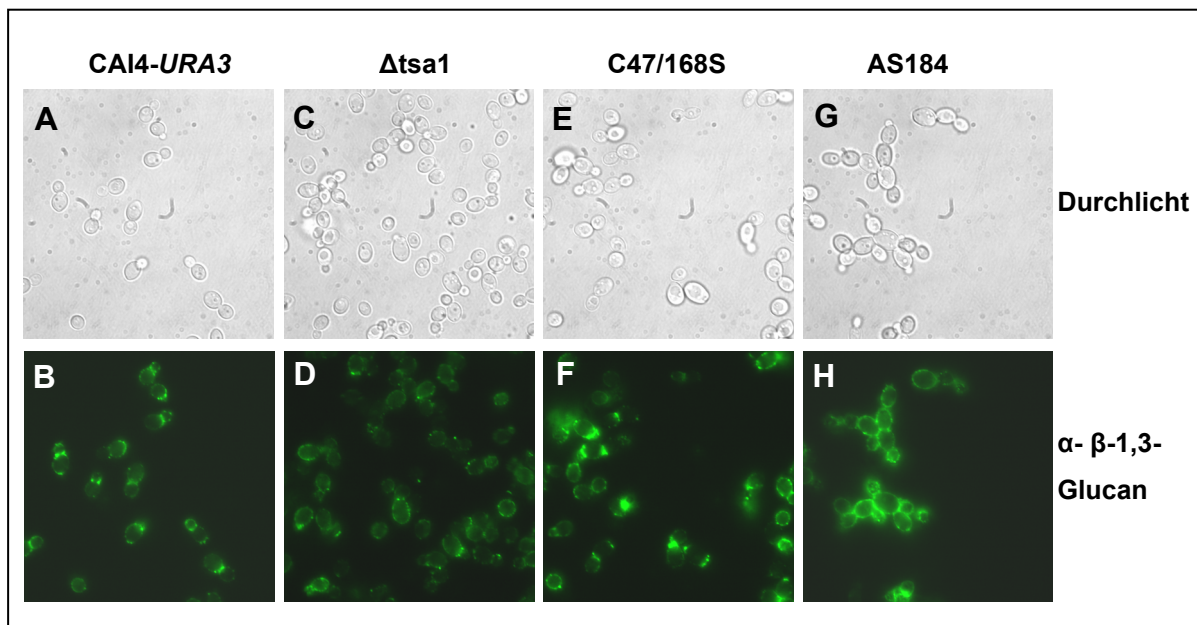


Abb. 30: Ermittlung der β -1,3-Glucan Exposition mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zellen verschiedener *C. albicans* Stämme wurden mit einem β -1,3-Glucan Antikörper markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. (A), (C), (E), (G) sind Durchlichtaufnahmen. Der Δ *tsa1*-Stamm (D) hatte weniger exponiertes β -1,3-Glucan an der Zellwand als der CAI4-*URA3* Stamm (B). Bei dem C47/168S Stamm (F) hingegen konnte etwas mehr Fluoreszenz nachgewiesen werden und der AS184 Stamm (H) zeigte stark erhöhte Fluoreszenzsignale, die sich über die gesamte Zellwand erstreckten.

5.3.2 Tsa1p und die Produktion von ROS durch Makrophagen

Immunzellen reagieren auf den Kontakt mit Antigenen unter anderem mit der Produktion und Ausschüttung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), um eingedrungene Pathogene unschädlich zu machen. Der Zellwandbestandteil β -1,3-

Glucan von *C. albicans* besitzt antigene Eigenschaften und wird durch Rezeptoren wie Dectin-1 von Immunzellen erkannt. In 5.3.1 wurde bereits gezeigt, dass die Exposition von β -1,3-Glucan an der Zellwand der unterschiedlichen Tsa1p-Mutantenstämme stark variiert. Es sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Stämme mit mutiertem Tsa1p einen Einfluss auf die Produktion und Ausschüttung von ROS durch Immunzellen haben.

Hierfür wurden murine Makrophagen der Zelllinie Raw 264.7 mit *Candida*-Zellen der unterschiedlichen Mutantenstämme zusammen inkubiert und die Entstehung von ROS gemessen. Als Kontrolle wurde Zymosan, ein Glucanhaltiger Zellwandextrakt von *S. cerevisiae* eingesetzt. Die emittierte Chemilumineszenz wurde über einen Zeitraum von 2 h gemessen. In Abb. 31 ist das Ergebnis der ROS Produktion durch Makrophagen nach Kontakt mit den verschiedenen *Candida*-Stämmen in relativen Lumineszenzeinheiten im Verlauf der Zeit dargestellt. Bei Kontakt der Makrophagen mit dem Stamm AS184 (Tsa1p mit deletiertem C-Terminus) kam es zu einer sehr schnellen und starken Produktion von ROS im Vergleich zu den anderen Stämmen. Der Kontakt mit der Zymosan-Kontrolle sowie dem Stamm CAI4-URA3 führte jeweils zu einer geringeren Produktion von ROS. Die Stämme C47/168S, der Reversionsstamm Δ tsa1-TSA1 sowie der Δ tsa1-Stamm zeigten eine noch geringere Reaktion der Immunzellen, wobei der Δ tsa1-Stamm die niedrigste Produktion von ROS durch Immunzellen hervorruft. Als Negativkontrolle wurden die Makrophagen keinem Stimulus ausgesetzt; hier war auch keine Lumineszenz messbar.

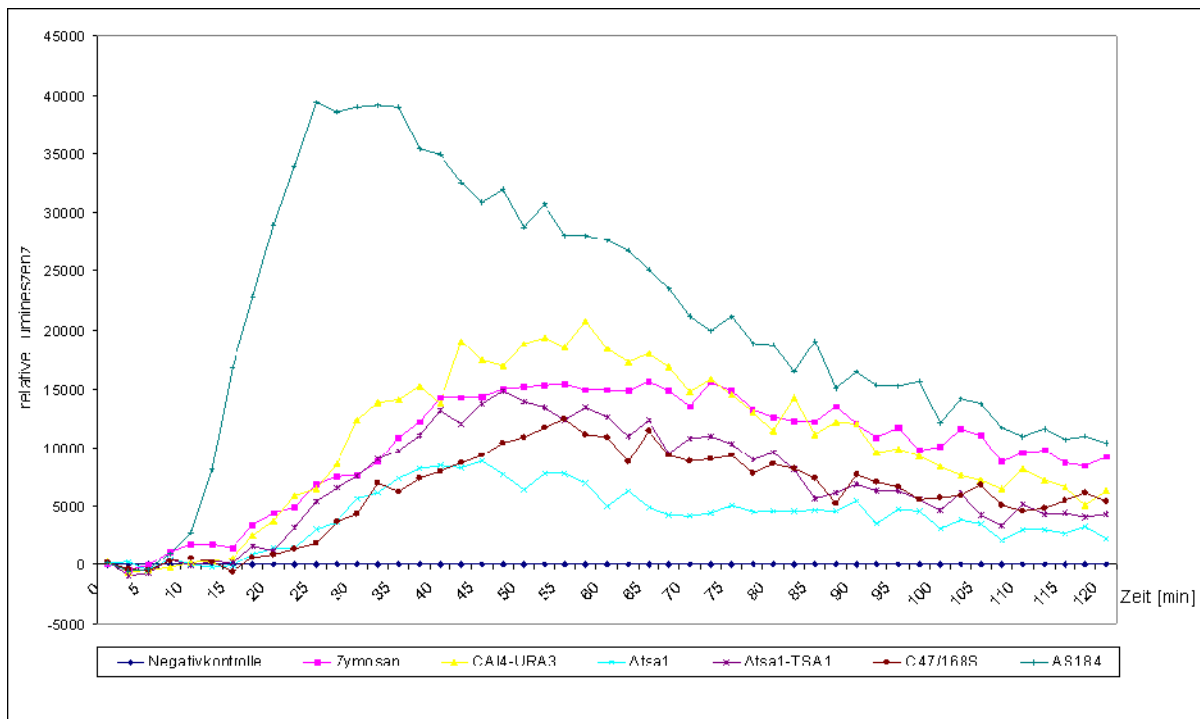


Abb. 31: Produktion von ROS durch murine Makrophagen

Murine Makrophagen wurden zusammen mit verschiedenen *C. albicans* Mutantenstämmen inkubiert und die daraus resultierende Produktion von ROS in relativen Lumineszenzeinheiten im Verlauf der Zeit dargestellt. Der Stamm AS184 (Tsa1p mit deletiertem C-Terminus) führte zu einer sehr schnellen und starken Produktion von ROS durch Makrophagen. Inkubation der Immunzellen mit dem Δ tsa1-Stamm hatte die geringste ROS-Ausschüttung zur Folge. Die Negativkontrolle (Inkubation der Immunzellen ohne Stimulus) führte zu keiner Lumineszenz.

5.3.3 Tsa1p und die Phagozytoserate durch Makrophagen

In 5.3.1 wurde beschrieben, dass sich bei den unterschiedlichen Stämmen mit mutiertem *TSA1* die Zellwand hinsichtlich der Exposition des Bestandteils β -1,3-Glucan stark unterscheidet. Da β -1,3-Glucan von Immunzellen unter anderem durch den Rezeptor Dectin-1 erkannt wird, sollte überprüft werden, ob die Unterschiede in der Exposition dieses antigenen Bestandteils der Zellwand einen Einfluss auf die Phagozytoserate von Zellen der unterschiedlichen Stämme hat.

Hierfür wurden Zellen einer Übernachtskultur zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green488 markiert und im Anschluss die angefärbten Zellen zusammen mit murinen Makrophagen der Zelllinie Raw 264.7 in einem Verhältnis von 5:1 für 30 min inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen von den Makrophagen internalisiert werden. Um zwischen externen und internalisierten *Candida*-Zellen unterscheiden zu können, wurde der an Chitin bindende Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor White

dazugegeben, die Zellen erneut kurz inkubiert und im Anschluss im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Da Calcofluor White die Immunzellen nicht durchdringen kann und die Fluoreszenz des Farbstoffes Oregon Green quencht, konnte die Bestimmung des Verhältnisses von grün-fluoreszierenden Zellen (phagozytiert, Oregon Green gefärbt) und blau-fluoreszierenden Zellen (extern, Calcofluor White gefärbt) einen Aufschluss über die Phagozytoserate der einzelnen Stämme geben. Es wurden drei Replikate pro Stamm angefertigt und jeweils mindestens 600 *Candida*-Zellen ausgezählt. Abb. 32 A-D zeigen exemplarisch die einzelnen Aufnahmen der unterschiedlichen Fluoreszenzfärbungen für den Stamm C47S. Abb. 32 (A) zeigt die Zellen im Durchlicht, (B) repräsentiert die Gesamtzahl an *Candida*-Zellen, die vor der Inkubation mit Makrophagen durch Oregon Green gefärbt wurden. In (C) sind nur die externen, mit dem Pilz-spezifischen Farbstoff Calcofluor White gefärbten *Candida*-Zellen zu sehen. (D) zeigt eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzwellenlängen. Die grünen Zellen waren jene, die von Makrophagen internalisiert wurden, blaue Zellen befanden sich extern.

Abb. 32 (E) zeigt das Ergebnis der Zellzählung, welches als Prozentsatz der von Makrophagen internalisierten *Candida*-Zellen dargestellt ist. Etwa 80% aller Zellen des Stammes CAI4-*URA3* und des Δ *tsa1*-Stammes wurden von den Makrophagen während der 30 min Infektionsdauer phagozytiert. Die Phagozytoserate des Δ *tsa1*-*TSA1* Stammes war etwas geringer mit ca. 70%, die Stämme mit den Cys/Ser Mutationen in *TSA1* wurden sogar noch weniger phagozytiert. Der Stamm, der die Kopie von *TSA1* mit deletiertem C-Terminus in sich trägt, wurde mit fast 90% aller Zellen am stärksten phagozytiert.

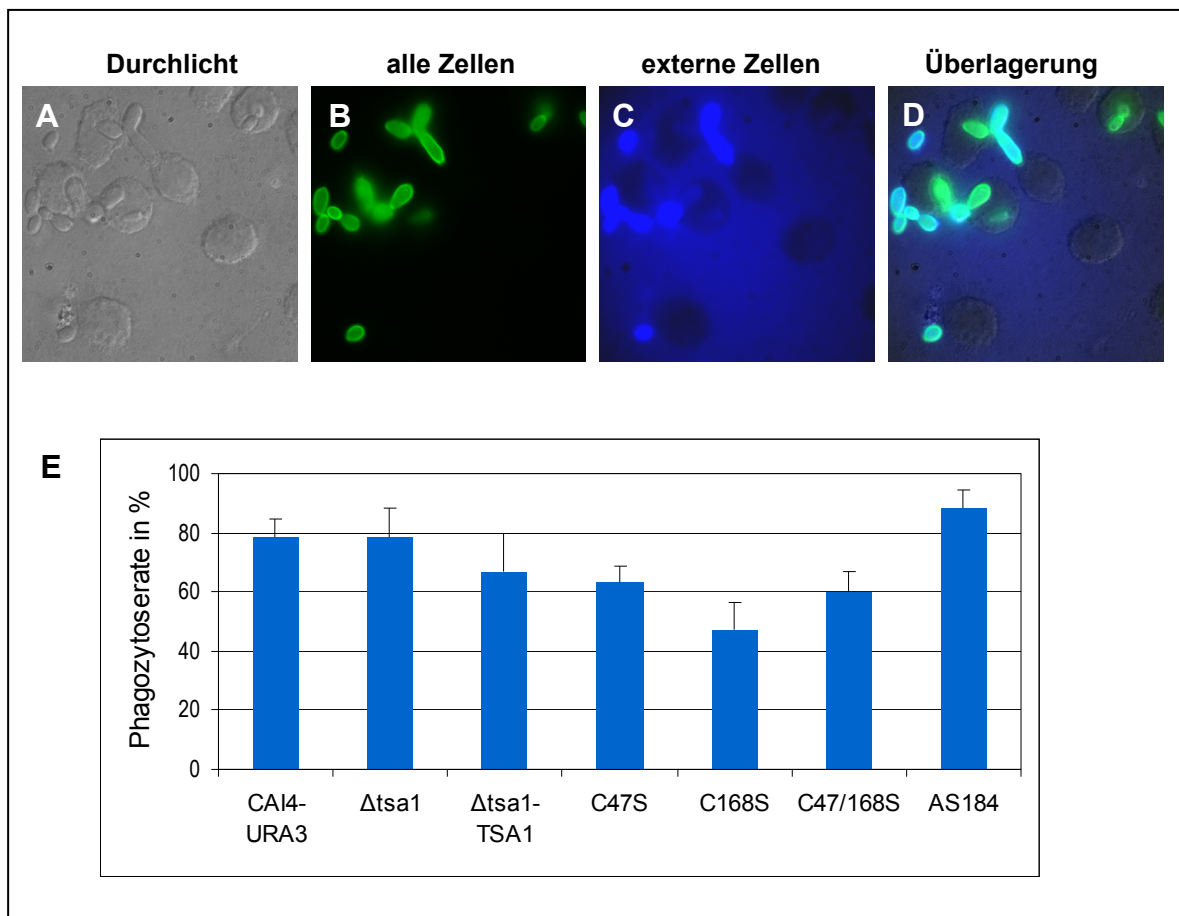


Abb. 32: Phagozytose verschiedener *Candida*-Stämme durch murine Makrophagen

Candida-Zellen verschiedener Stämme wurden mit Oregon Green gefärbt, zusammen mit murinen Makrophagen inkubiert und externe *Candida*-Zellen schliesslich mittels Calcofluor White gegengefärbt. A-D sind exemplarische Aufnahmen des Stammes C47S: (A) Durchlicht, (B) vor der Zugabe von Makrophagen durch Oregon Green gefärbte *Candida*-Zellen, (C) externe Zellen mit Calcofluor White gefärbt, (D) Überlagerung von B und C.

