

BERICHTE AUS FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG NR. 056

Silke Grumaz

Erweiterung des genetischen Codes von *Candida albicans* zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen *in vivo*

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Berichte aus Forschung und Entwicklung Nr. 056

Erweiterung des genetischen Codes
von *Candida albicans* zur Analyse von
Protein-Protein Interaktionen *in vivo*

Silke Grumaz

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:

Fraunhofer-Institut für
Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-40 00
Telefax 07 11 9 70-42 00
E-Mail info@igb.fraunhofer.de
URL www.igb.fraunhofer.de

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.
ISBN (Print): 978-3-8396-0685-8

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2014

Druck: Mediendienstleistungen des
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart

Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by **FRAUNHOFER VERLAG**, 2014

Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 07 11 9 70-25 00
Telefax 07 11 9 70-25 08
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL <http://verlag.fraunhofer.de>

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

**ERWEITERUNG DES GENETISCHEN CODES VON *CANDIDA*
ALBICANS ZUR ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN
INTERAKTIONEN *IN VIVO***

**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
Silke Grumaz, geb. Palzer
aus Oldenburg**

**Hauptberichter: PD Dr. Steffen Rupp
Mitberichter: PD Dr. Hans Rudolph
Prof. Dr. Peter Scheurich
Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2014**

**Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie der
Universität Stuttgart**

2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	10
SUMMARY.....	12
EINLEITUNG	14
1. <i>Candida albicans</i>.....	14
1.1 Humanpathogene Pilze als Verursacher von Mycosen unter besonderer Berücksichtigung von <i>C. albicans</i>	14
1.2 Molekularbiologie und phänotypische Charakteristika von <i>C. albicans</i>	19
2. Methoden zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen.....	24
2.1 Die Yeast-Two-Hybrid Methode.....	25
2.2 Affinitätsaufreinigungsmethoden.....	28
3. Der erweiterte genetische Code	31
3.1 Eigenschaften des genetischen Codes.....	31
3.2 Synthetische Aminosäuren.....	33
3.3 Die synthetische Aminosäure <i>p</i> -Azidophenylalanin	34
3.4 Methoden zum Einbau synthetischer Aminosäuren in Proteine	35
3.5 Modellproteine zur Studie von Protein-Protein Interaktionen in <i>C. albicans</i>	41
4. Zielsetzung.....	46
MATERIAL UND METHODEN	48
1. Material.....	48
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	48
1.2 Antibiotika / Antimykotika	48
1.3 Reaktions-Kitsysteme.....	48
1.4 Pufferlösungen	49
1.5 Kulturmedien	49
1.6 Enzyme.....	51
1.7 Antikörper	51
1.8 Plasmide.....	52
1.9 Oligonukleotide.....	54

INHALTSVERZEICHNIS

1.10	<i>Escherichia coli</i> Stamm	58
1.11	<i>Candida albicans</i> Stämme.....	59
1.12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm	61
2.	Methoden	61
2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	61
2.2	Kultivierung von <i>C. albicans</i>	61
2.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	62
2.4	GFP-Fluoreszenzassay	62
2.5	Methoden zur Analyse von DNA	63
2.5.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	63
2.5.2	Präparation genomischer DNA aus <i>C. albicans</i>	63
2.5.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	64
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	65
2.5.5	PCR-basierte Mutagenese	66
2.5.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	70
2.5.7	Klonierung.....	71
2.5.8	Klonierung spezieller Plasmide.....	72
2.6	Transformation.....	78
2.6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	78
2.6.2	Transformation von <i>C. albicans</i>	79
2.7	Methoden zur Analyse von RNA	81
2.7.1	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	81
2.7.2	Isolation von Gesamt-RNA unter sauren Bedingungen	82
2.7.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	84
2.7.4	Sequenzspezifischer Nachweis von tRNAs durch Northern Blot	84
2.7.5	Nachweis aminoacylierter tRNAs durch <i>Acid Urea PAGE</i>	86
2.8	Methoden zur Analyse von Proteinen.....	88
2.8.1	Crosslink-Induktion	88
2.8.2	Proteinisolation	88
2.8.3	Proteinfällung.....	89

2.8.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	89
2.8.5	Immunpräzipitation	90
2.8.6	Nickel-Affinitätschromatographie	91
2.8.7	Kombination von Affinitätschromatographie und Immunpräzipitation	93
2.8.8	Staudinger-Ligation	95
2.8.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	96
2.8.10	Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel	97
2.8.11	Nachweis spezifischer Proteine durch Western Blot	98
2.8.12	Massenspektrometrie	99
2.9	Datenbanken und Datenverarbeitung	102
ERGEBNISSE		104
1.	Etablierung und Optimierung der <i>EcTyrtrRNA_{CUA}</i> Expression	104
1.1	Polymerase III-regulatorische Sequenzen	104
1.2	Kopienzahl der <i>EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	108
2.	Etablierung und Optimierung der Expression der AzF-tRNA-Synthetase	110
2.1	Transkription der tRNA-Synthetase für <i>p</i> -Azidophenylalanin	110
2.2	Codon Usage	111
3.	Funktionalität des orthogonalen Pärchens in <i>C. albicans</i>	113
3.1	AzF-RS Varianten	113
3.2	Beladung der <i>EcTyrtrRNA_{CUA}</i> in <i>C. albicans</i>	113
3.3	Quantifizierung der Translation mit yeGFP	116
3.4	Analyse toxischer Effekte des erweiterten genetischen Codes	119
4.	Einbau der synthetischen Aminosäure AzF in Zielproteine	120
4.1	Einbau von AzF in Tsa1p	121
4.2	Einbau von AzF in Tup1p	125
4.3	Nachweis von AzF in Tsa1p und Tup1p	126
5.	Induktion von Quervernetzungen	130
5.1	Crosslink-Induktion mit mutanten Tsa1p Varianten	132
5.2	Crosslink-Induktion mit mutanten Tup1p Varianten	135
6.	Identifizierung der Interaktionspartner	136

7. Universelle Anwendbarkeit der Methodik	141
DISKUSSION.....	144
1. Etablierung und Optimierung von <i>EcTyrtrRNA_{CUA}</i> und AzF-RS.....	144
2. Orthogonalität des erweiterten genetischen Codes in <i>C. albicans</i>	147
2.1 <i>EcTyrtrRNA_{CUA}</i> und AzF-RS	148
2.2 Das Amber Codon	149
2.3 Bedeutung der Orthogonalität für die Anwendung des erweiterten genetischen Codes	152
3. Einbau der synthetischen Aminosäure AzF in Zielproteine.....	153
4. Induktion von Quervernetzungen	154
5. Biologische Relevanz der detektierten Interaktionen.....	156
6. Universelle Anwendbarkeit der Methodik	159
7. Mögliche Weiterentwicklungen und Anwendungsfelder.....	160
LITERATURVERZEICHNIS	162
ANHANG.....	181
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	192
TABELLENVERZEICHNIS	194
DANKSAGUNG.....	196
LEBENS LAUF	198
PUBLIKATIONEN.....	199
ERKLÄRUNG	201

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

αMEM	<i>Minimal Essential Medium Alpha</i> nach Eagle	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Å	Ångström	Endkonz.	Endkonzentration
°C	Grad Celsius	ESI	Elektrospray-Ionisierung
μ	mikro	EtOH	Ethanol
aaRS	Aminoacyl-tRNA Synthetase	FLP	Flippase
AD	Aktivator-domäne	FRT	<i>FLP recognition target</i>
AMP	Ampicillin	g	Gramm
APS	Ammoniumpersulfat	g	Erdbeschleunigung
AS	Aminosäure	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
AUP	<i>acid urea PAGE</i> (saure Harnstoff Polyacrylamid-gelelektrophorese)	h	Stunde
AzF	<i>p</i> -Azidophenylalanin	H ₂ O _{mol.biol.}	molekularbiologisches Wasser
AzF-RS	tRNA-Synthetase mit Substratspezifität für <i>p</i> -Azidophenylalanin	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
b (bp)	Basen (Basenpaare)	IP	Immunpräzipitation
bidest.	bidestilliert	kb	Kilobasen (10 ³ Basenpaare)
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	kDa	Kilodalton
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	Konz.	Konzentration
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)	l	Liter
Ca	<i>Candida albicans</i>	LB	Luria Bertani (Medium)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	M [mol/l]	Molare Konzentration
CAP	Chloramphenicol	mA	Milliampere
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	min	Minute
CT	C-terminal	ml	Milliliter
Da	Dalton	mM	Millimolare Konzentration [mmol/l]
DBD	DNA-Bindedomäne	MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MS	Massenspektrometrie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)	Nano-LC-ESI-MS/MS	<i>nano liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DTT	Dithiothreitol	nm	Nanometer
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>	Nou	Nourseothricin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

nt	Nukleotid	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NT	N-terminal	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
OD	Optische Dichte	SC	<i>synthetic complete</i> (Medium)
ORF	<i>open reading frame</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	SSC	<i>saline sodium citrate</i> (Puffer)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Puffer)	TAP	<i>tandem affinity purification</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese	<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid	TE	Tris-EDTA
Pol	RNA-Polymerase	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PP	Polypropylen	TOF/TOF	<i>tandem time-of-flight</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid	U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)	UV	Ultraviolettes Licht
RNase	Ribonuklease	V	Volt
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)	v/v	<i>volume per volume</i>
RT	Raumtemperatur	WT	Wildtyp
s	Sekunde	w/v	<i>weight per volume</i>
		YPD	<i>yeast extract – peptone – dextrose</i> (Medium)
		YPM	<i>yeast extract – peptone – maltose</i> (Medium)

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

ZUSAMMENFASSUNG

Candida albicans ist der wichtigste pathogene Pilz des Menschen und verursacht jährlich eine beträchtliche Anzahl an Infektionen, die mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Die Pathogenität von *C. albicans* wird durch eine Vielfalt an Virulenzfaktoren reguliert, die unter anderem Transkriptionsregulatoren, sekretierte Proteine oder Proteine der Zellwand umfassen können. Um neue Einblicke in die Pathogenitätsmechanismen des opportunistischen Pathogens *C. albicans* zu erhalten, ist deshalb die Analyse dieser zentralen Virulenzfaktoren essentiell. Insbesondere Arbeiten im Bereich der direkten Protein Interaktionen dieser Virulenzfaktoren *in vivo* können zu einem verbesserten Verständnis führen. Nur wenige Methoden der Proteinbiochemie sind jedoch zur Analyse direkter molekularer Interaktionen von Proteinen *in vivo* geeignet, wobei bisher keine entsprechenden Methoden speziell für die molekulare Charakteristika von *C. albicans* entwickelt wurden. Aus diesem Grund sollte für *C. albicans* die Methodik des erweiterten genetischen Codes etabliert werden, mit der Protein-Protein Interaktionen unter minimaler Modifikation des Zielproteins mit hoher Spezifität *in vivo* analysierbar sind. Darüber hinaus ist die Methodik auch für die Analyse schwacher oder transienter Interaktionen geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der genetische Code von *C. albicans* mit der synthetischen Photocrosslinker-Aminosäure *p*-Azidophenylalanin (AzF) erweitert. Durch positionsspezifische Integration von AzF in Proteine können interagierende Proteine, die sich in räumlicher Nähe dieser Aminosäure befinden, durch UV-induzierten Photocrosslink kovalent verbunden werden. Dadurch sind unbekannte Interaktionen stabil für weitere Aufreinigungs- und Identifikationsschritte. Die Inkorporation der synthetischen Aminosäure wurde mit einem orthogonalen Pärchen, bestehend aus einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit Spezifität für AzF (AzF-RS) und einer Suppressor-tRNA (*EcTyr*tRNA_{CUA}) aus *E. coli* realisiert. Das orthogonale Pärchen wurde bereits für den Einbau von AzF in Proteine in *S. cerevisiae* beschrieben und sollte ausgehend davon für die Anwendung in *C. albicans* etabliert werden. In diesem Zusammenhang ist die AzF-RS vollständig für die Codon Usage von *C. albicans* optimiert worden, darüber hinaus konnte eine Variante mit verbesserter Beladungseffizienz identifiziert werden. Die Expression der *EcTyr*tRNA_{CUA} wurde hinsichtlich der Pol III-regulatorischen Sequenzen und der

Kopienzahl optimiert. Basierend auf diesem orthogonalen System konnte AzF in entsprechend modifizierten *C. albicans* Stämmen in Tsa1p und den zentralen Virulenzfaktor Tup1p positionsspezifisch inkorporiert werden. Nach UV-Belichtung konnten für einige substituierte Positionen dieser Proteine höhermolekulare Komplexe detektiert werden, die spezifisch von der Supplementation des Mediums mit AzF und UV-Belichtung abhängig waren. Durch massenspektrometrische Verfahren und immunologische Detektion wurden die höhermolekularen Komplexe als Homodimere, bestehend aus jeweils einem mutanten und einem wildtypischen Tsa1p bzw. Tup1p, *in vivo* identifiziert. Somit konnte der erweiterte genetische Code zur Analyse von binären Protein-Protein Interaktionen *in vivo* erfolgreich für *C. albicans* etabliert werden.

SUMMARY

Candida albicans is the most prevalent pathogenic fungus in humans and elicits numerous cases of infectious diseases associated with high morbidity and mortality every year. The pathogenicity of *C. albicans* is regulated by a multitude of virulence factors consisting of transcriptional regulators, secreted proteins or cell wall proteins. For novel insights into the pathogenicity of the opportunistic pathogen *C. albicans*, studies on these central virulence factors are therefore essential. Especially studies on direct protein interactions of these central virulence factors would lead to a deeper understanding of virulence mechanisms. However, protein biochemistry provides only limited methods for the analyses of direct molecular interactions of proteins *in vivo* and no methods are available which are compatible for the molecular characteristics of *C. albicans*. Therefore, the aim of this work was to establish the methodology of the expanded genetic code for *C. albicans*, to study direct protein-protein interactions of only minimally modified target proteins with highest specificity *in vivo*. Furthermore, the method is also suitable for the detection of weak or transient interactions. In this work, the genetic code of *C. albicans* was therefore expanded with the synthetic photocrosslinking amino acid *p*-azidophenylalanine (AzF). By position-specific incorporation of AzF into proteins, interacting proteins in close proximity can be covalently linked by UV-induced photocrosslink. This makes unknown interactions stable for further downstream processing and identification. The incorporation of the synthetic amino acid was realized using an orthogonal pair of aminoacyl-tRNA synthetase with substrate specificity for AzF (AzF-RS) and suppressor tRNA (*Ec*Tyr_{tRNA_{CUA}), derived from *E. coli*. This orthogonal pair has previously been reported for the incorporation of AzF into proteins of *S. cerevisiae* and was therefore utilized for adaption and application in *C. albicans*. In this context, the AzF-RS was completely optimized for the codon usage of *C. albicans*. Furthermore, a variant with improved aminoacylation efficiency could be identified. The expression of the *Ec*Tyr_{tRNA_{CUA} was improved regarding Pol III-regulating sequences and copy number. Based on this orthogonal system, AzF was position-specifically incorporated into *C. albicans* Tsa1p as well as into the central virulence factor Tup1p. UV irradiation revealed higher molecular weight complexes for these proteins, depending on the substituted position. Formation of these higher molecular weight complexes was}}

specifically dependant on media supplementation with AzF and UV irradiation. Mass spectrometry and immunologic detection identified the higher molecular weight complexes as homodimers consisting of one mutant and one wild type Tsa1p or Tup1p, respectively. In conclusion, with this work, the expanded genetic code of *C. albicans* was successfully established for the analysis of binary protein-protein interactions *in vivo*.

EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methodenetablierung zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen im humanpathogenen Pilz *C. albicans* durchgeführt. Im Folgenden soll daher auf die in diesem Zusammenhang wichtigen Aspekte der Pathologie und Molekularbiologie von *C. albicans*, die aktuell verfügbaren Methoden zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen und die generelle Methodik des erweiterten genetischen Codes eingegangen werden.

1. *Candida albicans*

1.1 Humanpathogene Pilze als Verursacher von Mycosen unter besonderer Berücksichtigung von *C. albicans*

Von der Vielzahl an Pilzen, die in der Natur vorkommen, können nach Schätzungen nur etwa 100 bis 600 Spezies Krankheiten des Menschen verursachen [Calderone, RA 2002, Moran, GP *et al.* 2011]. Dies liegt unter anderem daran, dass die meisten dieser Pilze keine „professionellen Pathogene“ sind [van Burik, JA *et al.* 2001]. Humanpathogene Pilze können in zwei Klassen unterteilt werden: primäre Pathogene und opportunistische Pathogene. Primäre Pathogene sind als „professionelle Pathogene“ in der Lage, auch gesunde Individuen zu infizieren, während opportunistische Pathogene in erster Linie Erkrankungen in (lokal oder systemisch) immunsupprimierten Patienten hervorrufen [van Burik, JA *et al.* 2001]. Zu den primären Pathogenen gehören beispielsweise *Coccidioides immitis* und *Histoplasma capsulatum*, die normalerweise im Erdboden vorkommen und durch Einatmen Infektionen des Menschen hervorrufen können. Typischerweise haben die primären pathogene Pilze ein Reservoir in der Umwelt, von dem aus sie ihre Wirte infizieren. Die meisten humanpathogenen Pilze gehören jedoch zu den opportunistischen Krankheitserregern, die nur bei temporär oder chronisch geschwächtem Immunsystem oder angeboren Defekten des Immunsystems eine Infektion auslösen können. Zu den opportunistischen Pathogenen zählen beispielsweise *Candida*-Spezies, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus*. Die opportunistischen Krankheitserreger können entweder als externe Agenzien in der Umwelt vorkommen

(*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*), oder als Kommensal in gesunden Individuen (*Candida*-Spezies, *Pneumocystis*-Spezies) [d'Enfert, C 2009]. Allen gemein ist dabei die Fähigkeit, bei Temperaturen im Bereich der Körpertemperatur des Menschen zu überleben (um 37 °C und im Fieberbereich von 38 °C bis 42 °C), die Fähigkeit an Oberflächen zu adhäreren, Gewebe zu penetrieren und in verschiedenen Nischen Nährstoffe zu akquirieren. Bis auf wenige Ausnahmen können die meisten pathogene Pilze verschiedene Morphologien annehmen [van Burik, JA *et al.* 2001].

Humanpathogene Pilze können ein sehr breites Spektrum an Erkrankungen hervorrufen. Hierbei sind oberflächliche Mykosen möglich, die Haut, Haare, Finger- oder Fußnägel betreffen. Subkutane Mykosen, die auch tieferliegende Gewebsschichten betreffen (*Dermis* und *Subcutis*), bzw. sogar Knochen befallen können, sind wesentlich seltener als die oberflächlichen Mykosen. Systemische Mykosen, in denen das Pathogen sich über den Blutkreislauf auf den ganzen Körper ausbreiten und Organe befallen kann, betreffen ausschließlich Patienten mit beeinträchtigtem Immunstatus. Häufig entstehen systemische Mykosen über die Atemwegsorgane oder aus zuvor oberflächlicher Besiedelung der Haut und Schleimhäute. Die wichtigsten humanpathogenen Pilze sind in diesem Zusammenhang Pilze der Gattungen *Candida*, *Aspergillus* und *Cryptococcus* [Richardson, MD 2005].