(E) Phagozytoserate in Prozent. Die einzelnen Stämme wurden unterschiedlich gut von den Immunzellen phagozytiert, der Prozentsatz der Stämme lag zwischen 50 und 90% aller Zellen.

Es stellte sich die Frage, ob *TSA1* nach Kontakt mit Makrophagen transkriptionell induziert wird und in welchem Zellkompartiment das Protein lokalisiert ist. Hierfür kam ein bereits durch C. Urban beschriebener *Tsa1p*-GFP Stamm zum Einsatz (Urban et al. 2003). Es wurden erneut murine Makrophagen mit Zellen dieses *Candida*-Stammes im Verhältnis 1:5 inkubiert und die Zellen nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Abb. 33 zeigt repräsentative Aufnahmen dieser Fluoreszenzmikroskopie. Nach 60 min bildeten sich erste Keimschläuche bei den *Candida*-Zellen (C), die im Verlauf der Inkubation zu richtigen Hyphen auswuchsen (E und G). Es zeigte sich, dass dabei die *TSA1*-Expression relativ konstant blieb (B, D, F, H). Ob sich *Tsa1p* bei diesem Versuch an der Zellwand befand, konnte nicht bestimmt werden.

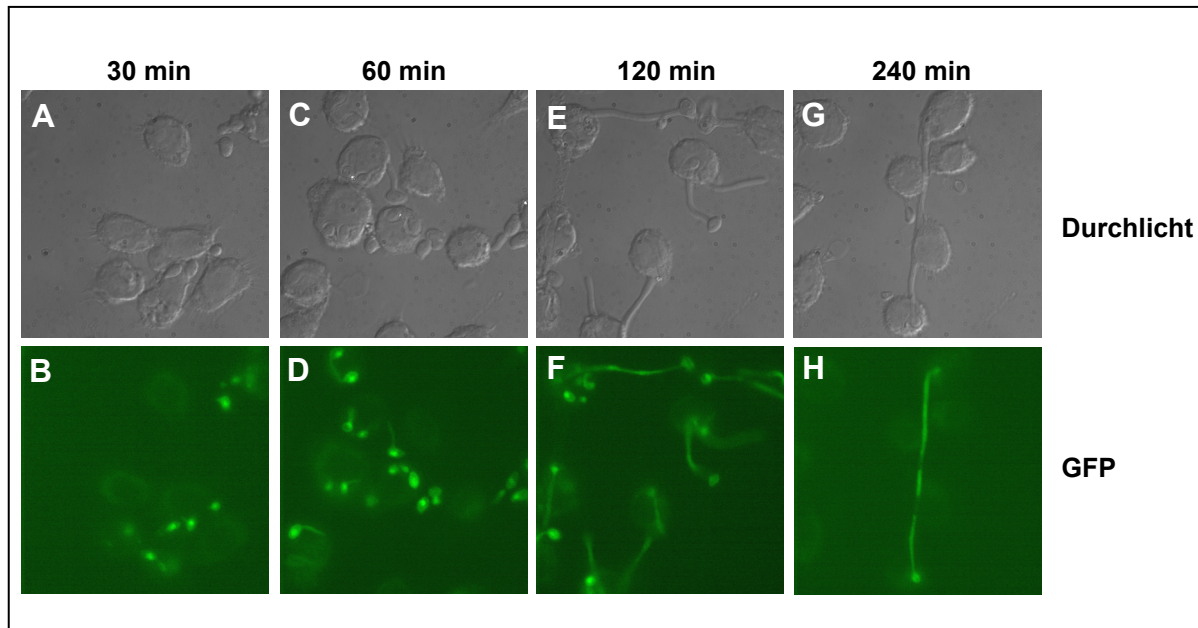


Abb. 33: Inkubation von murinen Makrophagen mit Zellen des Ts1p-GFP Stammes

Murine Makrophagen wurden 1:5 mit Zellen eines Ts1p-GFP Stammes inkubiert und GFP-markiertes Ts1p im Verlauf der Infektion im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Expression von *TSA1* blieb über den getesteten Zeitraum hinweg konstant. Ts1p war über die gesamte Zelle verteilt, eine Oberflächenlokalisation konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht bestimmt werden.

5.3.4 Ts1p und die Überlebensrate der *Candida*-Zellen nach Kontakt mit Immunzellen

Wie bereits gezeigt, riefen die verschiedenen *Candida*-Stämme eine unterschiedliche Reaktion von Immunzellen im Hinblick auf die Produktion von ROS hervor und wurden ebenfalls unterschiedlich gut von Makrophagen phagozytiert. Darum sollte untersucht werden, wie hoch die Überlebensrate der verschiedenen *Candida*-Stämme nach Kontakt mit Immunzellen ist. Hierfür wurden verschiedene Arten von Immunzellen eingesetzt: frisch isolierte humane Makrophagen und humane Neutrophile Granulozyten sowie die humane Promyelozyten Zelllinie HL-60 und die murine Makrophagen Zelllinie Raw 264.7.

Die Immunzellen wurden in einem Verhältnis von 40:1 jeweils mit *Candida*-Zellen der verschiedenen Stämme für 4 h inkubiert, im Anschluss die Immunzellen lysiert und die *Candida*-Zellen auf YPD-Platten aufgebracht. Nach zwei Tagen wurden die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt und der Prozentsatz an überlebenden Zellen durch Vergleich mit Kontrollen (*Candida*-Zellen ohne Immunzellen) ermittelt. In Abb. 34 sind die jeweiligen Überlebensraten der einzelnen *Candida*-Stämme in Prozent angegeben.

Die Versuche mit der murinen Makrophagen Zelllinie Raw 264.7 ergab, dass diese Zelllinie nicht sehr effektiv im Abtöten von *Candida*-Zellen ist. Die Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten, die zuvor mit Immunzellen inkubiert wurden, war bei allen Wiederholungen gleich oder grösser der Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten der Kontrollen (*Candida*-Zellen ohne vierstündige Inkubation mit Immunzellen). Deshalb wurden für diese Versuche weitere Immunzellen verwendet.

Abb. 34 A zeigt das Ergebnis der Inkubation von primären, humanen Makrophagen mit den Stämmen CAI4-*URA3* und Δ tsa1. Aufgrund der stark begrenzten Anzahl der verfügbaren Makrophagen konnten bei diesem Ansatz nur zwei Stämme untersucht werden. Bei beiden Stämmen überlebten in etwa 80% aller eingesetzten Zellen den vierstündigen Kontakt mit diesen Immunzellen.

Abb. 34 B zeigt die Überlebensrate der *Candida*-Zellen nach Inkubation mit der humanen Promyelozyten Zelllinie HL-60. Ca. 45% der Zellen des Stammes CAI4-*URA3* überlebten den Kontakt. Zellen des Δ tsa1-Stammes zeigten dagegen nur 20% Überlebensrate, also weniger als die Hälfte der Zellen des CAI4-*URA3* Stammes. Der mit wildtypischem *TSA1* rekonstituierte Stamm Δ tsa1-*TSA1* zeigte in etwa die Überlebensrate des CAI4-*URA3* Stammes. Die Überlebensraten der restlichen Mutanten lag zwischen denen des CAI4-*URA3* und des Δ tsa1 Stammes.

Abb. 34 C zeigt den Prozentsatz an überlebenden *Candida*-Zellen nach Kontakt mit primären humanen Neutrophilen Granulozyten. Auch hier zeigte sich, dass Zellen des CAI4-*URA3* Stammes die höchste Überlebensrate nach Kontakt mit diesen Immunzellen hatten; der Δ tsa1 Stamm die geringste. Die Überlebensraten der Stämme mit mutiertem *TSA1* lagen auch hier zwischen denen des CAI4-*URA3* und des Δ tsa1 Stammes und korrelierten mit den Ergebnissen aus der Inkubation der *Candida*-Zellen mit der Promyelozyten Zelllinie HL-60.

Dies deutet darauf hin, dass Tsa1p auch in *C. albicans* zusätzliche Funktionen über die Redox-Aktivität hinaus besitzt.

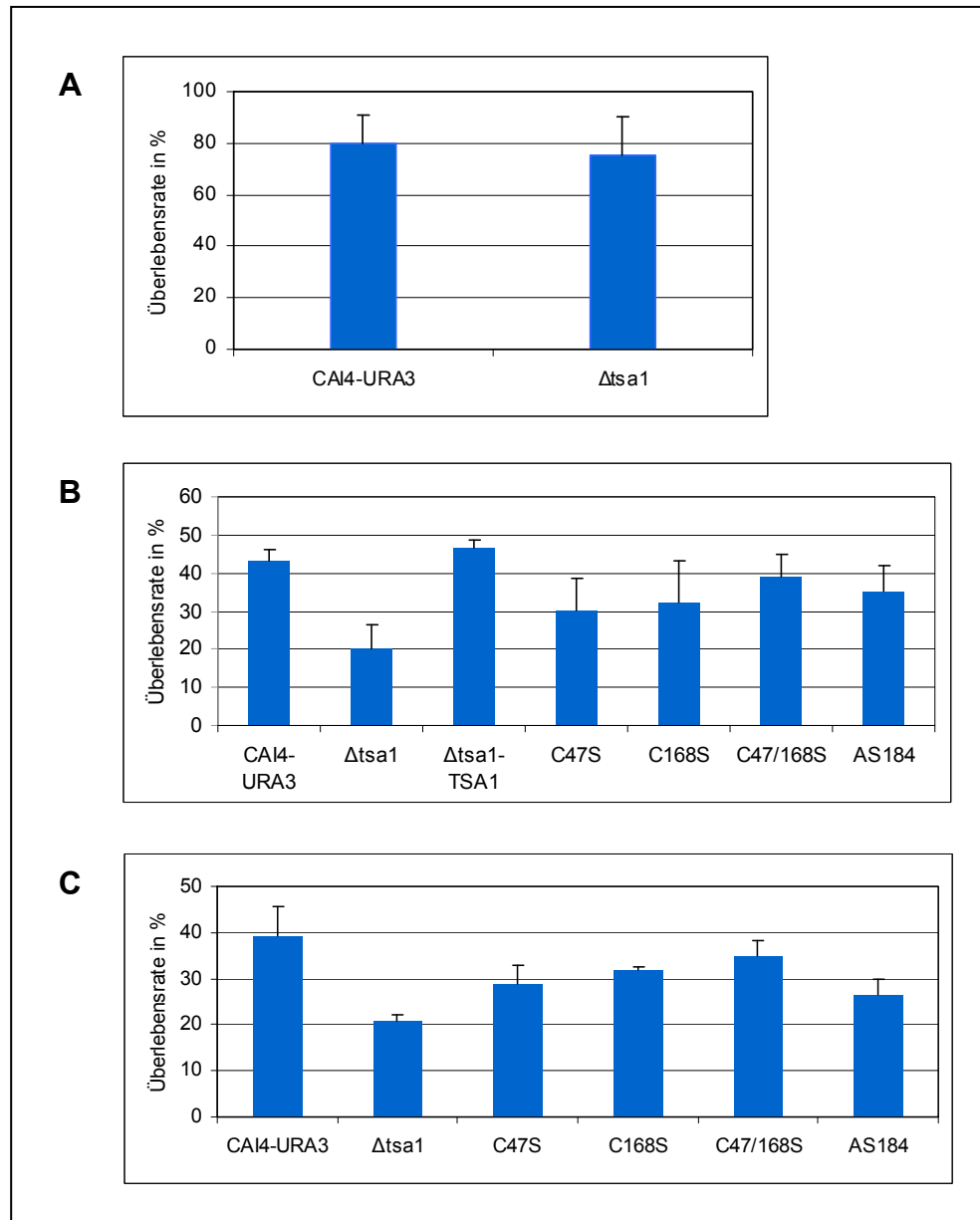


Abb. 34: Überlebensrate verschiedener *Candida*-Stämme nach Kontakt mit Immunzellen

Candida-Zellen verschiedener Stämme wurden jeweils 4 h mit Immunzellen inkubiert und im Anschluss die Überlebensrate der *Candida*-Zellen ermittelt. Überlebensraten sind in Prozent angegeben.