Candida albicans gehört zu den opportunistischen Pathogenen und ist als harmloser Kommensal auf Haut und Schleimhäuten von bis zu 60 % der gesunden Bevölkerung zu finden [Odds, FC 1988]. Es werden vor allem die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes, aber auch von Mund, Rachen und Genitaltrakt besiedelt [Calderone, RA 2002]. *C. albicans* kommt im Gegensatz zu anderen Pilzen nicht außerhalb warmblütiger Tiere vor, sondern scheint hauptsächlich als Kommensal zu überleben [Odds, FC 1988, Calderone, RA 2002]. Die Übertragung auf den Menschen findet bereits während oder kurz nach der Geburt statt. Für die Hypothese der vaginalen Übertragung während der Geburt spricht, dass Kaiserschnitte seltener mit Infektionen durch *C. albicans* bei Neugeborenen assoziiert sind [Saiman, L *et al.* 2001]. Die Typisierung von Stämmen, die von Mutter und Neugeborenen einer neonatalen Intensivstation isoliert wurden, zeigten allerdings keine Übereinstimmungen, was eher auf eine Übertragung durch kontaminierte Hände des

Krankenhauspersonals hindeutet [Reef, SE *et al.* 1998]. *C. albicans* kann sowohl Mykosen der Haut und Schleimhäute, wie auch subkutane Mykosen und systemische, invasive Candidosen verursachen. Dabei sind immunsupprimierte Patienten deutlich anfälliger für Infektionen. Durch *C. albicans* verursachte subkutane Mykosen sind selten [Cabrera, H *et al.* 2002, Marcoux, D *et al.* 2009]. Deutlich häufiger, auch in gesunden Individuen, sind oberflächliche Mykosen der Haut und Schleimhäute zu finden. Auf der Haut entsteht die cutane Candidose am häufigsten an Stellen, die durch Wärme und Feuchtigkeit aufquellen (Mazeration) und eine gute Grundlage zur Vermehrung des Pilzes bieten. Betroffen sein können beispielsweise Zwischenräume der Finger oder der Zehen, sowie die Achseln. Bei Säuglingen ist *C. albicans* häufig Auslöser einer Windeldermatitis [Lopez-Martinez, R 2010]. Als Infektion der Schleimhäute ist der „Mundsoor“ eine der häufigsten klinischen Formen der oberflächlichen Candidose [Lopez-Martinez, R 2010]. Mundsoor ist assoziiert mit einer Schwächung des Immunsystems durch z. B. medikamentöse Behandlungen, Krebs, oder AIDS. Orale Candidosen sind bei AIDS-Patienten sehr häufig und können je nach Region bei 5 - 92 % der Patienten (USA) diagnostiziert werden [Patton, LL *et al.* 2002]. Auch eine lokale Schädigung des Gewebes durch Zahnprothesen kann eine orale Candidose begünstigen. Eine weitere Infektion der Schleimhäute, die vulvovaginale Candidose, ist ebenfalls sehr weit verbreitet. Etwa 75 % aller Frauen erkranken mindestens einmal im Leben daran, 40 - 50 % mindestens ein weiteres Mal [Hurley, R *et al.* 1979, Sobel, JD 2007]. Die schwerste klinische Form der Candidose ist die systemische Candidose. Dabei breitet sich der Pilz über den Blutkreislauf aus und befällt Organe wie Nieren, Herz, Lunge, Leber und Gehirn [Parker, JC, Jr. *et al.* 1976]. Die systemische Candidose ist mit einer hohen Mortalität von 46 – 75 % (USA) assoziiert [Wisplinghoff, H *et al.* 2004]. Risikofaktoren sind wirtassoziierte Faktoren (z.B. ein reduzierter Immunstatus) oder externe Faktoren (z.B. Katheter, die Behandlung mit Breitband-Antibiotika, parenterale Ernährung oder Operationen) [Richardson, MD 2005]. Als wichtiger Risikofaktor gilt darüber hinaus die vorherige Kolonialisierung des Wirtes durch *C. albicans*. Paradoxerweise trägt gerade der medizinische Fortschritt zu einem Anstieg der gefährdeten Personen bei. Die Häufigkeit der systemischen Candidosen ist daher in den zehn Jahren um die Jahrtausendwende um das Zehnfache gestiegen [Pendrak, ML *et al.* 2004]. Der überwiegende Teil der systemischen Candidosen ist nosokomial erworben, wie

Ortega *et al.* für 92 % der untersuchten systemischen Infektionen zeigen konnten [Ortega, M *et al.* 2011].

Einer medikamentösen Behandlung von Candidosen sollte die Eliminierung oder Reduzierung prädisponierender Faktoren, sofern möglich, vorausgehen. Dazu zählen eine verbesserte Krankenhaushygiene oder auch die kontrollierte Gabe von Antibiotika oder Steroiden, die eine durch *C. albicans* verursachte Erkrankung begünstigen können [Lopez-Martinez, R 2010].

Die medikamentöse Behandlung oberflächlicher Candidosen der Haut und Schleimhäute ist in der Regel unkompliziert und durch Gabe von Antimykotika der Klasse der Azole, beispielsweise Imidazole (Clotrimazol, Isoconazol, Oxiconazol) gut möglich. In schwereren Fällen können systemische Triazole (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol) verabreicht werden [Lopez-Martinez, R 2010]. Azol-Antimykotika sind etwa seit den 1970er Jahren bekannt und wurden als Ersatz für das bis dato als Standardtherapie gegen Candidosen verwendete Amphotericin B (ein Polyen) entwickelt, das starke Nebenwirkungen zeigt und nur intravenös verabreicht werden kann [Saag, MS *et al.* 1988]. Azole wirken durch Hemmung der Ergosterol-Biosynthese, einem essentiellen Bestandteil der fungalen Zellmembran. Die Bindung der Azole erfolgt an das Genprodukt von *ERG11* (oder *CYP51*), einer Cytochrom P450 (CYP) Lanosterol 14- α -Demethylase [Saag, MS *et al.* 1988]. Durch Hemmung dieses Enzyms verändert sich die Membranfluidität und es können sich toxische Zwischenprodukte der Ergosterol-Biosynthese (14- α -methylierte Sterole) anhäufen, was zu einem Wachstumsdefekt und letztendlich dem Absterben der Pilzzelle führt [Sheehan, DJ *et al.* 1999]. Durch Mutationen in der Azol-Bindetasche der Lanosterol 14- α -Demethylase und/oder Mutationen in den Efflux-Pumpen *MDR1*, *CDR1* oder *CDR2* bilden sich häufig Resistenzen gegen Azol-Antimykotika, wodurch ein Bedarf an immer neuen Wirkstoffen besteht [Lewis, RE 2011].

Für orale Candidosen wird meist Nystatin, ein Antimykotikum der Polyen-Klasse, verabreicht [Lopez-Martinez, R 2010]. Polyen-Antimykotika wirken durch direkte Bindung an Ergosterol in der fungalen Zellmembran. Durch die Ergosterol-Bindung entstehen Komplexe und schließlich Poren in der Zellmembran, die zu einem Austreten zellulärer Komponenten (vor allem K⁺-Ionen) und schließlich zum Zelltod führen [Baginski, M *et al.* 2006]. Bedingt durch die geringe Selektivität der Polyen-

Antimykotika kann bei lokaler Akkumulation, z. B. in der Niere, ebenfalls eine Bindung an Cholesterin und dadurch Zellschädigung auftreten [Lewis, RE 2011]. Nystatin ist dabei toxischer als neuere Amphotericin B Formulierungen [Ashley, ESD *et al.* 2006]. Die Toxizität der Polyen-Antimykotika limitieren ihre Einsatzmöglichkeiten beträchtlich und in der Regel werden andere antifungale Wirkstoffe, wie Triazole oder Echinocandine bevorzugt [Chandrasekar, P 2011]. Gegen Polyen-Antibiotika sind nur wenige Resistenzen bekannt [Brajtburg, J *et al.* 1990, Kontoyiannis, DP *et al.* 2002].

Für die Behandlung systemischer Candidosen werden hauptsächlich Triazol-Antimykotika oder Mykotika der Klasse der Echinocandine eingesetzt. In der *PATH Alliance* Studie wurde unter anderem die Behandlung der durch *C. albicans* ausgelösten invasiven Mycosen erfasst: zu 81 % erfolgte eine Behandlung mit Fluconazol, zu 45 % mit Echinocandin-Antimykotika oder zu 39 % mit einer Kombination aus mehr als einem Wirkstoff [Pfaller, M *et al.* 2012]. Zu den Echinocandinen zählen die Wirkstoffe Caspofungin, Micafungin und Anidulafungin. Ziel der Wirkstoffe ist die fungale Zellwand. Durch Hemmung des β -1,3-D-Glucan Synthase Komplexes (Genprodukte der *FKS1* und *FKS2* Gene) wird die Synthese des wichtigen, stabilisierenden Bestandteils β -1,3-D-Glucan verhindert, so dass die Zellwand instabil wird und *C. albicans* durch osmotische Lyse der Zellen abgetötet wird [Cappelletty, D *et al.* 2007]. Echinocandine sind nicht toxisch und zeigen eine gute Wirksamkeit, zudem werden nur selten Resistenzbildungen beobachtet [Kontoyiannis, DP *et al.* 2002]. Falls Resistenzbildungen auftreten, sind sie auf *FKS1* und *FKS2* begrenzt, so dass die Wirksamkeit der Echinocandine herabgesetzt sein kann [Perlin, DS 2007].

Insbesondere die nosokomiale, systemisch invasive Candidose ist ein wachsendes Problem in Industrieländern geworden. In der Behandlung der verschiedenen klinischen Formen der *C. albicans* Mykosen steht zwar ein vielfältiges Arsenal wirksamer antifungaler Wirkstoffe bereit. Jedoch erschweren die Prädisposition der Patienten, toxische Effekte der verfügbaren Wirkstoffe, oder die Gefahr der Resistenzbildung, insbesondere gegen Azol-Antimykotika, eine effiziente Therapie. Häufig ist zudem eine falsche, verspätete oder nicht ausreichende Therapie Ursache der hohen Mortalität, die mit der systemischen Mykose einhergeht [Pfaller, M *et al.* 2012]. Für eine verbesserte Behandlung von Mykosen besteht daher in Zukunft Bedarf an zuverlässigen diagnostischen Verfahren, insbesondere auch zur

Charakterisierung von resistenten Spezies und der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten (z.B. Antikörper, Phototherapien) sowie neuer antifungaler Wirkstoffe mit geringen Nebeneffekten. Großes Potential liegt in diesem Zusammenhang in der Grundlagenforschung zur Identifizierung von Zielstrukturen, die Pilz-spezifisch sind und somit geringe Kreuzreaktivität des Wirkstoffes mit den Wirtszellen erwarten lassen.