(A) Überlebensrate nach Kontakt mit primären humanen Makrophagen

(B) Überlebensrate nach Kontakt mit der humanen Promyelozyten Zelllinie HL-60

(C) Überlebensrate nach Kontakt mit primären humanen Neutrophilen Granulozyten

In Tab. 17 sind die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Tsa1p-Mutantenstämmen erzielt werden konnten, nochmals in zusammengefasster Form dargestellt. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die einzelnen Cystein-zu-Serin Mutanten zusammengefasst betrachtet, da mit diesen Stämmen sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten. Der Stamm CAI4-URA3 war der Ausgangsstamm zur Erzeugung der einzelnen Tsa1p-Mutantenstämme und diente somit als vergleichende Referenz für die Mutantenstämme.

Tab. 17: Zusammenfassung der mit den div. Tsa1p-Mutantenstämmen erzielten Ergebnisse

	CAI4- URA3	Δ tsa1	Δ tsa1- TSA1	Cys/Ser	AS184
TSA1-Kopien im Genom	4	0	1	1	1
Katalytische Aktivität von Tsa1p	+		+	-	-
Fähigkeit zur Oligomerisierung	+		+	-	+
Oberflächenlokalisierung des Proteins	+		+	-	+
β -1,3-Glucan Exposition an der Zellwand	„WT“	<< WT	< WT	\geq WT	>> WT
ROS Produktion durch Makrophagen	100%	~ 40%	~ 60%	50 -75%	~ 200%
Phagozytoserate durch Makrophagen	~ 80%	~ 80%	~ 70%	50-60%	~ 90%
Überlebensrate (humane Makrophagen)	~ 80%	~ 80%			
Überlebensrate (HL-60)	~ 45%	~ 20%	~ 45%	30-40%	~ 35%
Überlebensrate (humane Neutr. Gran.)	~ 40%	~ 20%		30-35%	~ 25%
<< sehr viel weniger als + vorhanden	< weniger als - nicht vorhanden	\geq in etwa gleich wie	>> sehr viel mehr als		

6 Diskussion

Der Hefepilz *Candida albicans* zählt zu den wichtigsten humanpathogenen Pilzen überhaupt. Die Aufklärung molekularer Infektionsmechanismen als Ansatz zur Entwicklung neuer Medikamente stellt einen zentralen Punkt der Forschung dar. Die Zellwand von *C. albicans* und deren Zusammensetzung spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung oder Abwehr einer Infektion. Zellwandbestandteile vermitteln die Adhäsion an und Invasion in Wirtsgewebe und tragen somit entscheidend zur Pathogenität des Organismus bei. Jedoch dienen eben diese Zellwandbestandteile dem Immunsystem des Wirtes auch als antigene Strukturen, die durch Immunzellen erkannt werden können, was schließlich zur Abtötung des Pathogens führt.

Das thiol-spezifische Antioxidant-ähnliche Protein Tsa1p ist ein differentiell lokalisiertes Protein, das sowohl an der Zellwand sowie im Cytosol und Nukleus der Zellen gefunden wird. Im Cytosol übernimmt das Protein u.a. die Funktion, Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Die Funktion des Proteins an der Zellwand konnte in bisherigen Studien noch nicht genau ermittelt werden, es wurde aber vorgeschlagen, dass es für den korrekten Zellwandaufbau bei Hyphen benötigt wird (Urban et al. 2005).

Trotz der Zellwandlokalisation besitzt das Protein keine N-terminale Signalsequenz, die es ihm ermöglichen würde, in den klassischen ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg einzutreten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Bedingungen getestet, bei denen Tsa1p an die Zelloberfläche lokalisiert. Desweiteren wurde der Mechanismus des Transportes genauer untersucht, im speziellen welche Determinanten von Tsa1p eine Lokalisation des Proteins ermöglichen. Hierfür wurden verschiedene Punktmutationen in Tsa1p erzeugt: es wurde die Beteiligung der beiden katalytisch aktiven Cysteine und des C-Terminus untersucht und daraufhin das Protein auf seine Fähigkeit getestet, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. In diesem Zusammenhang wurde bei den Stämmen mit mutiertem Tsa1p ebenfalls die Zusammensetzung der Zellwand auf den Bestandteil β -1,3-Glucan untersucht sowie Studien zur Wirt-Pathogen-Interaktion durchgeführt.

6.1 Tsa1p wird nicht-klassisch transportiert

Die grosse Mehrheit der Zellwand- und sekretierten Proteine wird durch den klassischen ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg transportiert. In den vergangenen Jahren wurden jedoch immer mehr Proteine identifiziert, denen eine N-terminale Signalsequenz für den Eintritt in das ER fehlt, die aber dennoch in der Lage sind, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Proteine ist die Tatsache, dass sich deren Transport an die Zelloberfläche nicht durch Brefeldin-A (BFA) inhibieren lässt. BFA wurde als Inhibitor des klassischen Sekretionsweges beschrieben, der den vesikulären Transport durch Golgi-Vesikel blockiert (Lippincott-Schwartz et al. 1989, Orci et al. 1991).

Für einige Proteine wurden bereits alternative Transportwege an die Zelloberfläche vorgeschlagen. Das Protein FGF-2 („Fibroblast Growth Factor 2“) erreicht über eine direkte Translokation durch die Plasmamembran den extrazellulären Raum (Schafer et al. 2004). Der Transport von Interleukin 1 β (IL-1 β) wird durch intravesikuläre Vesikel, vermutlich endosomale Subkompartimente vermittelt (Andrei et al. 1999). Interessanterweise wird durch Zugabe von BFA die Sekretion von IL-1 β sogar noch verstärkt, was die Existenz von Alternativen zum klassischen Sekretionsweg erhärtet (Lippincott-Schwartz et al. 1989, Orci et al. 1991). Bis heute sind aber die genauen Mechanismen der nicht-klassischen Proteinsekretion weitgehend ungeklärt.

Tsa1p besitzt ebenfalls keine N-terminale Signalsequenz für den Eintritt in den klassischen, ER/Golgi-vermittelten Sekretionsweg, kann aber trotzdem an die Zelloberfläche lokalisieren. Es sollte überprüft werden, ob dieses Protein tatsächlich über einen nicht-klassischen Transportweg an die Zelloberfläche gelangt. Hierfür wurden Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 mit und ohne BFA inkubiert. Die Konzentration von 40 μ M BFA wurde anhand der vom Hersteller (Sigma) ermittelten und getesteten Konzentration eingesetzt. Bei Verwendung dieser Konzentration wurden laut Hersteller 90% der Sekretion des „Testproteins“ IL-2 in Säugerzellen inhibiert.

Bei unseren Versuchen konnte durch die Zugabe von BFA die Sekretion von Proteinen generell, wie über quantitative Massenspektrometrie bestimmt, im Vergleich zur Inkubation der Zellen ohne BFA nach 3 Stunden um ein Drittel verringert werden. Die Zusammensetzung dieses um ein Drittel reduzierten Sekretoms entsprach hierbei den Proteinen, die sonst üblicherweise auch von Zellen

sekretiert werden bzw. sich von der Zellwand ablösen (siehe Anhang). Durch Zugabe von BFA konnte somit eine signifikante Verringerung der klassischen Sekretion in *C. albicans* erreicht werden.

Die Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche war hiervon jedoch nicht betroffen. Nach Zugabe von BFA konnte Tsa1p immer noch an die Zelloberfläche lokalisieren. Es konnte sogar eine Verstärkung der Oberflächenlokalisierung nach Zugabe von BFA beobachtet werden, ähnlich wie es für das nicht-klassisch sekretierte IL-1 β beschrieben wurde.

Ebenfalls konnte eine Verringerung der Zellteilungsrate und die Vergrößerung von Zellen nach Zugabe von BFA beobachtet werden. Eine Vergrößerung der Zellen und eine abnormale Membran der Zellen nach Zugabe von BFA wurde bereits beschrieben (Arioka et al. 1991). Dies resultiert wahrscheinlich daraus, dass Proteine, die sonst zur Sekretion bestimmt sind, nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert werden können und sich somit im Cytosol oder ER der Zellen ansammeln. Dies ist ebenfalls ein Indiz dafür, dass der klassische Sekretionsweg durch Zugabe von BFA erfolgreich blockiert bzw. stark inhibiert wurde. Dass Tsa1p trotzdem und sogar verstärkt an die Zelloberfläche transportiert wird, lässt uns daraus schließen, dass Tsa1p auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche lokalisiert.

6.2 Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche

Tsa1p wurde als differenziell lokalisiertes Protein beschrieben, das bisher lediglich bei Hyphen an der Zelloberfläche gefunden werden konnte, nicht aber bei Blastosporen (Urban et al. 2003). Die Hyphenbildung galt hierbei u. a. als induzierender Faktor für die Lokalisation des Proteins an die Oberfläche. Bei diesen Studien wurden jedoch nur spätere Zeitpunkte des exponentiellen Wachstums von *Candida*-Zellen, bzw. Zellen die sich in der stationären Phase befanden auf Tsa1p-Oberflächenlokalisierung hin untersucht.

6.2.1 Abhängigkeit von der Wachstumsphase und Einfluss von QSM

Durch Zeitreihen konnte gezeigt werden, dass Tsa1p ebenfalls bei Blastosporen an die Zelloberfläche lokalisiert. Jedoch war dies nur in den frühen Phasen des exponentiellen Wachstums (lag-Phase) zu beobachten, wenn die Zellen aus einer Kultur verdünnt in Medium umgesetzt wurden und es zur Wiederaufnahme des Wachstums kam. Dabei handelte sich um eine verstärkte Lokalisation des Proteins aus dem Cytosol an die Zellwand und nicht um eine verstärkte Expression.

Auch konditioniertes Medium, das durch Filtration einer Übernachtskultur gewonnen wurde, die kein Oberflächen-Tsa1p zeigt, führte wie oben beschrieben zur Lokalisation von Tsa1p an die Oberfläche. Dabei war die An- bzw. Abwesenheit von Glukose nicht relevant. Der Verbrauch von Nährstoffen wie auch die Ansammlung von QSM im YPD-Medium kann deshalb nicht als Grund für die Translokation von Tsa1p an die Zelloberfläche in Frage kommen. Möglicherweise ist allein der Transfer der Zellen und somit eine Änderung der Umgebung ein Signal für Tsa1p an die Zelloberfläche zu lokalisieren.

Nichtsdestotrotz führte die Zugabe von externem Farnesol und Dodecanol zu einer verstärkten, konzentrationsabhängigen Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche. Die verwendete Konzentration an Farnesol lag zwischen 50 und 300 μM . Dies liegt weit über der normalen, von *Candida*-Zellen produzierten Konzentration an Farnesol. Möglicherweise lokalisiert Tsa1p hier als Reaktion auf die Induktion von Stress an die Zelloberfläche. Es wurde jedoch beschrieben, dass die Zugabe von externem Farnesol bis zu einer Konzentration von 300 μM zu keiner Veränderung der zellulären Wachstumsrate bei den Zellen führt (Nickerson et al. 2006).

Daten aus Mikroarray-Analysen konnten zeigen, dass Farnesol von Zellen durchaus als Umweltstress wahrgenommen wird. Regulierte Gene waren unter anderem solche, die für Hitzeschockproteine kodieren (*HSP70*, *HSP90*, *HSP104*) sowie Proteine, welche eine Rolle beim Zellwandaufbau spielen (die Chitinasen *CHT2*, *CHT3*) (Cao et al. 2005). Dies wird gestützt von der Beobachtung, dass die Zugabe von Farnesol zu einer schnellen Phosphorylierung der MAPK Hog1p führt. Hog1p ist eine Stress-aktivierte Protein-Kinase (Nickerson et al. 2006).

Bei anderen stressauslösenden Agenzien wie H_2O_2 und DTT konnte ebenfalls ein Transport von Tsa1p an die Zelloberfläche gezeigt werden. Bei den „Stressoren“ war die Menge an oberflächenlokalisiertem Tsa1p abhängig von der zugegebenden

Dosis der Agenzien: je höher deren Konzentration, desto mehr Tsa1p konnte an der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

6.2.2 Tsa1p-Oberflächenlokalisation und das Redox-Gleichgewicht der Zellen

Die Substanzen DTT sowie β -Mercaptoethanol reduzieren Disulfidbrücken zu freien Thiolen und können durch Bildung von Thiyl-Radikalen ähnliche Zellschäden wie Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachen (Giles and Jacob 2002).

ROS sind Sauerstoffverbindungen, bei denen der Sauerstoff in nicht-vollständig reduzierter Form vorliegt, z.B. Superoxidanionen (Hyperoxid, O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale (OH). In eukaryontischen Zellen werden diese ständig, z.B. durch die Reduzierung von Sauerstoff durch zelluläre Oxidasen, Peroxidasen und Mono- bzw. Dioxygenasen ebenso wie durch unvollständige Reduzierung von Sauerstoff zu Wasser in der mitochondrialen Atmungskette produziert (Witze et al. 2007).

ROS sind instabile, reaktive Moleküle, die Proteine, DNA und Lipide schädigen können (Freeman and Crapo 1982). Da ROS ständig produziert werden und eine Anhäufung in der Zelle zu schwerwiegenden Schäden führen würde, besitzen die Zellen biochemische Antioxidantien und Enzyme, die diese Substanzen unschädlich machen und somit die Zelle in ihrem Redox-Gleichgewicht halten. Dazu gehören Glutathion (GSH) und Thioredoxin (Carmel-Harel and Storz 2000). GSH fungiert als Elektronendonator für das Antioxidant-Enzym Glutathion Peroxidase; Thioredoxin ist Elektronendonator für Thioredoxin Peroxidasen. Beide Systeme schützen Zellen vor oxidativem Stress und sorgen für den Erhalt des Redox-Gleichgewichtes der Zelle (Carmel-Harel and Storz 2000).