1.2 Molekularbiologie und phänotypische Charakteristika von *C. albicans*

Candida albicans ist ein einzelliger Hefepilz, der systematisch zum Stamm der Ascomyceten und der Ordnung Saccharomycetales gezählt wird. *C. albicans* ist ein obligat diploider Organismus und besitzt 8 Chromosomen, mit einer Gesamtgenomgröße von etwa 14 Megabasenpaaren und etwa 6500 Genen [Bruno, VM *et al.* 2010, Tuch, BB *et al.* 2010, Grumaz, C *et al.* 2013]. In dem relativ nah verwandten Hefepilz *S. cerevisiae* sind 4012 orthologe Gene zu finden [Maguire, SL *et al.* 2013]. Für *Candida albicans* konnte bislang kein sexueller Vermehrungszyklus detektiert werden, obwohl kürzlich auch haploide Formen identifiziert wurden [Hickman, MA *et al.* 2013]. Daher wird angenommen, dass ein parasexueller Zyklus durchlaufen wird, bei dem unter bestimmten Umständen eine Paarung stattfinden kann [Bennett, RJ *et al.* 2003]. *C. albicans* ist fakultativ anaerob und Kohlenstoff-heterotroph. Ein wichtiges Kennzeichen von *C. albicans* ist seine morphologische Plastizität, die Fähigkeit, reversibel Hyphen, Blastosporen, Pseudohyphen oder Chlamydosporen zu bilden (Abb. 1). Daher wird *C. albicans* zu den polymorphen Hefepilzen gezählt [Calderone, RA 2002]. Diese morphologische Plastizität scheint ein Faktor für die erfolgreiche Anpassung von *C. albicans* als Pathogen an unterschiedlichste Nischen des Wirtes zu sein. Weitere Virulenzfaktoren sind Proteine der Zellwand oder hydrolytische Enzyme und die damit assoziierte Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion von Geweben [Calderone, RA *et al.* 2001]. Da in der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Regulator der morphologischen Transition untersucht wurde, sollen die molekularen Mechanismen der Morphogenese im folgenden Abschnitt ausführlicher dargestellt werden.

Morphologische Transition

Als polymorpher Hefepilz ist *C. albicans* in der Lage, in Abhängigkeit von exogenen Stimuli verschiedene Wachstumsformen anzunehmen. Neben der einzelligen,

sphärischen Blastospore, die sich durch Sprossung vermehrt, können filamentöse Strukturen gebildet werden, die sich in echte Hyphen und Pseudohyphen unterteilen lassen (Abb. 1) [Odds, FC 1988]. Pseudohyphen entstehen durch elongiert wachsende Tochterzellen, die sich nach der Septumbildung nicht vollständig von der Mutterzelle abschnüren. Dabei ist zwischen beiden Zellen eine sichtbare Einschnürung zu finden. Die Hyphenbildung ist von apikalem Wachstum der Blastospore gekennzeichnet, wodurch sich ein Keimschlauch bildet. Während des unidirektionellen Wachstums werden in der Hyphe Septen eingezogen, welche die Zellkerne voneinander trennen. An den Septen sind keine Einschnürungen zu sehen und die Hyphen sind parallelwandig [Sudbery, P *et al.* 2004]. Hyphen und Pseudohyphen können entweder einzeln wachsen oder Myzelien bilden. Als weitere Wachstumsform werden unter bestimmten Bedingungen dickwandige, sphärische Chlamydosporen beobachtet, die möglicherweise eine Art Dauerstadium darstellen. Funktionelle Beweise für diese Hypothese sind jedoch noch nicht gefunden worden [Whiteway, M *et al.* 2007]. *C. albicans* kann darüber hinaus einen Wechsel zu einer paarungskompetenten Form durchlaufen, den sogenannten *opaque* Zellen, die sich durch leicht elongiertes, sphärisches Wachstum auszeichnen [Whiteway, M *et al.* 2007].

Für die Virulenz ist der morphologische Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenwachstum essentiell, da Mutanten, die nur zu einer morphologischen Wachstumsform befähigt sind, in Modellen für systemische Infektionen avirulent sind [Lo, HJ *et al.* 1997, Murad, AM *et al.* 2001b]. In infizierten Organen werden beide morphologischen Formen von *C. albicans* gefunden [Odds, FC 1988, Lionakis, MS *et al.* 2011], daher geht man davon aus, dass die morphologischen Formen distinkte Rollen während der Infektion übernehmen. Für Blastosporen wird eine Rolle in der Dissemination über den Blutkreislauf vorgeschlagen [Jacobsen, ID *et al.* 2012], während hyphales Wachstum mit Adhärenz und Invasion in Gewebe oder das Zerstören von Immunzellen (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten) in Zusammenhang gebracht wird [Kumamoto, CA *et al.* 2005]. Der Wechsel zwischen den unterschiedlichen morphologischen Formen kann *in vitro* durch Variation der Wachstumsbedingungen induziert werden. Es wird angenommen, dass dies die *in vivo* Bedingungen reflektiert und *C. albicans* eine schnelle Anpassung an wechselnde Bedingungen ermöglicht. Einflüsse auf die Morphogenese wurden bislang für

Temperatur, pH-Wert, CO₂, nährstoffbedingten Stress und direkte Induktoren von hyphalen Wachstum wie Serum, GlcNAc und die humanen Hormone Östrogen und Progesteron beschrieben [Brown, AJ *et al.* 1999, Ernst, JF 2000]. So wird beispielsweise bei niedrigem pH-Wert (pH < 6) und niedrigen Temperaturen (< 30 °C) das Wachstum von Blastosporen begünstigt, während bei neutralen pH-Werten (pH > 7) und erhöhten Temperaturen (> 30 °C) Hyphen induziert werden [Buffo, J *et al.* 1984, Odds, FC 1988].

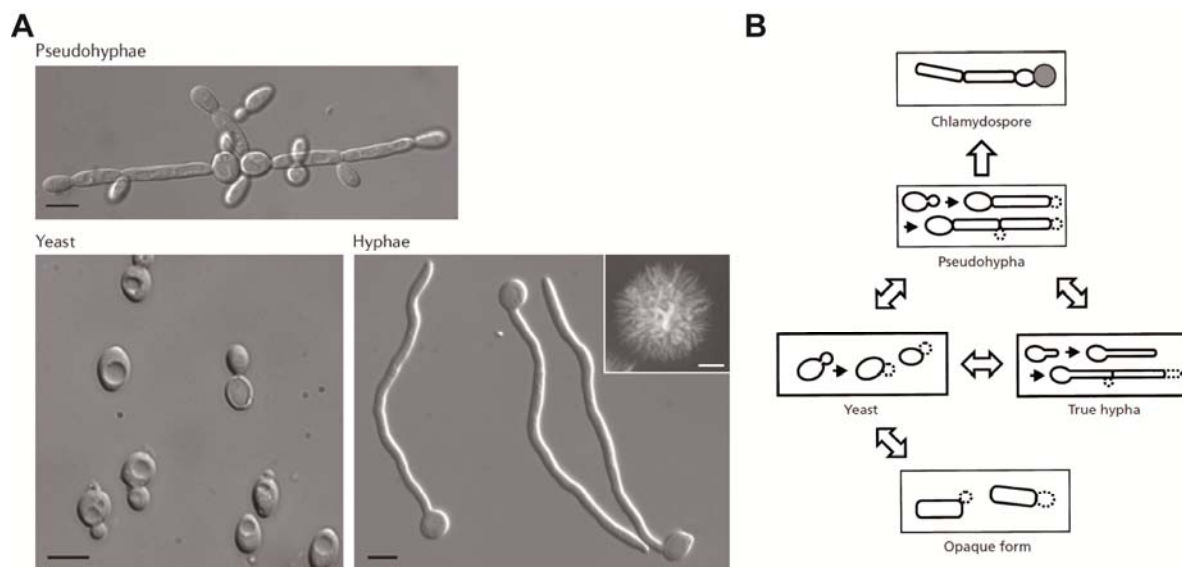


Abb. 1 Morphologische Formen von *C. albicans*. (A) Hefezellen, Hyphen und Pseudohyphen im Lichtmikroskop [Gladfelter, AS *et al.* 2008]. (B) Schematische Darstellung der morphologischen Transition von *C. albicans* [Ernst, JF 2000].

In *C. albicans* wird die Umsetzung der externen Stimuli in morphogenetische Transkriptionsprogramme über distinkte Signalwege reguliert, die Stimulus-spezifisch sind (Abb. 2) (Reviews: [Brown, AJ *et al.* 1999, Ernst, JF 2000, Liu, H 2001, Biswas, S *et al.* 2007]). Rezeptoren für diese Stimuli sind bislang nur wenige bekannt. Zwei dieser Signalwege sind bereits ausführlich charakterisiert worden. Bei einem davon handelt es sich um einen MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalweg, der in der Cph1p-vermittelten Regulation hyphaler Gene resultiert. Der zweite wichtige Signalweg für die Hypheninduktion ist ein PKA Signalweg (cAMP-abhängige Protein Kinase A). Die Aktivierung des PKA Signalweges resultiert in der Aktivierung des bHLH-Transkriptionsfaktors Efg1p, einem zentralen Regulator der Hypheninduktion, der downstream von weiteren Proteinen (Czf1p) agiert und bedingungsabhängig induzierend oder reprimierend auf hyphenspezifische Gene wirken kann [Lo, HJ *et al.* 1997, Stoldt, VR *et al.* 1997]. Ein weiterer essentieller Regulator hyphenspezifischer

Gene ist Tup1p in Kombination mit seinen genspezifischen DNA-Bindeproteinen, Rfg1p, Nrg1p und Mig1p [Braun, BR *et al.* 1997, Kadosh, D *et al.* 2001, Murad, AM *et al.* 2001a]. Die Bindung von Tup1p an die DNA-Bindeproteine resultiert in einer Repression hyphenspezifischer Gene. Über welche Signalwege Tup1p reguliert wird, ist derzeit nicht bekannt. Cph1p, Efg1p und Tup1p repräsentieren unterschiedliche Signalwege der Hyphenregulation [Braun, BR *et al.* 2000]. Weitere Genprodukte, die in der Induktion und Aufrechterhaltung der Hyphenmorphogenese involviert sind, sind die Transkriptionsfaktoren Tec1p und Ume6p [Schweizer, A *et al.* 2000, Banerjee, M *et al.* 2008].

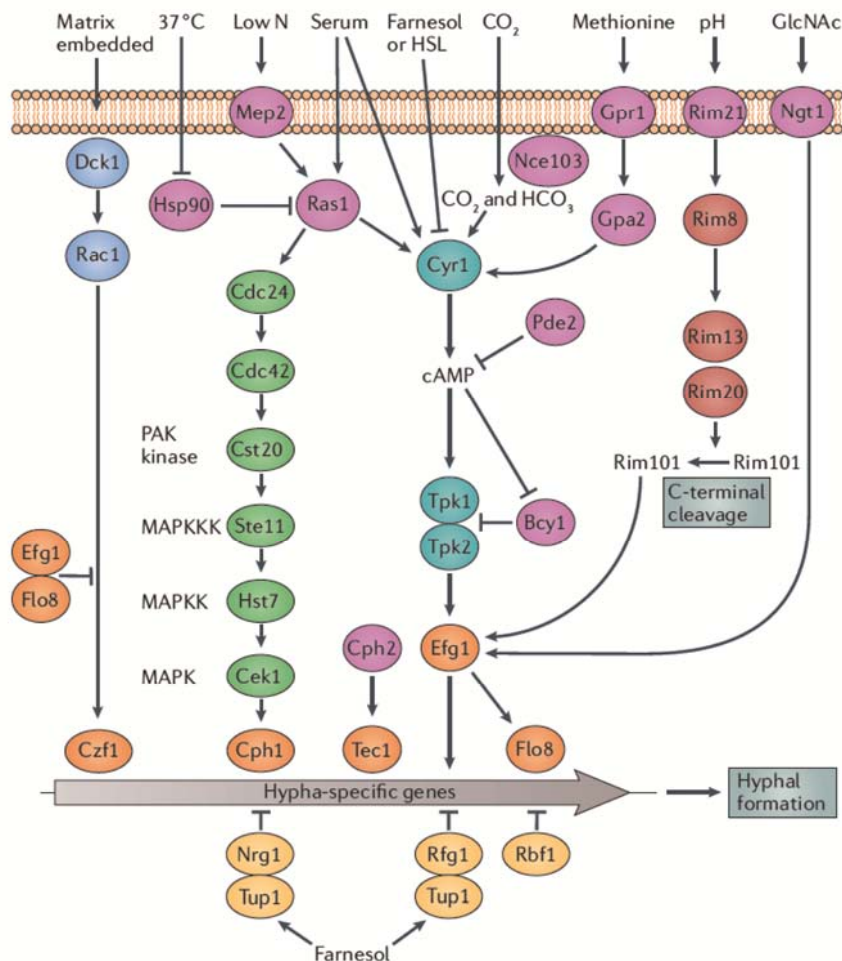


Abb. 2 Regulationsmechanismen der Hypheninduktion. Abhängig von äußeren Stimuli werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, die in der Regulation hyphenspezifischer Gene durch Transkriptionsfaktoren münden. Aktivierung ist durch Pfeilspitzen dargestellt, Repression durch T-förmige Pfeile. Legende: MAPK Signalweg (grün), PKA Signalweg (türkis), Signalweg abhängig von Matrixeinbettung (blau), Signalweg abhängig von pH-Werten (rot), weitere Faktoren der Signaltransduktion (pink), Transkriptionsfaktoren (orange), negative Regulatoren (gelb) [Sudbery, PE 2011].

Molekularbiologische Werkzeuge

Für ein Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Virulenz von *C. albicans* zugrunde liegen, ist die Möglichkeit zur zuverlässigen genetischen Manipulation der Pilze unerlässlich. Studien bezüglich Virulenzfaktoren, Resistenzbildung, Wirt-Pathogen-Interaktion etc., sind lange Zeit durch die spezifischen molekularen Eigenschaften von *C. albicans* erschwert worden (Reviews: [De Backer, MD *et al.* 2000, Magee, PT *et al.* 2003, Samaranayake, DP *et al.* 2011, Papon, N *et al.* 2012]). Im Vergleich zu *S. cerevisiae*, einem verhältnismäßig leicht gentechnisch modifizierbaren Organismus, weist *C. albicans* keine natürlich vorkommenden Plasmide auf. Es wurden Anstrengungen unternommen, autonom replizierende Plasmidsysteme für *C. albicans* herzustellen [Kurtz, MB *et al.* 1987, Cannon, RD *et al.* 1992, Pla, J *et al.* 1995]. Da diese jedoch oft instabil sind, muss für genetische Manipulationen eine chromosomale Integration der Konstrukte erfolgen [Brown, DH, Jr. *et al.* 1996]. Da *C. albicans* darüber hinaus vorwiegend diploid ist, sind für die Konstruktion homologer Mutanten zwei Deletions- oder Integrationsrunden nötig. Zudem sind die Transformationseffizienzen von *C. albicans* vergleichsweise schlecht [Brown, DH, Jr. *et al.* 1996, Thompson, A *et al.* 1998]. Meiotische Rekombination, wie in *S. cerevisiae*, ist in *C. albicans* nicht möglich, da kein sexueller Zyklus beschrieben wurde [Kurtz, MB *et al.* 1988]. Abweichend zum universellen genetischen Code zeigt *C. albicans* eine aberrante Translation des CUG Codons [Santos, MA *et al.* 1995], das statt Leucin überwiegend als Serin translatiert wird. Dies erschwert die Expression heterologer Gene (z.B. Reportergene, dominante Selektionsmarker oder Rekombinasen), da zunächst eine Anpassung an die Codon Usage von *C. albicans* erfolgen muss. Zudem kann bei der Verwendung dominanter Selektionsmarker sowohl das Gen, wie auch der Genlocus für die chromosomale Integration in *C. albicans* Effekte auf die Virulenz haben. Lange Zeit ist für genetische Manipulationen in *C. albicans* die „URA Blaster“-Methode verwendet worden, die auf der Integration von DNA in einen Uracil-auxotrophen Stammhintergrund (CAI-4, aus dem klinischen Isolat SC5314) unter Verwendung von *URA3* als Selektionsmarker basiert [Fonzi, WA *et al.* 1993]. Aufgrund eines veränderten Expressionslevels von 14 Genen im Vergleich zum Ausgangsstamm SC5314 [Brand, A *et al.* 2004] sowie veränderter Virulenz und Morphogenese durch *URA3* Expression von verschiedenen genomischen Loci [Cheng, S *et al.* 2003, Brand, A *et al.* 2004] wird die „URA Blaster“-

Methodik inzwischen weitgehend nicht mehr angewandt. Eine gute Alternative stellt die *SAT1*-Flipper Methode von Reuss *et al.* [Reuss, O *et al.* 2004] dar, die auch in dieser Arbeit angewandt wurde (s. Material und Methoden). Als dominanter Selektionsmarker wird eine *C. albicans* optimierte Streptothricin-Acetyltransferase (*caSAT1*) in Kombination mit einer Maltose-induzierbaren Rekombinase (Flippase, *FLP* unter Regulation des *MAL2* Promotors) verwendet. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur „*URA Blaster*“-Methode liegt in der Verwendung eines Wirkstoffes zur dominanten Selektion, so dass auch mit klinischen Isolaten gearbeitet werden kann, die nicht in Genen der Nährstoffaufnahme modifiziert wurden. Zudem kann die Kasette durch homologe Rekombination bis auf eine verwendete Erkennungssequenz FRT (*FLP recombination target*) wieder aus dem Genom entfernt werden.

Generell ist für *in vivo* Studien in *C. albicans* daher nach Möglichkeit die Verwendung klinischer Isolate zu bevorzugen. Ebenso sollten Selektionsmarker so ausgewählt werden, dass keine artifiziellen Effekte auf Virulenz oder Morphogenese entstehen. Darüber hinaus müssen die verwendeten Komponenten auf ihre Codon Usage überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden, um eine funktionelle Expression in *C. albicans* zu gewährleisten.

2. Methoden zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen

Zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen steht zum heutigen Zeitpunkt eine Vielzahl an diversen Methoden zu Verfügung. Diese lassen sich generell klassifizieren in biophysikalische Methoden (z.B. FRET), biochemische Methoden (z.B. Co-Immunpräzipitation, *Tandem Affinity Purification*, *Crosslinking*-Methoden, Affinitätschromatographie) und genetische Methoden (z.B. *Yeast-Two-Hybrid*, *Protein Microarray*) (Review: [Stynen, B *et al.* 2012]). Abhängig von der Fragestellung kann aus dem breiten Spektrum der Protein-Protein Interaktionstechniken die geeignetste gewählt werden. Methoden wie *Yeast-Two-Hybrid* gelten dabei als *in vivo* (oder *in vivo-like*) Methoden, da die Interaktion in der lebenden Zelle detektiert wird, während *Tandem Affinity Purification* und *Co-Immunpräzipitation* eher zu den *in vitro* Methoden gezählt werden, da eine Detektion der Interaktion erst nach der Lyse der Zellen erfolgt, wodurch auch nicht-physiologische Interaktionen stattfinden können [Piehler, J

2005]. Ein großer Nachteil der am weitesten verbreiteten Methoden *Yeast-Two-Hybrid* und mit Massenspektrometrie gekoppelter Affinitätsaufreinigung liegt in ihrer sehr hohen Rate an falsch negativen und falsch positiven Ergebnissen von geschätzt 40 - 80 % falsch negativen und 30 - 60% falsch positiven Interaktionen in Hochdurchsatzverfahren (Review: [Berggard, T *et al.* 2007]). Für die Studie von Protein-Protein Interaktionen ist daher, um sichere Aussagen treffen zu können, eine Kombination verschiedener Techniken zur Validierung unerlässlich. Speziell für die Studien von Protein-Protein Interaktionen in *C. albicans* sind bereits einige Techniken entwickelt worden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Anpassungen von bereits etablierten Techniken an die molekularen Charakteristika von *C. albicans*. So gibt es beispielsweise die *Tandem Affinity Purification* (TAP) [Kaneko, A *et al.* 2004, Blackwell, C *et al.* 2009], ein angepasstes Yeast-Two-Hybrid System [Stynen, B *et al.* 2010], sowie eine alternative Variante eines Two-Hybrid Systems, der für *C. albicans* und *S. cerevisiae* etablierten Methode *Vesicle Capture Interaction (VCI)* [Boysen, JH *et al.* 2009]. Weitere Methoden zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen, wie beispielsweise biochemische Affinitätsaufreinigungen oder Co-Immunpräzipitation, können ohne spezielle Anpassungen in *C. albicans* angewandt werden.