In *S. cerevisiae* ist das zu CaTsa1p homologe Protein ScTsa1p eine Thioredoxin Peroxidase, die Wasserstoffperoxid sowie Thiyl-Radikale in der Zelle unschädlich macht (Chae et al. 1993). Es wurde bereits gezeigt, dass Tsa1p in *C. albicans* ebenfalls die Funktion übernimmt, die Zellen gegen H_2O_2 sowie die Thiol-Verbindung Dithiotreitol (DTT) zu schützen (Urban et al. 2005).

Zu oxidativem Stress in den Zellen kommt es erst, wenn das Redox-Gleichgewicht der Zellen durch eine Erhöhung der ROS z.B. durch die externe Zugabe von Redox-aktiven Substanzen gestört wird. DTT und β -Mercaptoethanol sind beides Redoxreagenzien, die bei Zugabe zu den Zellen zur Störung des Redox-

Gleichgewichts der Zellen und somit zu oxidativem Stress führen können.

Bei Zugabe von H_2O_2 und DTT konnte eine verstärkte Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche beobachtet werden. Diese war stark von der Dosis abhängig: bei Erhöhung der eingesetzten Konzentration von H_2O_2 konnte auch vermehrt Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Bei Zugabe von 20 mM DTT wurde sehr viel Tsa1p an die Zelloberfläche transportiert. Die Zugabe von 5 mM β -Mercaptoethanol hatte jedoch keine Auswirkung darauf. Möglicherweise war hier die eingesetzte Konzentration zu gering. β -Mercaptoethanol ist ein schwächeres Reduktionsmittel als DTT. DTT wurde in einer höheren Konzentration eingesetzt. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer Anpassung der β -Mercaptoethanol Konzentration Tsa1p ebenfalls verstärkt an die Zellwand lokalisiert.

Tsa1p übernimmt in der Zelle wie sein Homolog ScTsa1p in *S. cerevisiae* die Funktion einer thiol-spezifischen Peroxidase, indem es die Zellen vor H_2O_2 und DTT schützt. Diese Funktion ist normalerweise auf das Cytosol der Zellen beschränkt. Interessanterweise lokalisiert Tsa1p bei Zugabe dieser Agenzien verstärkt an die Zelloberfläche. Sobald sich das Redoxpotential der Umgebung der Zellen änderte, kam es zu einer verstärkten Oberflächenlokalisation von Tsa1p. Ob es dort ebenfalls die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen vermag, bleibt zu untersuchen.

Frühere Ergebnisse zeigten, dass bei Zugabe von 5 mM H_2O_2 keine Translokation von Tsa1p an die Zelloberfläche ausgelöst wird (Urban et al. 2005). Die Diskrepanz beider Ergebnisse lässt sich durch die verschiedenen Zeitpunkte erklären, zu denen die Zelloberflächenproteine biotinyliert wurden. Die Verfolgung der Translokation von Tsa1p an die Oberfläche in einer Zeitreihe wie hier gezeigt, stellt die beste Möglichkeit dar, Vorgänge an der Zellwand über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten.

6.2.3 Klinische Isolate

Bei der Untersuchung verschiedener klinischer Isolate von *C. albicans* konnte festgestellt werden, dass Tsa1p bei allen Stämmen an die Zelloberfläche lokalisieren konnte. Die Mengen von Tsa1p an der Zelloberfläche variierten dabei zum Teil sehr

stark, unabhängig davon, an welchem Infektionsort (oral, vaginal, systemisch) der Stamm isoliert wurde. Unterschiedliche Habitate wie Mundhöhle, Vagina oder Blutstrom stellen die unterschiedlichsten Herausforderungen an das Pathogen, wie z.B. wechselnder pH-Wert und umgebende Mikroflora. Die Tatsache, dass Tsa1p immer an der Zelloberfläche zu finden ist, könnte darauf hindeuten, dass das Protein dort eine wichtige Funktion bei der Pathogenität des Organismus hat.

6.2.4 CaTsa1p in *S. cerevisiae*

Um zu untersuchen, ob Tsa1p auch bei anderen Organismen an die Zelloberfläche lokalisieren kann, wurde die Lokalisation von CaTsa1p in *S. cerevisiae* untersucht.

S. cerevisiae besitzt ein zu CaTsa1p 88% homologes und 76% identisches Protein ScTsa1p. In *S. cerevisiae* existiert ebenfalls ein zweites, homologes Protein ScTsa2p, welches in *C. albicans* nicht vorkommt. ScTsa1p wird als eine Thioredoxin Peroxidase beschrieben, die als Antioxidant aber auch als Chaperon in der Zelle wirken kann (Jang et al. 2004). ScTsa2p agiert zusammen mit ScTsa1p bei der Entfernung von ROS. Dabei spielt ScTsa2p jedoch nur eine untergeordnete Rolle bei der Reaktion auf oxidativen Stress. Durch Einbringen von CaTsa1p in ScTsa1 und ScTsa2 Deletionsstämme konnte die Aktivität des Proteins in dem verwandten Organismus untersucht werden.

Es zeigte sich, dass CaTsa1p unter den getesteten Bedingungen den Sc Δ tsa1 und Sc Δ tsa1 Δ tsa2 Phänotyp unter oxidativem Stress komplementieren konnte. CaTsa1p wirkt somit in *S. cerevisiae* ebenfalls als Peroxidase und hilft den Zellen, sich vor oxidativem Stress zu schützen. Es bleibt die Frage, ob CaTsa1p in diesem Organismus ebenfalls die Funktion eines Chaperons übernehmen kann; jedoch vermittelt Tsa1p in *C. albicans* keinen Schutz vor Hitzeschock (Urban et al. 2005).

Lokalisationsversuche von CaTsa1p in *S. cerevisiae* ergaben, dass das Protein auch in diesem Organismus in der Lage ist, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Es müssen demnach in beiden Organismen homologe Wege des Proteintransportes vorhanden sein. Bisher konnte keine Zelloberflächenlokalisierung für ScTsa1p in *S. cerevisiae* beobachtet werden; ScTsa1p ist als cytosolisches Protein beschrieben, das ebenfalls in den Nukleus lokalisieren kann (Trotter et al. 2008). Die für CaTsa1p entwickelten Antikörper waren nicht in der Lage, ScTsa1p gut genug zu erkennen.

6.3 Untersuchung möglicher posttranslationaler Modifizierung von Tsa1p

Tsa1p wurde nicht nur als multimere Form indentifiziert, sondern auch als Isoform von 1-2 kDa höherem Molekulargewicht. Diese zweite Bande wurde sowohl an der Zellwand (exemplarisch siehe Abb. 12) wie auch intrazellulär (siehe Abb. 11) beobachtet. Beide Banden wurden über MS-Analyse eindeutig als Tsa1p identifiziert. Zudem wurde versucht, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Oxidation der Cysteine über MS-Analyse nachzuweisen.

Phosphorylierungen von Serin, Tyrosin oder Threonin stellen die häufigste Art der posttranslationalen Modifizierungen dar. Die Phosphorylierung eines Serinrestes führt zum Beispiel zu einer Massenzunahme von 80 Da (Jensen 2004), was die zweite, obere Bande erklären könnte. Es gibt ebenfalls Hinweise auf eine Phosphorylierung von Tsa1p durch die Kinase Yak1p (persönliche Kommunikation C. d'Enfert).

Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung von Tsa1p ist die Oxidation eines oder beider Cysteine. Die Oxidation eines Cysteins kann zu einer Massenzunahme von 16, 32 oder 48 Da führen, je nach Oxidationsgrad des Cysteins (Witze et al. 2007).

Bei der massenspektrometrischen Analyse wurde allerdings keine Modifizierung des Proteins gefunden. Jedoch konnte die Sequenz von Tsa1p jeweils nur etwa zur Hälfte abgedeckt werden (siehe Anhang). Bei allen Wiederholungen waren es dieselben Sequenzabschnitte, die nicht durch Peptide abgedeckt werden konnten. Bei genauer Betrachtung dieser Abschnitte fällt auf, dass es sich um relativ lange Sequenzen handelt. Dies könnte durch den Einsatz des Enzyms Trypsin zum Verdau des Proteins zu erklären sein: Trypsin schneidet hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Gerade diese Aminosäuren sind in einigen Bereichen des Proteins nicht vorhanden. Deshalb entstanden beim Verdau zum Teil sehr lange Peptide von bis zu 30 AS, die massenspektrometrisch aufgrund ihrer Grösse schwer zu identifizieren sind. Die Tatsache, dass bei unseren Ansätzen keine posttranslationalen Modifikationen gefunden werden konnten, schliesst das Vorhandensein solcher natürlich nicht aus. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Modifizierung in den nicht-identifizierten Sequenzabschnitten liegt, ist gegeben.

6.4 Signaltransduktionswege der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung

Tsa1p gelangt nicht durch den klassischen ER/Golgi-vermittelten Proteinsekretionsweg an die Zelloberfläche. Es wurden definierte Bedingungen gefunden, die einen Transport an die Zelloberfläche induzieren, was auf einen Signal-vermittelten Mechanismus schließen lässt. Deshalb wurden Stämme mit Defekten in morphogenetischen und Stress-assoziierten Signalwegen getestet, um eine mögliche Beteiligung dieser an der Lokalisation von Tsa1p an die Zelloberfläche zu untersuchen.

Bei allen getesteten Stämmen mit Defekten in Signaltransduktionswegen konnte kein Stamm gefunden werden, bei dem Tsa1p nicht mehr in der Lage war, an die Zelloberfläche zu lokalisieren. Einige Deletionsstämme konnten identifiziert werden, bei denen Tsa1p eine verstärkte Translokation an die Zellwand aufweist. Dies gibt indirekt einen Hinweis auf deren mögliche Beteiligung am Transport des Proteins.

Abb. 35 liefert eine Übersicht der getesteten Mutantenstämme. In rot hervorgehoben sind die Gene, deren Mutation eine Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung zeigten, Gene in blau hervorgehoben zeigten keine Änderungen. Dabei wurde unterschieden, ob die Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung nur in der stationären Phase der Zellen nach Wachstum der Zellen über Nacht in YPD auftrat (S), in der Kinetik der Translokation nach Umsetzen in frisches Medium (K) oder ob zwar eine Änderung wie im Fall der Deletion von *HOG1* zu beobachten war, diese aber nicht revertierbar ist (Nr). Im Fall der Deletion von *EFG1* konnte eine Änderung beobachtet werden, diese war jedoch abhängig vom verwendeten Medium (Ma).

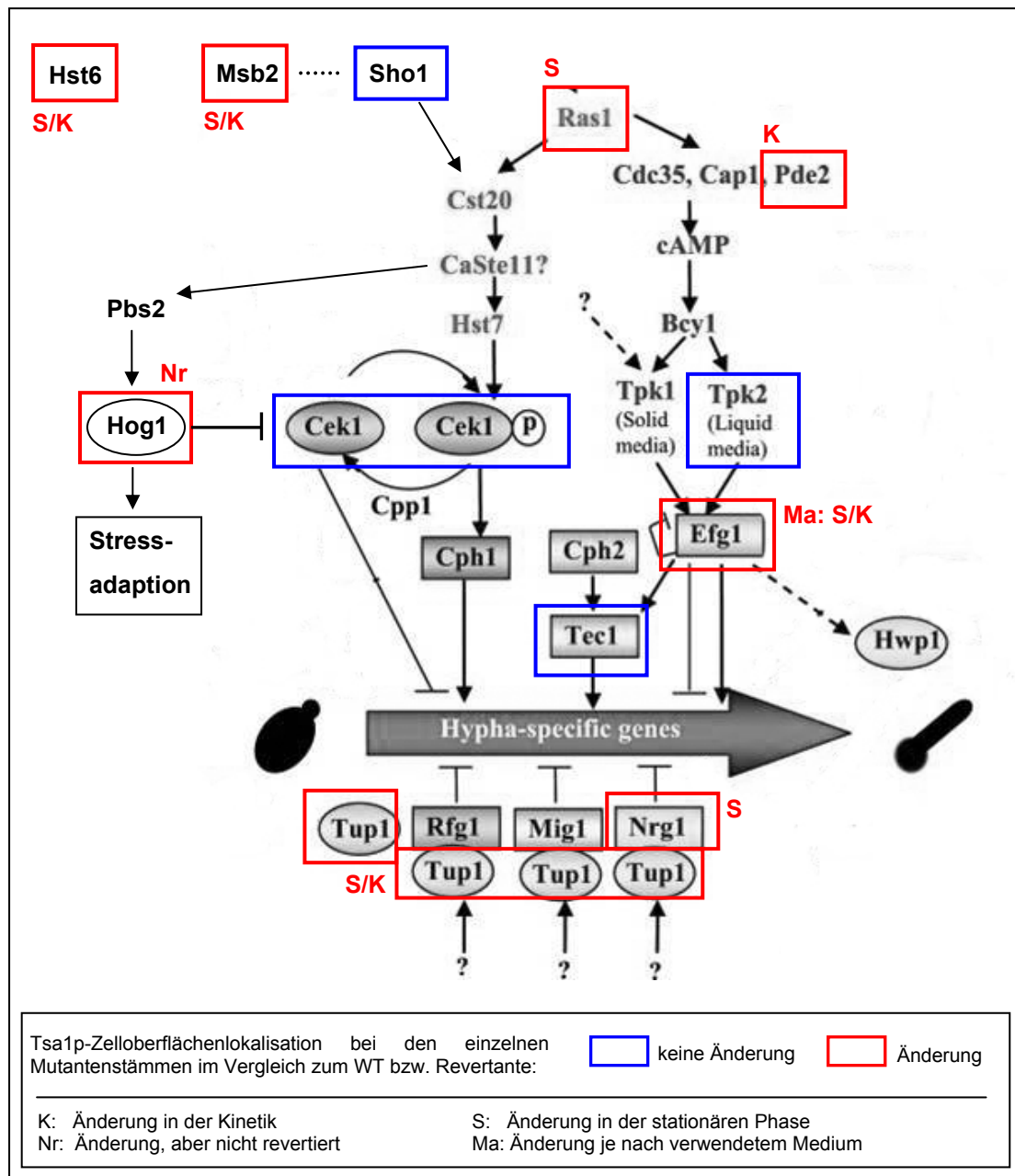


Abb. 35: Übersicht über die Gene, deren Mutation eine Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisation zur Folge hatte

Kästen zeigen die untersuchten Stämme mit Mutationen in den entsprechenden Genen.

Quelle: (Biswas et al. 2007) modifiziert nach (Monge et al. 2006)

Keine Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisation konnte bei Deletion von *CEK1*, *TPK2*, *TEC1* bzw. *SHO1* beobachtet werden.

Tsa1p konnte verstärkt an der Zelloberfläche bei den Stämmen mit deletiertem *MSB2*, *EFG1*, *PDE2*, *TUP1*, *NRG1* und *HST6* gefunden werden, wobei hier unterschieden werden kann, ob die Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisation lediglich während der stationären Phase oder in der Kinetik zu beobachten ist bzw.

bei beiden auftritt (siehe Abb. 35). Für Stämme mit deletiertem *MSB2* (kodiert für Zellwandsensor), *EFG1* (kodiert für TF) und *PDE2* (kodiert für Phosphodiesterase) wurden Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung, also eine abnormale Zellwand beschrieben (Jung et al. 2005, Korting et al. 2003, Lo et al. 1997, Roman et al. 2009, Sohn et al. 2003). Bei diesen Stämmen trat eine Änderung der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung während der Kinetik der Zellen auf: bei Deletion von *MSB2* und *PDE2* wurde Tsa1p verstärkt zu allen getesteten Zeitpunkten an der Zelloberfläche gefunden, die Deletion von *EFG1* hatte zur Folge, dass Tsa1p auch in α -MEM Medium im Gegensatz zum WT ein transientes Lokalisationsmuster an die Zelloberfläche zeigte.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen Pde2, Efg1p und der Tsa1p-Zelloberflächenlokalisierung beobachtet werden. Durch Deletion von *PDE2* wird in den Zellen ständig cAMP gebildet, was zu einer erhöhten Expression von *EFG1* führt. Unter diesen Bedingungen findet sich mehr Tsa1p an der Zelloberfläche als im WT. Im Gegensatz dazu ist bei Deletion von *EFG1* Tsa1p in verringertem Maße in α -MEM Medium an der Zelloberfläche zu finden. Dies könnte auch mit der Morphologie der Zellen zusammenhängen: liegen die Zellen als Blastosporen vor, kommt es zu einem transienten Tsa1p-Lokalisationsmuster an der Zelloberfläche, das im Verlauf der Zeit stetig geringer wird, auch unter normalerweise Hyphen-induzierenden Bedingungen (α -MEM Medium, 37°C). Liegen die Zellen als Hyphen vor (auch unter den Blastosporen-Bedingungen YPD-Medium, 30°C, siehe Δ tup1 und Δ nrg1), kann Tsa1p für bis zu 15 h an der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Sind *TUP1* oder *NRG1* (kodieren beide für TF) deletiert, so kommt es zu einer veränderten Morphologie der Zellen (Braun et al. 2001, Garcia-Sanchez et al. 2005, Murad et al. 2001a, Murad et al. 2001b). Die Deletion von *HST6* (kodiert für ABC-Transporter) könnte ebenfalls zu einer Veränderung in der Membran führen.

Bei Deletion von *HOG1* konnte im Vergleich zum Wildtypstamm mehr Tsa1p an der Zelloberfläche nachgewiesen werden, jedoch traf dies ebenfalls auf den Reversionsstamm zu. Hier kann die Änderung in der Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche auf einen Sekundäreffekt durch die Manipulation des Stammes zurückzuführen sein oder es sich um einen Gen-Dosis Effekt handeln. Der Nachweis einer Beteiligung von Hog1p an der Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche erfordert somit weitere Untersuchungen.

Bei Mutationen von *RAS1* war die Tsa1p Lokalisation an die Zelloberfläche bei der dominant-aktiven [Ras1(V13)] sowie der dominant-negativen Mutation [Ras1(A16)] gegenüber dem Wildtyp nicht signifikant verändert; lediglich in der stationären Phase (YPD) der Zellen konnte Tsa1p jeweils an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Der Einfluss der Ras-Mutanten kann entweder zu gering sein, um Veränderungen an der Tsa1p-Lokalisation in der Kinetik zu detektieren, oder gegensätzliche Effekte in unterschiedlichen Signalwegen induzieren, die sich gegenseitig aufheben. Alternativ können *pde2* und *efg1* Sekundäreffekte auslösen, wie z.B. eine massive Umgestaltung der Zellwand, die zu den beobachteten Effekten führt.

Tsa1p lokalisiert also verstärkt an die Zelloberfläche, wenn die Zellwand eine veränderte Zusammensetzung aufweist oder die Zellen eine veränderte Morphologie zeigen. Dies deutet auf eine Funktion von Tsa1p für die korrekte Zusammensetzung der Zellwand auch von Blastosporen hin.

6.5 Molekulare Determinanten der Tsa1p-Oberflächenlokalisation

Um molekulare Determinanten von Tsa1p zu identifizieren, die an der Lokalisation des Proteins an die Zelloberfläche beteiligt sind, wurden verschiedene Punktmutationen in *TSA1* eingebracht: die katalytisch aktiven Cysteine an Aminosäurepositionen 47 und 168 wurden jeweils gegen Serin ausgetauscht sowie die C-terminalen 12 Aminosäuren durch Einfügen eines Stopcodons deletiert.

6.5.1 Einfluss der Cysteine

Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Cysteine zu Serinen an jeweils beiden Positionen zur katalytischen Inaktivität des Proteins führte. Unter oxidativem Stress kam es nicht mehr zum Wachstum dieser Stämme; sie zeigten denselben Phänotyp wie der Δ *tsa1*-Stamm. Von *ScTsa1p* Cys/Ser - Mutanten ist bekannt, dass das Cystein an Position 47, aber nicht das an Position 170 für die katalytische Aktivität des Proteins essentiell ist (Chae et al. 1994). In *C. albicans* scheinen beide Cysteine des Tsa1p für dessen katalytische Aktivität benötigt zu werden.

Die Cys/Ser Mutanten hatten ebenfalls die Fähigkeit verloren, multimere Komplexe

auszubilden. Dies konnte anhand von nicht-reduzierenden SDS-Gelen gezeigt werden: während Tsa1p aus Wildtypzellen multimere Komplexe im Bereich zwischen 35 und 45 kDa ausbilden konnte, lagen die Cys/Ser Mutanten unter diesen Bedingungen als monomeres Tsa1p auf Höhe von 21 kDa vor.

Ähnliches konnte auch für Tsa1p in *S. cerevisiae* beobachtet werden: beide Cysteine des Proteins werden hier benötigt, damit das Protein dimere Strukturen ausbilden kann (Chae et al. 1994). Die beiden Cysteine von ScTsa1p bilden in oxidiertem Zustand intermolekulare Disulfidbrücken mit den Cysteinen eines zweiten ScTsa1p aus (Chae et al. 1994), somit liegt Tsa1p vorwiegend als Dimer in der Zelle vor. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es auch zur Ausbildung multimerer Strukturen (Jang et al. 2004, Wood et al. 2002). Auch in *C. albicans* kann CaTsa1p über die beiden Cysteine Disulfidbrücken und somit multimere Strukturen ausbilden. Diese Fähigkeit geht dem Protein jedoch verloren, wenn eines der beiden Cysteine des CaTsa1p gegen Serin ausgetauscht wird.

Die Cys/Ser Mutanten wurden ebenfalls auf Tsa1p-Lokalisation an die Zelloberfläche getestet. Es zeigte sich, dass Tsa1p bei diesen Stämmen nicht mehr in der Lage ist, an die Zelloberfläche zu lokalisieren.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bildung von multimeren Strukturen eine Voraussetzung für die Translokation des Proteins an die Zelloberfläche darstellt bzw. dass das Protein vielleicht sogar als Dimer oder Oligomer dorthin lokalisiert.

Das Protein FGF-2 wird ebenfalls auf nicht-klassische Weise aus den Zellen sekretiert (Nickel 2003). Für den Export des Proteins wird vermutet, dass es als Oligomer durch die Plasmamembran geschleust wird. Die Oligomerisierung findet als Reaktion der Bindung von FGF-2 an Phosphoinositide (PI(4,5)P₂) statt.

Die Rekrutierung von FGF-2 durch Phosphoinositide (PI(4,5)P₂) wurde als wichtiger Schritt bei der Translokation des Proteins über die Zellmembran beschrieben. Es wird vermutet, dass die Interaktion von FGF-2 und PI(4,5)P₂ zur Oligomerisierung von FGF-2 führt, was den Membranübertritt einleitet (Nickel and Rabouille 2009, Nickel and Seedorf 2008). Die durch PI(4,5)P₂ eingeleitete Oligomerisierung von FGF-2 könnte somit die strukturelle Basis darstellen, durch die FGF-2 die Permeabilitätsbarriere der Plasmamembran durchschreiten kann (Nickel 2010). Ebenfalls wird FGF-2 in einer vollständig gefalteten Konformation über die Plasmamembran transportiert (Torrado et al. 2009). Dies bestätigt die Vermutung,

dass FGF-2 Oligomere das durch die Membran transportierte Zwischenprodukt sind, da der Proteintransport durch typische Membrankanäle normalerweise nur entfaltete Proteine zulässt (Rapoport 2007). Der erste Schritt dieses Exportmechanismus ist die Bindung an PI(4,5)P₂. PI(4,5)P₂ wird speziell mit der Rekrutierung von cytosolischen Proteinen an die innere Schicht der Plasmamembran in Verbindung gebracht. Es existieren mehrere Erkennungsmotive für PI(4,5)P₂, dazu gehört die Anhäufung von basischen Aminosäuren (Heo et al. 2006). Im Fall von FGF-2 sind dies eine große Anzahl von Lysinen und Argininen am C-Terminus des Proteins, die eine Bindung an PI(4,5)P₂ ermöglichen (Nickel and Seedorf 2008).

Tsa1p besitzt in seiner C-terminalen Region sowie in anderen Bereichen ebenfalls mehrere Lysine. Weitere Studien könnten einen ähnlichen Transportmechanismus für dieses Protein identifizieren.

6.5.2 Einfluss des C-Terminus

Die Deletion des C-Terminus bei Tsa1p hatte ebenfalls die katalytische Inaktivität des Proteins wie bei den Cys/Ser Mutantenstämmen zur Folge. Jedoch war Tsa1p mit deletiertem C-Terminus durchaus in der Lage, multimere Strukturen auszubilden, wie im nicht-reduzierenden SDS-Gel gezeigt werden konnte. Im reduzierenden Gel konnte die Verringerung des Molekulargewichts um 1,46 kDa beobachtet werden, die durch Abtrennen der C-terminalen 12 Aminosäuren entstanden war.

Tsa1p mit deletiertem C-Terminus war in der Lage an die Zelloberfläche lokalisieren. Die Deletion des C-Terminus von Tsa1p hatte also folglich unter den getesteten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation des Proteins an die Zelloberfläche.

Für humanes Tsa1p (hTsa1p) wurde beschrieben, dass es mit der Plasmamembran von Erythrozyten interagiert (Cha et al. 2000). Diese Interaktion ist abhängig vom C-Terminus des Proteins: eine Sequenz bestehend aus 13 Aminosäuren bindet an die Phospholipidschicht der Membran, ähnlich zu dem von Nickel und Seedorf beschriebenen Mechanismus. Die Lokalisation von hTsa1p scheint von der Spaltung des C-Terminus abhängig zu sein. Dabei hat der C-Terminus weder einen Einfluss auf die Oligomerisierung des Proteins noch dessen katalytische Aktivität, was auf eine primäre Funktion des C-Terminus zur Lokalisation des Proteins hTsa1p

hindeutet.

Dies konnte für *CaTsa1p* nicht gezeigt werden. Zwar hatte der C-Terminus keinen Einfluss auf die Fähigkeit des Proteins zu Oligomerisieren, jedoch führte die Deletion der C-terminalen 12 Aminosäuren zum Verlust der katalytischen Aktivität des Proteins. Der C-Terminus von *Tsa1p* hatte unter den getesteten Bedingungen ebenfalls keine Funktion bei der Translokation des Proteins an die Zelloberfläche.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die katalytische Aktivität des Proteins bzw. ein katalytisch aktives Protein nicht ausschlaggebend für die Translokation an die Zelloberfläche ist. Zwar verlor bei den erzeugten Mutationen *Tsa1p* jeweils die Redoxaktivität, jedoch konnte im Gegensatz zu den *Tsa1p* Cys/Ser Mutanten *Tsa1p* mit deletiertem C-Terminus sehr wohl an die Zelloberfläche lokalisieren. Von größerer Bedeutung für den Transport an die Zelloberfläche scheint die Fähigkeit von *Tsa1p* zu sein, multimer Komplexe ausbilden zu können. Bei Deletion des C-Terminus kann *Tsa1p* multimerisieren, bei den Cys/Ser Mutanten war dies nicht mehr möglich. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob *Tsa1p* als Multimer an die Zelloberfläche lokalisiert bzw. die Multimerisierung Voraussetzung für die Translokation ist, ähnlich wie es für FGF-2 beschrieben wurde (siehe oben).

6.6 Einfluß von *Tsa1p* auf die Wirt-Pathogen-Interaktion

Die Zellwand von *C. albicans* bildet die Kontaktstelle zwischen dem Pathogen und den Immunzellen des Wirtes. Als Hauptbestandteil der Zellwand dienen β -Glucane als antigene Strukturen, die von Rezeptoren der Immunzellen erkannt werden können. Nach Erkennung eingedrungener Pathogene versuchen Immunzellen, diese unter anderem durch Phagozytose und die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) letztendlich abzutöten.