2.1 Die Yeast-Two-Hybrid Methode

Die *Yeast-Two-Hybrid* Methode wurde 1989 von S. Fields und O. Song zur Analyse binärer Interaktionen in *S. cerevisiae* entwickelt [Fields, S *et al.* 1989]. Dabei können nicht nur Interaktionen zwischen *S. cerevisiae* Proteinen detektiert werden, sondern auch Interaktionen heterolog exprimierter Proteine anderer Organismen. Die Methode basiert auf der Aktivierung eines Reportergens durch Co-Lokalisation zweier Proteindomänen. Ursprünglich wurde sie mit der DNA-Bindedomäne (DBD) und der Aktivator-domäne (AD) des *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktors Gal4p entwickelt. Für die Detektion von Interaktionen wird der Gal4p Transkriptionsfaktor jeweils getrennt in seine Bindedomäne und Aktivator-domäne fusioniert mit den zu analysierenden Zielproteinen exprimiert. Das Fusionsprotein der DBD wird als *bait* (Köder) und das Fusionsprotein der AD als *prey* (Beute) bezeichnet. Als Reportergen unter Regulation des *GAL1* Promotors wurde ursprünglich das *LacZ* Gen aus *E. coli* verwendet. Nur durch eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist die AD durch die an den *GAL1* Promotor gebundene DBD räumlich nah genug, um die Transkription des Reportergens zu initiieren. In der Weiterentwicklung des *Yeast-Two-Hybrid* Systems

ist inzwischen eine Vielzahl anderer *bait*- und *prey*-Domänen, regulatorischer Sequenzen und Reportergene etabliert worden. Häufig werden auch mehrere Reportergene mit unterschiedlichen Sensitivitätsgraden miteinander kombiniert (Review: [Stynen, B *et al.* 2012]). Die Vorteile der Methode liegen vor allem in ihrer Eignung auch für schwächer abundante Proteine oder für schwächere Interaktionen. Zudem ist die Methode zur Anwendung im Hochdurchsatz geeignet, wie beispielsweise eindrucksvoll durch die Kartierung eines Interaktionsnetzwerkes auf Proteomebene in *S. cerevisiae* gezeigt [Uetz, P *et al.* 2000]. Nachteile der Methode liegen darin, dass die Interaktion auf den Zellkern begrenzt ist. Das bedeutet, dass die Lokalisierung für viele Proteine artifiziell sein kann. Die artifizielle Lokalisation und weitere Faktoren bedingen die relativ hohe Rate an falsch-positiv detektierten Interaktionen, die bis zu 50 % der detektierten Interaktionen ausmachen kann [Deane, CM *et al.* 2002]. Durch die Begrenzung der Interaktion auf den Zellkern kann die Methode außerdem für eine Vielzahl an Proteinen (z.B. Zellwandproteine) ungeeignet sein, da eine nukleäre Lokalisation nicht möglich ist. Zudem ist die Sensitivität der Methode stark von den verwendeten *prey*- und *bait*-Domänen sowie dem Reportergen abhängig. Allein durch die Kombination der zu analysierenden Proteine mit entweder der *bait*- oder der *prey*-Domäne können sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden [Stellberger, T *et al.* 2010]. Weitere Nachteile sind, dass die Proteine nicht von ihren endogenen Promotoren exprimiert werden und im Fall von heterolog exprimierten Proteinen je nach Organismus die zelluläre Umgebung stark abweichen kann. Obwohl die *Yeast-Two-Hybrid* Methode gut geeignet ist, mit relativ geringem technischen Aufwand eine Vielzahl an binären Interaktionen zu screenen, sind die beschriebenen Limitationen zu beachten. Weiterhin ist es essentiell, dass detektierte Interaktionen nochmals in ihrem nativen Kontext mit komplementierenden Methoden verifiziert werden.

Da eine Anwendung des konventionellen *Yeast-Two-Hybrid* Systems aufgrund der aberranten Codon Usage in *C. albicans* nur limitiert möglich wäre, ist speziell angepasst an die Codon Usage von *C. albicans* eine Adaptation des traditionellen *Yeast-Two-Hybrid* Systems unter dem Namen *Candida-Two-Hybrid* (C2H) etabliert worden [Stynen, B *et al.* 2010]. Als DBD wird LexA, welches kein CUG Codon enthält, aus *Staphylococcus aureus* verwendet. Als AD wird das codon-optimierte VP16 Protein aus dem *Herpes simplex* Virus verwendet. Die Transkription der

Fusionsproteine wird über den durch Methionin- oder Cystein-Zugabe reprimierbaren *MET3* Promotor [Care, RS *et al.* 1999] reguliert. Als Reportergene werden *lacZ* aus *Streptococcus thermophilus* oder der Auxotrophie-Marker *HIS1* aus *C. albicans* verwendet. Die Transkriptionsregulation wird für die Reportergene mittels eines basalen *ADH1* Promotors und fünf LexAOp-Sequenzen für Bindung von LexA induziert. Die Stämme zur Durchführung der Hybridisierungsexperimente sind im Stammhintergrund von SN152 konstruiert worden, der mehrfach auxotroph ist ($\Delta arg/\Delta arg$, $\Delta leu/\Delta leu$, $\Delta his/\Delta his$) [Noble, SM *et al.* 2005]. Als *proof of principle* konnten mit dem *Candida-Two-Hybrid* System die Interaktionen zwischen Kis1p-Snf4p und Ino4p-Inop2 verifiziert werden, sowie die bis dahin unbekannte Interaktion zwischen Cek2p-Cek1p detektiert werden. Ein generelles Hindernis in der Anwendung des *Candida-Two-Hybrid* Systems ist die Notwendigkeit zur chromosomalen Integration von exogener DNA. Alle zu prüfenden Proteine müssen in aufeinanderfolgenden Transformationsschritten zusätzlich zu dem Reportergenkonstrukt in das Genom integriert werden. Aus der Konstellation an regulatorischen Sequenzen und dem Stammhintergrund in *C. albicans* ergeben sich weitere Nachteile des Systems: Es wird ein Stammhintergrund verwendet, der zwar ursprünglich aus dem klinischen Isolat SC5314 hervorging, jedoch einige genetische Veränderungen enthält. Dieser Stamm zeigt im Vergleich zu SC5314 im Mausmodell eine etwas verminderte Virulenz [Noble, SM *et al.* 2005]. Des Weiteren ist die Expression der Fusionsproteine unter *MET3* Regulation nur in Medien möglich, die kein oder wenig Methionin bzw. Cystein enthalten [Care, RS *et al.* 1999]. Damit ist die Analyse von Interaktionen, beispielsweise in regulären hypheninduzierenden Medien, nicht möglich.

Eine Variation des klassischen *Yeast-Two-Hybrid* Systems stellt die *Vesicle Capture Interaction* (VCI) Technik dar. Bei diesem System handelt es sich ebenfalls um eine *in vivo-like* Technik zur Detektion von binären Protein-Protein Interaktionen. Diese Methode ist von Boysen *et al.* parallel für *S. cerevisiae* und *C. albicans* entwickelt worden [Boysen, JH *et al.* 2009] und beruht auf der Lokalisierung des ESCRT Proteinkomplexes (*endosomal sorting complex required for transport*) an der cytoplasmatischen Seite endocytischer Vesikel. Durch die ATPase Vps4p wird der Proteinkomplex von den Vesikeln abgelöst. Eins der zu analysierenden Proteine wird mit dem Vps32 Protein fusioniert, welches Teil des ESCRT Komplexes ist. Das zweite Protein wird mit GFP fusioniert. Im $\Delta vps4/\Delta vps4$ Stammhintergrund können die