Die unterschiedlichen *Tsa1p*-Mutantenstämme wurden auf ihre Interaktion mit Immunzellen untersucht. Der Stamm *CAI4-URA3* war der Ausgangsstamm zur Erzeugung der einzelnen *Tsa1p*-Mutantenstämme und diente somit als vergleichende Referenz für die Mutantenstämme.

Der Δ *tsa1* Stamm exponierte im Vergleich zum Wildtyp weniger β -1,3-Glucan an seiner Zellwand. Dies korreliert mit einer stark verminderten ROS-Produktion durch

Makrophagen. Die Pathogene werden durch Verringerung des antigenen Bestandteils schlechter durch Immunzellen wahrgenommen. Die Phagozytoserate durch Makrophagen entsprach jedoch der des Wildtypstammes. Die Überlebensrate nach Kontakt mit humanen Makrophagen entsprach ebenfalls der des Wildtyps jedoch nach Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten überlebten nur etwa die Hälfte aller Zellen des Δ tsa1-Stammes.

TSA1 wurde nach Kontakt mit Makrophagen nicht transkriptionell induziert wie mittels Tsa1p-GFP nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 33). Anders die Situation nach Inkubation der Zellen mit Neutrophilen Granulozyten: *TSA1* wurde bei Kontakt mit diesen Immunzellen transkriptionell induziert (unveröffentlichte Daten C. Urban, persönliche Kommunikation).

Dies korreliert mit unseren Daten: die Überlebensrate des Δ tsa1 Stammes nach Kontakt mit Makrophagen entsprach der des Wildtyps. Folglich wird Tsa1p für ein Überleben der Zellen in diesen Immunzellen nicht benötigt. Bei Kontakt mit Makrophagen wurde Tsa1p im Tsa1p-GFP Stamm auch nicht transkriptionell induziert. Anders bei Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten: ist *TSA1* deletiert, überlebten nur weniger als die Hälfte aller Zellen. Hier ist Tsa1p wohl ein entscheidender Faktor beim Überleben der Zellen. Im Tsa1p-GFP Stamm kam es auch zu einer transkriptionellen Induktion von *TSA1*. Dies spiegelt die unterschiedlichen Mechanismen von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wieder, um Pathogene unschädlich zu machen. Dies kann auch schon von der unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer Rezeptoren (PRRs) abgeleitet werden: Makrophagen haben eine hohe Anzahl an TLRs und CLRs an ihrer Oberfläche, Neutrophile Granulozyten dagegen eine geringe Anzahl an TLRs (Arana et al. 2009).

Der Reversionsstamm mit einer Kopie wildtypischem *TSA1* exponierte ebenfalls weniger β -1,3-Glucan an seiner Zelloberfläche. Dies könnte auf den bei Tsa1p stark ausgeprägten Gen-Dosis-Effekt zurückzuführen sein, da dieser Stamm im Vergleich zu den 4 Kopien im Wildtyp nur eine Kopie *TSA1* enthält. Auch hier konnte eine verminderte Produktion an ROS festgestellt werden und auch die Phagozytoserate der Zellen war geringer als die des Wildtyps. Diese Beobachtungen stimmen gut überein: der Stamm exponiert weniger β -1,3-Glucan, wird dadurch schlechter von Immunzellen erkannt und somit ist die Reaktion dieser im Hinblick auf Phagozytoserate und ROS-Produktion auch geringer. Die Überlebensrate nach

Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten ist hier jedoch gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht.

Bei den Cys/Ser Mutanten konnten leicht abweichende Beobachtungen gemacht werden: zwar exponierten die Zellen etwas mehr β -1,3-Glucan, jedoch war die Phagozytoserate sowie die Produktion von ROS gegenüber dem Wildtyp verringert. Auch die Überlebensrate nach Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten war leicht verringert.

Die Ergebnisse für die Tsa1p-Mutante mit deletiertem C-Terminus (*TSA1-AS184*) hingegen korrelieren sehr gut: der Stamm exponiert von allen getesteten Stämmen am meisten β -1,3-Glucan an der Zelloberfläche, sogar über die gesamte Zelloberfläche gleichmäßig verteilt und nicht nur auf die Knospungsnarben beschränkt. Als Reaktion darauf werden durch Makrophagen sehr schnell ROS gebildet; mehr als doppelt so viel wie als Reaktion auf den Wildtyp. Die Phagozytoserate durch Makrophagen war hier ebenfalls erhöht, da aufgrund der starken Präsentation des antigenen β -1,3-Glucans die Zellen viel besser durch den Immunzellrezeptor Dectin-1 erkannt werden können. Die Überlebensrate nach Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten ist nur knapp unterhalb der des Wildtyps.

Durch Änderungen in der β -1,3-Glucan Exposition auf der Zelloberfläche können die Zellen entweder besser oder schlechter durch den Immunzellrezeptor Dectin-1 erkannt werden, was schliesslich zu einer erhöhten oder verminderten Produktion von ROS bzw. Phagozytoserate führte. Zellen maskieren normalerweise ihr β -1,3-Glucan unter einer Mannanschicht, um der Erkennung durch Immunzellen zu entgehen. Es muss demnach eine Störung in der Zellwandzusammensetzung bei der *TSA1-AS184* Mutante geben. Im Fall des Δ tsa1 Stammes befindet sich keine *TSA1* Kopie im Organismus, bei der C-terminalen Mutante hingegen eine mutierte Kopie. Dieses mutierte Tsa1p ist zwar katalytisch inaktiv, kann jedoch an die Zellwand lokalisieren. Es lässt vermuten, dass Tsa1p eine Funktion hat, die unabhängig von der katalytischen Peroxidase-Aktivität ist. Vermutlich ist Tsa1p auch für den korrekten Zellwandaufbau bei Blastosporen verantwortlich.

Die Überlebensraten nach Kontakt mit Neutrophilen Granulozyten waren bei den verschiedenen Tsa1p-Mutantenstämmen unterschiedlich. Zellen, denen *TSA1* gänzlich fehlt, wurden verstärkt von den Immunzellen abgetötet. Hier fehlte offenbar

die Peroxidase Funktion von Tsa1p, um die Zellen vor den von Immunzellen produzierten ROS zu schützen. Der Reversionsstamm mit einer Kopie wildtypischem *TSA1* hingegen zeigte die gleiche Überlebensrate wie der Wildtyp. Hier reichte eine Kopie *TSA1* aus, um den Zellen Schutz zu vermitteln. Die Cys/Ser Mutanten sowie die C-terminale Mutante hatten jeweils nur geringe Abweichungen in den Überlebensraten im Vergleich zum Wildtyp. Bei diesen Stämmen ist Tsa1p katalytisch inaktiv; somit wurde erwartet, dass sich diese Stämme eher wie der Deletionsstamm verhalten. Tsa1p scheint demzufolge bei Kontakt mit Immunzellen eine weitere Funktion außer der vor ROS schützenden Peroxidaseaktivität zu besitzen, die es den Zellen ermöglicht, Kontakt mit Immunzellen zu überleben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tsa1p auf nicht-klassische, ER/Golgi-unabhängige Weise an die Zelloberfläche von *C. albicans* Blastosporen und Hyphen transportiert wird. Bei Hyphen ist das Protein ständig an der Zelloberfläche lokalisiert, bei Blastosporen nur zu Anfang der Wiederaufnahme des Wachstums nach Transfer der Zellen in frisches Medium. Dies ist zumindest zum Teil abhängig von der Morphologie der Zellen. Es konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Translokation des Proteins an die Zelloberfläche und Stressinduktion nachgewiesen werden. Der Transport an die Zelloberfläche ist unabhängig vom C-Terminus des Proteins. Beide Cysteine werden jedoch für den Transport benötigt, möglicherweise auch nur indirekt durch Vermittlung dimerer und multimerer Strukturen von Tsa1p. Es konnten keine an der Zelloberflächenlokalisierung direkt beteiligten Signalwege identifiziert werden, jedoch lokalisiert Tsa1p verstärkt bei Stämmen an die Zelloberfläche, die Defekte in ihrer Zellwandzusammensetzung aufweisen. Tsa1p hat demnach eine wichtige Funktion für den korrekten Aufbau der Zellwand bei Blastosporen. Ebenfalls konnte ein Einfluss von Tsa1p auf die Wirt-Pathogen Interaktion festgestellt werden: Stämme mit mutiertem Tsa1p zeigen ebenfalls eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand auf, was für die Exposition des β -1,3-Glucans gezeigt wurde. Dies führt zu einer veränderten Erkennung durch Immunzellen. Tsa1p hat vermutlich noch eine andere Funktion als den Schutz der Zellen vor ROS beim Überleben nach Kontakt mit Immunzellen, was die Ergebnisse mit katalytisch inaktiven, mutierten Formen von Tsa1p nahelegen.

Weitere Untersuchungen werden zeigen, welche genauen Funktionen Tsa1p an der Zellwand ausübt. Von besonderem Interesse ist die Identifikation des zum klassischen ER/Golgi-vermittelten Proteinsekretionsweg parallel verlaufenden Transportmechanismus von Tsa1p. Viele nicht-klassisch transportierte Proteine wurden bisher entdeckt, aber nur sehr wenig ist über die genauen Abläufe des Transportes bekannt. Die Identifizierung des Transportmechanismus für Tsa1p würde wertvolle neue Informationen auf dem noch sehr jungen Forschungsgebiet der nicht-klassischen Proteinsekretion liefern.

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod & B. Hube (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem*, 281, 688-94.
- Alem, M. A., M. D. Oteef, T. H. Flowers & L. J. Douglas (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*, 5, 1770-9.
- Alonso-Monge, R., F. Navarro-Garcia, G. Molero, R. Diez-Orejas, M. Gustin, J. Pla, M. Sanchez & C. Nombela (1999) Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 181, 3058-68.
- Andrei, C., C. Dazzi, L. Lotti, M. R. Torrisi, G. Chimini & A. Rubartelli (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*, 10, 1463-75.
- Arana, D. M., R. Alonso-Monge, C. Du, R. Calderone & J. Pla (2007) Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol*, 9, 1647-59.
- Arana, D. M., D. Prieto, E. Roman, C. Nombela, R. Alonso-Monge & J. Pla (2009) The role of the cell wall in fungal pathogenesis. *Microbial Biotechnology*, 2, 308-320.
- Arioka, M., A. Hirata, A. Takatsuki & M. Yamasaki (1991) Brefeldin A blocks an early stage of protein transport in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*, 137, 1253-62.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley, New York.
- Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow & A. J. Brown (1996) The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol*, 178, 5353-60.
- Beck-Sague, C. & W. R. Jarvis (1993) Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis*, 167, 1247-51.
- Berman, J. & P. E. Sudbery (2002) *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet*, 3, 918-30.
- Birnie, G. D. (1988) The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl*, 9, 41-5.
- Biswas, S., P. Van Dijck & A. Datta (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 348-76.
- Biteau, B., J. Labarre & M. B. Toledano (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425, 980-4.
- Bockmuhl, D. P., S. Krishnamurthy, M. Gerads, A. Sonneborn & J. F. Ernst (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 42, 1243-57.
- Boschman, C. R., U. R. Bodnar, M. A. Tornatore, A. A. Obias, G. A. Noskin, K.

- Englund, M. A. Postelnick, T. Suriano & L. R. Peterson (1998) Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 734-8.
- Braun, B. R. & A. D. Johnson (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science*, 277, 105-9.
- Braun, B. R. & A. D. Johnson (2000) TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics*, 155, 57-67.
- Braun, B. R., D. Kadosh & A. D. Johnson (2001) NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J*, 20, 4753-61.
- Brown, G. D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6, 33-43.
- Calderone, R. 2002. *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: ASM Press.
- Calera, J. A. & R. Calderone (1999) Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative CaHK1 two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology*, 145 (Pt 6), 1431-42.
- Cao, Y. Y., Y. B. Cao, Z. Xu, K. Ying, Y. Li, Y. Xie, Z. Y. Zhu, W. S. Chen & Y. Y. Jiang (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 584-9.
- Cappellaro, C., V. Mersa & W. Tanner (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol*, 180, 5030-7.
- Care, R. S., J. Trevethick, K. M. Binley & P. E. Sudbery (1999) The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol*, 34, 792-8.
- Carmel-Harel, O. & G. Storz (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol*, 54, 439-61.
- Casanova, M., J. L. Lopez-Ribot, J. P. Martinez & R. Sentandreu (1992) Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. *Infect Immun*, 60, 4898-906.
- Cha, M. K., C. H. Yun & I. H. Kim (2000) Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. *Biochemistry*, 39, 6944-50.
- Chae, H. Z., I. H. Kim, K. Kim & S. G. Rhee (1993) Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268, 16815-21.
- Chae, H. Z., T. B. Uhm & S. G. Rhee (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7022-6.
- Chaffin, W. L. (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 495-544.
- Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo & J. P. Martinez (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 130-80.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy & G. R. Fink (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5048-52.
- Choi, M. H., D. Sajed, L. Poole, K. Hirata, S. Herdman, B. E. Torian & S. L. Reed (2005) An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba*

- histolytica from oxidant attack. *Mol Biochem Parasitol*, 143, 80-9.
- Cloutier, M., R. Castilla, N. Bolduc, A. Zelada, P. Martineau, M. Bouillon, B. B. Magee, S. Passeron, L. Giasson & M. L. Cantore (2003) The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 38, 133-41.
- Cole, S. R., L. K. Ashman & P. L. Ey (1987) Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates. *Mol Immunol*, 24, 699-705.
- Csank, C., K. Schroppel, E. Leberer, D. Marcus, O. Mohamed, S. Meloche, D. Y. Thomas & M. Whiteway (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun*, 66, 2713-21.
- Cullen, P. J., W. Sabbagh, Jr., E. Graham, M. M. Irick, E. K. van Olden, C. Neal, J. Delrow, L. Bardwell & G. F. Sprague, Jr. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev*, 18, 1695-708.
- Cutler, J. E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, 45, 187-218.
- Davis, D., J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell & A. S. Ibrahim (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun*, 68, 5953-9.
- Denning, D. W. (1995) Can we prevent azole resistance in fungi? *Lancet*, 346, 454-5.
- Dixon, F. J., H. Jacot-Guillarmod & P. J. McConahey (1967) The effect of passively administered antibody on antibody synthesis. *J Exp Med*, 125, 1119-35.
- Doedt, T., S. Krishnamurthy, D. P. Bockmuhl, B. Tebarth, C. Stempel, C. L. Russell, A. J. Brown & J. F. Ernst (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 15, 3167-80.
- Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly & A. Warner (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med*, 172, 1785-94.
- Feng, Q., E. Summers, B. Guo & G. Fink (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 181, 6339-46.
- Fonzi, W. A. & M. Y. Irwin (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*, 134, 717-28.
- Freeman, B. A. & J. D. Crapo (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412-26.
- Fu, Y., A. S. Ibrahim, D. C. Sheppard, Y. C. Chen, S. W. French, J. E. Cutler, S. G. Filler & J. E. Edwards, Jr. (2002) *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol*, 44, 61-72.
- Gallis, H. A., R. H. Drew & W. W. Pickard (1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*, 12, 308-29.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira & D. M. Underhill (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 197, 1107-17.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons & D. M. Underhill (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*, 24, 1277-86.
- Garcia-Sanchez, S., A. L. Mavor, C. L. Russell, S. Argimon, P. Dennison, B.

- Enjalbert & A. J. Brown (2005) Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 16, 2913-25.
- Gazi, U. & L. Martinez-Pomares (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 214, 554-61.
- Giles, G. I. & C. Jacob (2002) Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem*, 383, 375-88.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay & D. R. Kirsch (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, 198, 179-82.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles & G. R. Fink (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68, 1077-90.
- Gow, N. A., A. J. Brown & F. C. Odds (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, 5, 366-71.
- Goyard, S., P. Knechtle, M. Chauvel, A. Mallet, M. C. Prevost, C. Proux, J. Y. Coppee, P. Schwartz, F. Dromer, H. Park, S. G. Filler, G. Janbon & C. d'Enfert (2008) The Yak1 kinase is involved in the initiation and maintenance of hyphal growth in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 19, 2251-66.
- Guthrie, C. & G. R. Fink. 2002. *Guide to yeast genetics and molecular and cell biology*. Academic Press, Amsterdam ; Boston ; London.
- Hayashi, T., A. Takatsuki & G. Tamura (1982) Effect of Brefeldin A on Biosynthesis of Cellular Components in *Candida albicans*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2241-2248.
- Heo, W. D., T. Inoue, W. S. Park, M. L. Kim, B. O. Park, T. J. Wandless & T. Meyer (2006) PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314, 1458-61.
- Hirotsu, S., Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino & T. Hakoshima (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12333-8.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 300-72.
- Hopp, T. P. & K. R. Woods (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 3824-8.
- Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Liseic, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault & K. W. Nickerson (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2982-92.
- Hostetter, M. K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, 7, 29-42.
- Hube, B. (2004) From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 7, 336-41.
- Hull, C. M., R. M. Raisner & A. D. Johnson (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, 289, 307-10.
- Janeway, C. A., Jr. & R. Medzhitov (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Jang, H. H., K. O. Lee, Y. H. Chi, B. G. Jung, S. K. Park, J. H. Park, J. R. Lee, S. S. Lee, J. C. Moon, J. W. Yun, Y. O. Choi, W. Y. Kim, J. S. Kang, G. W. Cheong, D. J. Yun, S. G. Rhee, M. J. Cho & S. Y. Lee (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a

- peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117, 625-35.
- Jeffery, C. J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*, 24, 8-11.
- Jensen, O. N. (2004) Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 8, 33-41.
- Johnson, E. M., D. W. Warnock, J. Luker, S. R. Porter & C. Scully (1995) Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother*, 35, 103-14.
- Jouault, T., S. Iyata-Ombetta, O. Takeuchi, P. A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira & D. Poulain (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis*, 188, 165-72.
- Jung, W. H. & L. I. Stateva (2003) The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology*, 149, 2961-76.
- Jung, W. H., P. Warn, E. Ragni, L. Popolo, C. D. Nunn, M. P. Turner & L. Stateva (2005) Deletion of PDE2, the gene encoding the high-affinity cAMP phosphodiesterase, results in changes of the cell wall and membrane in *Candida albicans*. *Yeast*, 22, 285-94.
- Kaposzta, R., L. Marodi, M. Hollinshead, S. Gordon & R. P. da Silva (1999) Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *J Cell Sci*, 112 (Pt 19), 3237-48.
- Karkowska-Kuleta, J., M. Rapala-Kozik & A. Kozik (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*, 56, 211-24.
- Ketchum, C. J., W. K. Schmidt, G. V. Rajendrakumar, S. Michaelis & P. C. Maloney (2001) The yeast α -factor transporter Ste6p, a member of the ABC superfamily, couples ATP hydrolysis to pheromone export. *J Biol Chem*, 276, 29007-11.
- Kohler, J. R. & G. R. Fink (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13223-8.
- Korting, H. C., B. Hube, S. Oberbauer, E. Januschke, G. Hamm, A. Albrecht, C. Borelli & M. Schaller (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol*, 52, 623-32.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Leberer, E., D. H Marcus, I. D. Broadbent, K. L. Clark, D. Dignard, K. Ziegelbauer, A. Schmidt, N. A. Gow, A. J. Brown & D. Y. Thomas (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13217-22.
- Leberer, E., D. H Marcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D. Y. Thomas & K. Schroppe (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 42, 673-87.
- Lewis, R. E., H. J. Lo, Raad, II & D. P. Kontoyiannis (2002) Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that

- is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1153-5.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, J. S. Bonifacino & R. D. Klausner (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56, 801-13.
- Liu, H., J. Kohler & G. R. Fink (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*, 266, 1723-6.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti & G. R. Fink (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90, 939-49.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- MacCallum, D. M., A. Coste, F. Ischer, M. D. Jacobsen, F. C. Odds & D. Sanglard (2010) Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 1476-83.
- Magee, B. B., M. Legrand, A. M. Alarco, M. Raymond & P. T. Magee (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 46, 1345-51.
- Magee, B. B. & P. T. Magee (2000) Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*, 289, 310-3.
- Malathi, K., K. Ganesan & A. Datta (1994) Identification of a putative transcription factor in *Candida albicans* that can complement the mating defect of *Saccharomyces cerevisiae* ste12 mutants. *J Biol Chem*, 269, 22945-51.
- Marodi, L., H. M. Korchak & R. B. Johnston, Jr. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 146, 2783-9.
- McGreal, E. P., M. Rosas, G. D. Brown, S. Zamze, S. Y. Wong, S. Gordon, L. Martinez-Pomares & P. R. Taylor (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology*, 16, 422-30.
- Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-26.
- Missall, T. A., M. E. Pusateri & J. K. Lodge (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, 51, 1447-58.
- Miyazato, A., K. Nakamura, N. Yamamoto, H. M. Mora-Montes, M. Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, K. Inden, X. Gang, K. Ishii, K. Takeda, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, Y. Adachi, N. Ohno, K. Mitsutake, N. A. Gow, M. Kaku & K. Kawakami (2009) Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect Immun*, 77, 3056-64.
- Monge, R. A., E. Roman, C. Nombela & J. Pla (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*, 152, 905-12.
- Mumberg, D., R. Muller & M. Funk (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 119-22.
- Murad, A. M., C. d'Enfert, C. Gaillardin, H. Tournu, F. Tekaia, D. Talibi, D. Marechal, V. Marchais, J. Cottin & A. J. Brown (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol*, 42, 981-93.
- Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds & A. J. Brown (2001b) NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis

- and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J*, 20, 4742-52.
- Netea, M. G. & L. Marodi (2010) Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol*, 31, 346-53.
- Newman, S. L. & A. Holly (2001) *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun*, 69, 6813-22.
- Nickel, W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*, 270, 2109-19.
- Nickel, W. (2010) Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol*, 21, 621-6.
- Nickel, W. & C. Rabouille (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 148-55.
- Nickel, W. & M. Seedorf (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 287-308.
- Nickerson, K. W., A. L. Atkin & J. M. Hornby (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3805-13.
- Nombela, C., C. Gil & W. L. Chaffin (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol*, 14, 15-21.
- Odds, F. C. 1988. *Candida and Candidiasis*. London: Bailliere Tindall.
- Oh, K. B., H. Miyazawa, T. Naito & H. Matsuoka (2001) Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4664-8.
- Orci, L., M. Tagaya, M. Amherdt, A. Perrelet, J. G. Donaldson, J. Lippincott-Schwartz, R. D. Klausner & J. E. Rothman (1991) Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell*, 64, 1183-95.
- Patton, W. F. (2002) Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 771, 3-31.
- Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela & C. Gil (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics*, 1, 967-82.
- Pujol, C., J. Reynes, F. Renaud, M. Raymond, M. Tibayrenc, F. J. Ayala, F. Janbon, M. Mallie & J. M. Bastide (1993) The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9456-9.
- Rapoport, T. A. (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663-9.
- Reid, D. M., N. A. Gow & G. D. Brown (2009) Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*, 21, 30-7.
- Roman, E., F. Cottier, J. F. Ernst & J. Pla (2009) Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 8, 1235-49.
- Roman, E., C. Nombela & J. Pla (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 25, 10611-27.
- Ross, S. J., V. J. Findlay, P. Malakasi & B. A. Morgan (2000) Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 11, 2631-42.
- Rothman, J. E. & F. T. Wieland (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*,

- 272, 227-34.
- Sabie, F. T. & G. M. Gadd (1992) Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 119, 147-56.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schafer, T., H. Zentgraf, C. Zehe, B. Brugger, J. Bernhagen & W. Nickel (2004) Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *J Biol Chem*, 279, 6244-51.
- Schauer, F. & R. Hanschke (1999) [Taxonomy and ecology of the genus *Candida*]. *Mycoses*, 42 Suppl 1, 12-21.
- Schweizer, A., S. Rupp, B. N. Taylor, M. Rollinghoff & K. Schroppel (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 38, 435-45.
- Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd & W. A. Fonzi (1999) HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol*, 181, 5273-9.
- Shin, D. H., S. Jung, S. J. Park, Y. J. Kim, J. M. Ahn, W. Kim & W. Choi (2005) Characterization of thiol-specific antioxidant 1 (TSA1) of *Candida albicans*. *Yeast*, 22, 907-18.
- Siegman-Igra, Y. & M. Y. Rabaw (1992) Failure of fluconazole in systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11, 201-2.
- Smith, D., F. Boag, J. Midgley & B. Gazzard (1991) Fluconazole resistant candida in AIDS. *J Infect*, 23, 345-6.
- Sohn, K., C. Urban, H. Brunner & S. Rupp (2003) EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol*, 47, 89-102.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard & J. F. Ernst (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 35, 386-96.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503-17.
- Staib, P., A. Binder, M. Kretschmar, T. Nichterlein, K. Schroppel & J. Morschhauser (2004) Tec1p-independent activation of a hypha-associated *Candida albicans* virulence gene during infection. *Infect Immun*, 72, 2386-9.
- Stensballe, A., S. Andersen & O. N. Jensen (2001) Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 1, 207-22.
- Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker & J. F. Ernst (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*, 16, 1982-91.
- Tada, H., E. Nemoto, H. Shimauchi, T. Watanabe, T. Mikami, T. Matsumoto, N. Ohno, H. Tamura, K. Shibata, S. Akashi, K. Miyake, S. Sugawara & H. Takada (2002) *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*, 46, 503-12.

- Torrado, L. C., K. Temmerman, H. M. Muller, M. P. Mayer, C. Seelenmeyer, R. Backhaus & W. Nickel (2009) An intrinsic quality-control mechanism ensures unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 in a folded conformation. *J Cell Sci*, 122, 3322-9.
- Trotter, E. W., J. D. Rand, J. Vickerstaff & C. M. Grant (2008) The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochem J*, 412, 73-80.
- Underhill, D. M. (2003) Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol*, 33, 1767-75.
- Underhill, D. M. (2004) Toll-like receptors and microbes take aim at each other. *Curr Opin Immunol*, 16, 483-7.
- Underhill, D. M. & A. Ozinsky (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, 20, 825-52.
- Urban, C., K. Sohn, F. Lottspeich, H. Brunner & S. Rupp (2003) Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett*, 544, 228-35.
- Urban, C., X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner & S. Rupp (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 57, 1318-41.
- Walker, L. A., N. A. Gow & C. A. Munro (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol*, 47, 117-26.
- Walter, P., R. Gilmore & G. Blobel (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell*, 38, 5-8.
- Wellington, M., K. Dolan & D. J. Krysan (2009) Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun*, 77, 405-13.
- Westermeier, R. (2007) Frequently made mistakes in electrophoresis. *Proteomics*, 7 Suppl 1, 60-3.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston & R. W. Davis (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285, 901-6.
- Witze, E. S., W. M. Old, K. A. Resing & N. G. Ahn (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, 4, 798-806.
- Wong, C. M., K. L. Siu & D. Y. Jin (2004) Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem*, 279, 23207-13.
- Wong, C. M., Y. Zhou, R. W. Ng, H. F. Kung Hf & D. Y. Jin (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*, 277, 5385-94.
- Wood, Z. A., L. B. Poole, R. R. Hantgan & P. A. Karplus (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*, 41, 5493-504.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19

- vectors. *Gene*, 33, 103-19.
- Zolnierowicz, S. & M. Bollen (2000) Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO J*, 19, 483-8.