ESCRT Komplexe und mit ihnen das fusionierte Protein von Interesse ungehindert an den endocytischen Vesikeln akkumulieren. Findet eine Interaktion zwischen dem Vps32-fusionierten Protein und dem GFP-fusioniertem Protein statt, wird die Akkumulation des ESCRT Proteinkomplexes über GFP fluoreszenzmarkiert und die punktförmigen Signale können im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Mit der *Vesicle Capture Interaction* Methode konnten für *S. cerevisiae* und *C. albicans* die Interaktionen zwischen Snf1p-Snf4p und Pbs2p-Hog1p verifiziert werden. [Boysen, JH *et al.* 2009, Argimon, S *et al.* 2011]. Die Fusionsproteine wurden jeweils von ihrem endogenen Locus exprimiert im Stammhintergrund von SAL2-4F [Lee, SA *et al.* 2007], der zurückzuführen ist auf BWP17 ($\Delta ura/\Delta ura$, $\Delta arg4/\Delta arg4$, $\Delta his1/\Delta his1$), einem dreifach auxotrophen aus SC5314 generierten Stamm [Wilson, RB *et al.* 1999]. Als positiv zu bewerten ist die Expression der Fusionsproteine von ihrem nativen Locus, somit wird keine artifizielle Überexpression induziert. Darüber hinaus ist zu der Methode eine computerbasierte Auswertung entwickelt worden, wodurch Interaktionen auch quantifiziert werden können. Durch die nicht-invasive Detektion mittels Mikroskopie könnten möglicherweise auch transiente und zeitlich dynamische Interaktionen nachgewiesen werden. Ein Nachteil der Methode ist wie bei der *Candida-Two-Hybrid* Methode der stark modifizierte Ausgangsstamm, der neben zwei weiteren Auxotrophie-Markern auch *URA3*-defizient ist. Da *URA3* Expression beispielsweise auch Virulenz und Morphogenese beeinflussen kann [Lay, J *et al.* 1998, Cheng, S *et al.* 2003, Brand, A *et al.* 2004], wird das Spektrum an mit dieser Methode untersuchbaren Fragestellungen verkleinert. Zudem kann es aufgrund verwendeter Auxotrophie-Marker unter Umständen nicht möglich sein, beliebige Medien anzuwenden, beispielsweise für die Analyse von Interaktionen unter verschiedenen morphologischen Bedingungen. Schließlich ergibt sich, wie auch bei der *Yeast-Two-Hybrid* Methode, generell die Problematik der forcierten, artifiziellen Lokalisierung sowie der starke Eingriff in die Proteinstruktur durch Fusion mit großen Proteindomänen.

2.2 Affinitätsaufreinigungsmethoden

Neben den *Yeast-Two-Hybrid* Experimenten hat vor allem die Affinitätsaufreinigung von Multiproteinkomplexen unter nativen Bedingungen mit anschließender Identifizierung der Interaktionspartner per massenspektrometrischer Verfahren entscheidend zum Verständnis von Protein-Interaktionsnetzwerken z.B. in

S. cerevisiae oder anderen Organismen beigetragen. Zu den Affinitätsaufreinigungsmethoden zählen unter anderem Antikörper-basierte Methoden, wie die Co-Immunpräzipitation oder biochemische Methoden.

Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation bezeichnet eine Methode, die auf der Expression des Zielproteins als „Köderprotein“ (*bait*) zur Aufreinigung damit assoziierter Proteine aus einem Zelllysat beruht. Das *bait* Protein kann, wenn gegen dieses Protein hochaffine Antikörper verfügbar sind, ohne Peptidepitop exprimiert werden. Andernfalls wird es mit einem Epitop fusioniert und die Aufreinigung wird mit Epitop-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Zellen werden lysiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Zielprotein oder Epitop inkubiert. Über Antikörper-bindende *Beads*, die mit Protein A oder Protein G beschichtet sind, können die Komplexe aus Antikörper und gebundenen Proteinen angereichert, gewaschen und spezifisch eluiert werden. Die eluierten Proteine des Komplexes können dann durch massenspektrometrische Methoden analysiert werden. Als alleinige Methode für die Aufreinigung von binären oder multimeren Protein-Protein Komplexen ist die Co-Immunpräzipitation eher ungeeignet, da zum einen hochaffine Interaktionen bevorzugt detektiert werden und zum anderen bedingt durch die vorhergehende Zelllyse nicht-physiologische Interaktionen entstehen können. Abhängig von dem zur Aufreinigung verwendeten Antikörper ist zudem die Anreicherung und Identifizierung von unspezifischen Interaktionen möglich. Die Co-Immunpräzipitation eignet sich daher eher als Methode zur Verifizierung bereits mit anderen Methoden detektierter Interaktionen. Für *C. albicans* kann die Co-Immunpräzipitation ohne weitere Anpassungen angewandt werden.

Tandem Affinity Purification

Zur Identifikation von nativen Proteinkomplexen ist die *Tandem Affinity Purification* (TAP) eine effiziente Methode [Rigaut, G *et al.* 1999]. Im Gegensatz zur Affinitätsaufreinigung, bei der nur ein Affinitäts-Tag verwendet wird, handelt es sich bei der *Tandem Affinity Purification* um ein zweistufiges Aufreinigungsprotokoll. In der klassischen *Tandem Affinity Purification* besteht der TAP-Tag aus einem Calmodulin-Bindepeptid (CBP), einer *Tabak Etch Virus* (TEV) Protease-Erkennungssequenz und Protein A aus *Staphylococcus aureus*. Das Protein, das als „Köder“ (*bait*) für die

Aufreinigung des Multiproteinkomplexes verwendet werden soll, wird fusioniert mit dem TAP-Tag exprimiert. Eine Überexpression ist dabei in der Regel nicht notwendig. Die Zellen werden lysiert, und der erste Aufreinigungsschritt wird über eine Affinitätssäule mit IgG-gekoppelten Beads, welche Protein A spezifisch binden, durchgeführt. Anschließend wird der gebundene Proteinkomplex durch Zugabe von TEV Protease von der Säule eluiert und auf eine zweite Säule mit Calmodulin-beschichteten Beads gegeben. Nach weiteren Waschschritten kann der gebundene Proteinkomplex mit einem EGTA-Puffer unter sehr milden Bedingungen eluiert werden. Mit Hilfe der *Tandem Affinity Purification* sind bereits Protein-Interaktionsnetzwerke in *S. cerevisiae* aufgeklärt worden [Ho, Y *et al.* 2002, Gavin, AC *et al.* 2006]. Die Methode ist ebenfalls geeignet für Prokaryoten [Gully, D *et al.* 2003] und Zellen höherer Eukaryoten, hier allerdings mit deutlich geringerer Effizienz [Cox, DM *et al.* 2002, Forler, D *et al.* 2003]. Neben der Detektion von Protein-Protein Interaktionen ist auch ein Nachweis von weiteren assoziierten Molekülen möglich [Rigaut, G *et al.* 1999]. Mittlerweile ist der TAP-Tag um etliche Kombinationen aus Tags erweitert worden, mit denen Probleme des ursprünglichen TAP-Tags teilweise umgangen werden können (Review: [Li, Y 2010]). Der bedeutendste Vorteil der *Tandem Affinity Purification* liegt in der Reinheit, mit der Proteinkomplexe durch den zweifachen Tag aufgereinigt werden können. Die Ausbeute an aufgereinigten Proteinen ist ebenfalls vergleichsweise hoch (etwa 50 - 80 % [Rigaut, G *et al.* 1999]), wodurch eine Expression unter physiologischen Bedingungen möglich ist. In Kombination mit quantitativen massenspektrometrischen Methoden werden sogar Aussagen über die Stöchiometrie der aufgereinigten Protein-Protein Interaktionen möglich. Als nachteilig kann sich die Größe des ursprünglichen TAP-Tags von etwa 21 kDa auf die Proteinfunktion auswirken, wodurch Interaktionen verloren gehen können [Puig, O *et al.* 2001]. Wie bereits bei der Co-Immunpräzipitation erwähnt, wird durch die vorhergehende Zellyse eine Anreicherung nicht-physiologischer Interaktionen ermöglicht. Eine Detektion von schwachen oder transienten Interaktionen ist mit der *Tandem Affinity Purification* nicht möglich.

Im Gegensatz zu der *Candida-Two-Hybrid* Technik und der *Vesicle Capture Interaction* Methode ist die *Tandem Affinity Purification* zur nativen Aufreinigung von Multiproteinkomplexen in *C. albicans* bereits häufiger angewandt worden. Für Arbeiten in *C. albicans* wurde zum einen der klassische TAP-Tag aus Calmodulin-

Bindeprotein und Protein A angewandt [Corvey, C *et al.* 2005, Blackwell, C *et al.* 2009] oder eine Kombination aus einem 6-fach Histidin-Tag (His₆) und FLAG Tag [Kaneko, A *et al.* 2004, Kaneko, A *et al.* 2006]. Durch Anwendung der *Tandem Affinity Purification* konnten in *C. albicans* Interaktionen zwischen Proteinen des Snf1p Kinase Komplexes [Corvey, C *et al.* 2005], Interaktionen zwischen Tup1p, Tcc1p und Ssn6p [Kaneko, A *et al.* 2006], sowie Interaktionen des Septin Komplexes [Kaneko, A *et al.* 2004] detektiert werden. In den bisherigen Studien wurden die mit TAP-Tag fusionierten Proteine in *C. albicans* vom endogenen Locus exprimiert, durch Verwendung von *URA3* als Selektionsmarker jedoch immer im Stammhintergrund mit *URA3* Auxotrophie oder in mehrfach auxotrophen Stämmen. Bei Komplementation der *URA3* Auxotrophie ist auch eine Anwendung des TAP-Tags unter hypheninduzierenden Bedingungen möglich [Kaneko, A *et al.* 2004]. Wie durch die Ergebnisse gezeigt, ist die für *C. albicans* optimierte *Tandem Affinity Purification* gut geeignet, hochaffine Multiproteinkomplexe unter verschiedenen physiologischen Bedingungen nativ aufzureinigen und Interaktionspartner zu identifizieren. Eine Detektion transient oder schwach interagierender Komplexe ist jedoch nicht möglich. Bedingt durch die Möglichkeit zu nicht-physiologischen Interaktionen sollten auch hier gefundene Wechselwirkungen nochmals unabhängig verifiziert werden.