Anhang

Peptidsequenzen der zwei aus dem Gel ausgeschnittenen Banden

Durch MS identifizierte Peptidsequenzen der zwei ausgeschnittenen Banden aus einem Coomassie-gefärbten, reduzierenden SDS-Gel (Kapitel 5.1.5, Abb. 13). Es wurde nach folgenden Modifizierungen gesucht: Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y). Die Suchparameter von MASCOT waren dabei wie folgt: Search Parameter: Charge=1+, MS Tol.: 50 ppm, Trypsin, Mascot 2.2.1, *C. albicans_as21* orf_trans_all_assembly_21.fasta

In allen Fällen identifiziertes Protein:

TSA1 CGDID:CAL0005458 Assembly 21, Chromosome 3 (1406650, 1406060) CDS, reverse complemented, translated using codon table 12 (196 residues)||Protein of TSA/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhPC) family; similar to thiol-dependent peroxidases of ox orf19.7417

Identifizierte Peptide von Tsa1p:

Ausgeschnittene untere Bande im SDS-Gel #1:

Intensity Coverage: 45.6 % (1874 cnts)

Sequence Coverage MS: 40.8%

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MAPVVQQPAP	SFKK TAVVDG	VFEEVTLEQY	KGKVVLLAFI	PLAFTFVCPS	EIIAYSEAVK	KFAEKDAQVL	FASTDSEYTW	LAWTNVARKD
100	110	120	130	140	150	160	170	180
GGIGKVDFFV	LADTN HSLSR	DYGVLIIEEG	VALRGIFLID	PKGVLRLQITI	NDLPVGRSVE	ESLRL LLEAFQ	FTEKYGEVCP	ANWHPGDETI
190	200							
KPSPEASKEY	FNKVNK							

Ausgeschnittene untere Bande im SDS-Gel #2:

Intensity Coverage: 70.8 % (142683 cnts)

Sequence Coverage MS: 48.0%

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MAPVVQQPAP	SFKK TAVVDG	VFEEVTLEQY	KGKVVLLAFI	PLAFTFVCPS	EIIAYSEAVK	KFAEKDAQVL	FASTDSEYTW	LAWTNVARKD
100	110	120	130	140	150	160	170	180
GGIGKVDFFV	LADTN HSLSR	DYGVLIIEEG	VALRGIFLID	PKGVLRLQITI	NDLPVGRSVE	ESLRL LLEAFQ	FTEKYGEVCP	ANWHPGDETI
190	200							
KPSPEASKEY	FNKVNK							

Ausgeschnittene obere Bande im SDS-Gel #1:

Intensity Coverage: 44.3 % (203443 cnts)

Sequence Coverage MS: 55.6%

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MAPVVQQPAP	SFKKTAVVDG	VFEEVTLEQY	KGKWVLLAFI	PLAFTFVCPS	EIIAYSEAVK	KFAEKDAQVL	FASTDSEYTW	LAWTNVARKD
100	110	120	130	140	150	160	170	180
GGIGKVDFFV	LADT ^{NHS} LSR	DYGVLIIEEG	VALRGIFLID	PKGVL ^{RQ} ITI	N ^{DL} PVGRSVE	ESLRLLEAFQ	FTEKYGEVCP	ANWHPGDETI
190	200							
KPSPEASKEY	FNKVNK							

Ausgeschnittene obere Bande im SDS-Gel #2:

Intensity Coverage: 70.9 % (141792 cnts)

Sequence Coverage MS: 44.9%

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MAPVVQQPAP	SFKKTAVVDG	VFEEVTLEQY	KGKWVLLAFI	PLAFTFVCPS	EIIAYSEAVK	KFAEKDAQVL	FASTDSEYTW	LAWTNVARKD
100	110	120	130	140	150	160	170	180
GGIGKVDFFV	LADT ^{NHS} LSR	DYGVLIIEEG	VALRGIFLID	PKGVL ^{RQ} ITI	N ^{DL} PVGRSVE	ESLRLLEAFQ	FTEKYGEVCP	ANWHPGDETI
190	200							
KPSPEASKEY	FNKVNK							

Sekretom von *C. albicans* Zellen (BFA-Versuch)

In der Tabelle sind die Proteine aufgeführt, die im Überstand (Sekretom) von Kulturen mit und ohne Zusatz von Brefeldin-A (BFA) nachgewiesen werden konnten. Die Proteine entsprechen den typischen Proteinen des Sekretoms; sie besitzen alle eine Sekretionsdomäne. Die beiden Ausnahmen stellen orf19.4948 und orf19.5034 dar, die jedoch nur in einem der beiden Ansätze durch jeweils ein Peptid identifiziert werden konnten.

Tab. 18: Sekretom von *C. albicans* Zellen

Protein Name	orf	MASCOT Score	Anzahl identifizierter Peptide	Anzahl Peptide für Quantifizierung	Ratio +BFA zu -BFA	Standardabweichung (+ zu - BFA)
Tos1	orf19.1690	999,7	16	10	0,76	0,02
Sim1	orf19.5032	672,1	12	10	0,38	0,01
Orf19.5063	orf19.5063	653,4	13	12	0,6	0,03
Ecm33	orf19.3010.1	559,9	7	5	0,66	0,03
Scw11	orf19.3893	550,0	6	5	0,34	0,01
Mp65	orf19.1779	527,0	10	6	0,41	0,02
Cht3	orf19.7586	489,8	7	5	0,71	0,03
Bgl2	orf19.4565	487,1	8	5	0,52	0,03
Cht2	orf19.3895	454,4	6	4	0,61	0,02

Rbe1	orf19.7218	439,7	7	6	0,39	0,01
Sun41	orf19.3642	397,9	8	5	0,54	0,03
Msb2	orf19.1490	377,7	5	4	0,53	0,01
Pga4	orf19.4035	347,6	7	5	0,64	0,06
Plb4.5	orf19.1442	302,7	5	4	0,41	0,02
Xog1	orf19.2990	273,0	4	3	0,45	0,04
Phr2	orf19.6081	264,1	4	4	0,73	0,04
Dag7	orf19.4688	259,4	5	3	0,81	0,01
Ywp1	orf19.3618	223,6	4	3	0,25	0,00
Als4	orf19.4555	147,2	2	1	0,52	0,00
Utr2	orf19.1671	134,8	2	1	1,79	0,00
Sod4	orf19.2062	110,3	2	2	0,38	0,01
Cfl4	orf19.1932	108,9	1	1	0,39	0,00
Pho100	orf19.4424	105,3	1	1	0,46	0,00
Rhd3	orf19.5305	98,2	2	2	0,32	0,04
Eng1	orf19.3066	89,3	2	2	0,45	0,02
Rbt4	orf19.6202	82,7	2	2	0,33	0,06
Pir1	orf19.220	77,4	1	1	0,99	0,00
Als1	orf19.5741	72,6	1	1	0,75	0,00
Pga45	orf19.2451	67,6	1	1	0,69	0,00
Gca2	orf19.999	60,9	2	1	0,52	0,00
Rbt5	orf19.5636	59,4	1	1	0,27	0,00
Fgr41	orf19.4910	45,9	1	1	0,55	0,00
Orf19.4948	orf19.4948	44,3	1			
Orf19.5034	orf19.5034	36,1	1			

Abbildungsverzeichnis

Abb. 01: Unterschiedliche Morphologien von <i>C. albicans</i>	13
Abb. 02: Regulation des Dimorphismus in <i>C. albicans</i>	15
Abb. 03: Schematische Darstellung der Zellwand.....	21
Abb. 04: Mögliche Exportwege für nicht-klassisch sekretierte Proteine.....	25
Abb. 05: Aminosäuresequenz von CaTsa1p.....	43
Abb. 06: Dotblot zur Überprüfung der Seren auf Spezifität.....	44
Abb. 07: Charakterisierung des gegen den N-Terminus von Tsa1p gerichteten Anti-Tsa1p-AK.....	47
Abb. 08: Tsa1p wird auf nicht-klassische Weise an die Zelloberfläche transportiert.....	72
Abb. 09: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p in Zeitreihen.....	75
Abb. 10: Einfluß von frischem Medium auf die Oberflächenlokalisierung.....	76
Abb. 11: Einfluß von Quorum sensing Molekülen auf die Oberflächen- lokalisierung.....	78
Abb. 12: Doppelbande stammt nicht von rückgefaltetem Tsa1p.....	80
Abb. 13: Doppelbande stammt nicht von der Markierung mit Biotin.....	81
Abb. 14: Oberflächenlokalisierung ist durch Redox-aktive Substanzen induzierbar.....	83
Abb. 15: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p bei klinischen Isolaten.....	85
Abb. 16: CaTsa1p komplementiert den <i>ScΔtsa1</i> Phänotyp unter oxidativem Stress.....	87
Abb. 17: CaTsa1p lokalisiert in <i>S. cerevisiae</i> ebenfalls an die Zelloberfläche.....	88
Abb. 18: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei <i>ras1</i> -Mutanten.....	92
Abb. 19: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei <i>pde2</i> -Mutanten.....	93
Abb. 20: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei <i>efg1</i> -Mutanten.....	94
Abb. 21: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei <i>msb2</i> -Mutanten.....	95
Abb. 22: Zelloberflächen-assoziiertes Tsa1p bei <i>hst6</i> -Mutanten.....	96
Abb. 23: Basenabfolge von <i>TSA1</i>	97
Abb. 24: Southern Blot der Reintegration von mutiertem <i>TSA1</i>	99
Abb. 25: Mutiertes Tsa1p ist katalytisch inaktiv.....	100
Abb. 26: Wachstumskurven der <i>TSA1</i> -Mutanten.....	101
Abb. 27: Ausbildung multimerer Strukturen wird beeinflusst.....	103

Abb. 28: Zelloberflächenlokalisierung von mutiertem Tsa1p.....	105
Abb. 29: Ermittlung der β -1,3-Glucan Exposition mittels Durchflusszytometrie	107
Abb. 30: Ermittlung der β -1,3-Glucan Exposition mittels Fluoreszenz- mikroskopie.....	108
Abb. 31: Produktion von ROS durch murine Makrophagen.....	110
Abb. 32: Phagozytose verschiedener <i>Candida</i> -Stämme durch murine Makrophagen.....	112
Abb. 33: Inkubation von murinen Makrophagen mit Zellen des Tsa1p-GFP- Stammes.....	113
Abb. 34: Überlebensrate verschiedener <i>Candida</i> -Stämme nach Kontakt mit Immunzellen.....	115
Abb. 35: Übersicht über die Gene, deren Mutation eine Änderung in der Tsa1p-Oberflächenlokalisierung zur Folge hatte.....	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 01: Enzyme	28
Tab. 02: Reaktionskits	29
Tab. 03: Pufferlösungen	29
Tab. 04: Allgemeine Kulturmedien für Hefen und Bakterien	30
Tab. 05: Medien mit Zusätzen	31
Tab. 06: Oligonukleotide für Klonierungen	31
Tab. 07: Oligonukleotide für Sequenzierungen	31
Tab. 08: Oligonukleotide für Kolonie-PCR	32
Tab. 09: Oligonukleotide zur Einbringung von Punktmutationen	32
Tab. 10: Oligonukleotide für Southern Blot (SB) und Northern Blot (NB) Sonden	32
Tab. 11: Plasmide und Vektoren	32
Tab. 12: Antikörper	33
Tab. 13: <i>C. albicans</i> Stämme	33
Tab. 14: <i>S. cerevisiae</i> Stämme	35
Tab. 15: Zelllinien	36
Tab. 16: Oberflächenlokalisierung von Tsa1p bei verschiedenen Mutanten	90
Tab. 17: Zusammenfassung der mit den div. Tsa1p-Mutantenstämmen erzielten Ergebnisse	116
Tab. 18: Sekretom von <i>C. albicans</i> Zellen	147

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich...

... Prof. Dr. Herwig Brunner und Prof. Dr. Thomas Hirth für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion am Fraunhofer IGB.

... PD Dr. Steffen Rupp für seine engagierte Betreuung, seinen fachkundigen Rat und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

... Prof. Dr. Peter Scheurich für sein Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

... Prof. Dr. Jesús Pla und seinen Mitarbeitern, ganz besonders Dr. David Arana, für die herzliche Aufnahme in ihr Labor in Madrid, die Unterstützung bei meinen Versuchen und die vielen Anregungen.

... Dr. Ekkehard Hiller für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen meiner Proben und für die Unterstützung bei allen Fragen rund ums Protein.

... der gesamten Arbeitsgruppe für die stetige Hilfsbereitschaft und die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Besonders danken möchte ich hierbei Dr. Xin Xiong, Marija Dukalska, Frauke Purschke und Dr. Martin Zavrel.

... Elena Lindemann und Sonja Weishaupt für die großartige Zeit im Büro. Elena: Danke für die lustigen Gespräche über einfach alles! Sonja: Danke für die Liebe zum Kaffee und Deinen unverwechselbaren Humor, der vieles leichter gemacht hat!

... meiner Schwester Kerstin und meinem Partner Rüdiger für die stundenlangen Telefonate, immer ein offenes Ohr und ihre Engelsgeduld mit mir.

... meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung, ständige Motivation und einfach alles!

Lebenslauf

von Martina Brachhold
geboren am 24. Mai 1980
in Stuttgart

Ausbildung

- 1990 - 1999 Paracelsus-Gymnasium Stuttgart
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- Oktober 2000 - Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim
November 2005 Hauptfach: Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
Nebenfächer: Zelluläre Mikrobiologie und Virologie
Abschluss: Diplom-Biologin
- August 2003 - Praktikum am Robert Koch Institut, Berlin
September 2003 Abteilung Influenzavirus-Genetik bei Dr. T. Wolff
- Juni 2004 - Praktikum bei Bayer CropScience, Monheim
Juli 2004 Abteilung Fungizide
- März 2005 - Diplomarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart bei PD Dr. S. Rupp
November 2005 Titel: „Genregulation in *Candida albicans* durch Mcm1p“
- Dezember 2005 - Projektarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart bei PD Dr. S. Rupp
Februar 2006
- Seit Promotion am Fraunhofer IGB und an der Universität Stuttgart bei
September 2006 PD Dr. S. Rupp
- November 2008 Forschungsaufenthalte an der Universidad Complutense Madrid
und Juli 2009 bei Prof. Dr. J. Pla, Abteilung Mikrobiologie

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Wörtliche oder sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

A handwritten signature in black ink, reading "Martina Brachhold". The script is cursive and somewhat stylized.

Martina Brachhold

Stuttgart, Januar 2011