3. Der erweiterte genetische Code

3.1 Eigenschaften des genetischen Codes

Der genetische Code beschreibt das Prinzip, nach dem codierende Einheiten der *messenger* RNA (mRNA) während der Translation in Aminosäuren übersetzt werden. Die codierenden Einheiten der mRNA sind Basenfolgen aus drei Nucleotiden, die als Triplets oder Codons bezeichnet werden. Das 1961 erste entschlüsselte Codon war das Triplett UUU, das für die Aminosäure Phenylalanin codiert [Nirenberg, MW *et al.* 1961]. Nach diesem Codon dauerte es weitere 4 Jahre, bis der genetische Code vollständig entschlüsselt war [Crick, FH 1966]. Durch die Kombination aus Triplets, die aus vier möglichen verschiedenen Basen bestehen (Adenin, Guanin Cytosin, Uracil als Baustein der mRNA bzw. Thymin als Baustein der DNA) ergeben sich insgesamt $4^3 = 64$ Kombinationsmöglichkeiten. Drei dieser Codons sind Stop-Codons (*amber* UAG, *ochre* UUA, *opal* UGA): werden diese während der Translation erreicht,

wird die Translation beendet. Ebenso gibt es ein Start-Codon (AUG), an dem die Translation initiiert wird. Das Start-Codon codiert für Methionin und ist somit ebenso wie die weiteren 60 Codons aminosäurecodierend. Da jedoch nur 20 Aminosäuren (für manche Organismen auch 21) codiert werden müssen, ist der genetische Code redundant, das bedeutet, dass teilweise mehrere Codons für eine Aminosäure codieren. Für Methionin gibt es beispielsweise nur ein Codon, für Arginin gibt es sechs Codons. Diese Redundanz macht den genetischen Code weniger fehleranfällig für Punktmutationen. Die Übersetzung von Nukleinsäure zu Aminosäure erfolgt während der Translation am Ribosom mit Adaptoren, den *transfer RNAs* (tRNAs). tRNAs enthalten ein zum Codon komplementäres Anticodon, so dass durch Basenpaarung zwischen Codon und Anticodon die Spezifität, mit der eine Aminosäure an die Polypeptidkette angefügt wird, gewährleistet ist. Die tRNA wird durch spezifische Erkennungselemente (*recognition elements*) von der für die Aminosäure spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) erkannt und unter ATP-Verbrauch am 3' Ende der Sequenz mit der Aminosäure beladen [Ibba, M *et al.* 2000]. Da die aaRS spezifisch für die Aminosäuren sind, gibt es in den meisten Organismen 20 davon. tRNA Gene unterscheiden sich in ihrer Anzahl von Organismus zu Organismus, in *C. albicans* gibt es beispielsweise 42 verschiedene cytosolische tRNAs, die von insgesamt 131 Genen (tDNAs) codiert werden, in *S. cerevisiae* werden 41 cytosolische tRNAs von 275 Genen codiert [Marck, C *et al.* 2006]. Diese Diskrepanz ist zurückzuführen auf die *wobble* Position - die erste Base (5') des tRNA Anticodons, die auch unübliche Basenpaarungen mit der dritten Base des Codons eingehen kann. Somit ist nicht für jedes Codon eine eigene tRNA nötig.

Der genetische Code gilt als universell, die meisten Organismen verwenden die gleichen Codons für die jeweiligen Aminosäuren. Es gibt jedoch auch Abweichungen vom genetischen Code, beispielsweise in Mitochondrien oder auch durch cytosolische tRNAs. In diesem Zusammenhang wären vor allem *C. albicans* und andere *Candida*-Spezies zu nennen, welche das CUG Codon aberrant als Serin statt Leucin translatieren [Santos, MA *et al.* 1995]. Auch die Verwendung synonymen Codons ist zwischen Organismen verschieden, so hat jeder Organismus eine präferierte Codon Usage.

3.2 Synthetische Aminosäuren

Neben den 20 natürlich vorkommenden proteinogenen L-Aminosäuren gibt es etwa 250 weitere, natürlich vorkommende, jedoch nicht proteinogene Aminosäuren, zu denen unter anderem D-Enantiomere oder Derivate einiger L-Aminosäuren gehören und die ebenfalls wichtige Funktionen in biologischen Vorgängen übernehmen. L-Thyroxin ist beispielsweise eines der beiden Hormone für die Schilddrüsenfunktion und D-Glutaminsäure kommt als natürlicher Bestandteil der Bakterienzellwände von *Bacillus anthracis* vor [Kohler, JR *et al.* 1996]. Natürliche, nicht-proteinogene Aminosäuren können auch als Wirkstoffe in Medikamenten enthalten sein, z.B. L-DOPA (L-3,4-Hydroxyphenylalanin) als Wirkstoff in Parkinson-Medikamente (Nobelpreis 2000 für Carlsson, Kandel und Greengard). Die nicht proteinogenen Aminosäuren entstehen als Zwischenprodukte der Biosynthese, als metabolische Produkte oder durch posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren in Proteinen. Darüber hinaus gibt es eine noch größere Anzahl sogenannter synthetischer, nicht-kanonischer oder unnatürlicher Aminosäuren, die sich von den natürlich vorkommenden Aminosäuren unterscheiden und auch synthetisch hergestellte D-Enantiomere und Derivate natürlicher Aminosäuren umfassen. Das Konzept synthetischer Aminosäuren ist dabei keineswegs neu: einige dieser synthetischen Aminosäuren werden bereits seit den 1950er Jahren als potentielle Therapeutika erforscht, entweder als einzelne Aminosäuren oder als Peptidomimetika [Martel, F *et al.* 1959, Berlinguet, L *et al.* 1962a, Berlinguet, L *et al.* 1962b, Horita, A 1971, Taylor, PP *et al.* 1998]. Beispiel für eine klinische Anwendung ist L-Homophenylalanin, das zur Synthese eines Blutdruck-Medikaments verwendet wird [Kasperkiewicz, P *et al.* 2012]. Auch für die Behandlung von *C. albicans* Infektionen wurde die Anwendung eines synthetischen Aminosäurederivats (ein Derivat von Cispentacin, Wirkstoff: Icofungipen) getestet [Petratiene, R *et al.* 2005]. Neben dem Einsatz als Pharmazeutika ist ein weites Feld für die Anwendung synthetischer Aminosäuren die Protein-Biochemie. Durch die Integration synthetischer Aminosäuren in Proteine lassen sich die physiko-chemischen Eigenschaften der Proteine verändern und für Studien von Proteinstruktur, -funktion, -lokalisation, und -interaktion nutzen. Auch hier sind bereits seit den 1960er Jahren Studien mit synthetischen Aminosäuren durchgeführt worden. So sind beispielsweise *p*-Azidophenylalanin, *p*-Benzoylphenylalanin, *p*-Iodophenylalanin bereits zur Markierung von Proteinen in den 1970er und 1980er Jahren verwendet worden [Escher, E *et al.* 1974, Harding, DR

et al. 1985, Kauer, JC *et al.* 1986]. *p*-Fluorophenylalanin wurde für Studien zur Proteinsynthese verwendet [Yoshida, A 1960, Dunn, TF *et al.* 1967] und Biphenylalanin wurde für Studien zum Struktur-Aktivitäts-Verhältnis von Liganden-Rezeptorbindungen eingesetzt [Hsieh, KH *et al.* 1989].

3.3 Die synthetische Aminosäure *p*-Azidophenylalanin

Zur Studie von Protein-Protein Interaktionen soll in dieser Arbeit die synthetische Aminosäure *p*-Azidophenylalanin (AzF) verwendet werden. AzF ist ein Derivat der natürlichen Aminosäure L-Phenylalanin (Abb. 3A) und unterscheidet sich von dieser in einer photoreaktiven Azido-Gruppe in *para*-Position des Benzolringes (Abb. 3B). Durch Thermolyse oder Photolyse entsteht ein hochreaktives Nitren, das durch Insertion mit funktionellen Gruppen in räumlicher Nähe reagieren und so eine kovalente Bindung induzieren kann (Reaktionsmechanismus s. Anhang Abb. 22). AzF ist bereits 1971 zur Verwendung als „photochemische Affinitätssonde“ synthetisiert worden [Schwyzer, R *et al.* 1971] und inzwischen auch für die Anwendung mit dem erweiterten genetischen Code in *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *M. tuberculosis* und Säugierzellen etabliert worden [Chin, JW *et al.* 2002a, Chin, JW *et al.* 2003a, Deiters, A *et al.* 2003, Chen, S *et al.* 2007, Liu, W *et al.* 2007, Young, TS *et al.* 2009, Wang, F *et al.* 2010]. In Kombination mit dem erweiterten genetischen Code ergeben sich für AzF als „photochemische Affinitätssonde“ neue Anwendungsmöglichkeiten *in vivo*. So kann AzF beispielsweise zur Markierung von Proteinen in bioorthogonalen Konjugationen über Staudinger-Ligation [Saxon, E *et al.* 2000] oder Click-Chemie (Huisgen-Azid-Alkin-Cycloaddition) [Huisgen, R 1961] eingesetzt werden [Deiters, A *et al.* 2003, Deiters, A *et al.* 2004, Tsao, ML *et al.* 2005]. Andere Azid-funktionalisierte synthetische Aminosäuren sind im Zusammenhang mit *single molecule Förster resonance electron transfer* (smFRET) mit bioorthogonal konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen angewandt worden [Chatterjee, A *et al.* 2013a]. Ein weiteres Anwendungsfeld für das photoreaktive AzF ist die *in vitro* und *in vivo* Quervernetzung von Proteinen, daher wird AzF auch als Photocrosslinker-Aminosäure bezeichnet. Durch die Anwendung als Photocrosslinker können mit AzF bekannte Interaktionen verifiziert werden. Unbekannte Interaktionen werden immobilisiert und sind somit stabil für weitere Analyseschritte. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die positionsspezifische Immobilisierung an Substrate. Außerdem können an Interaktionen beteiligte Aminosäuren eines Proteins genau zugeordnet werden. In der

Studie von Grunbeck *et al.* wurde beispielsweise die Bindung des HIV Wirkstoffes Maraviroc an den Zielrezeptor CCR5 mit *p*-Azidophenylalanin und *p*-Benzoylphenylalanin auf die Aminosäure genau lokalisiert [Grunbeck, A *et al.* 2012]. Protein-Protein Interaktionsstudien mit AzF sind bislang nur mit Modellproteinen in Säugerzellen und *E. coli* durchgeführt worden [Chin, JW *et al.* 2002b, Chin, JW *et al.* 2002c, Takimoto, JK *et al.* 2009, Coin, I *et al.* 2011].

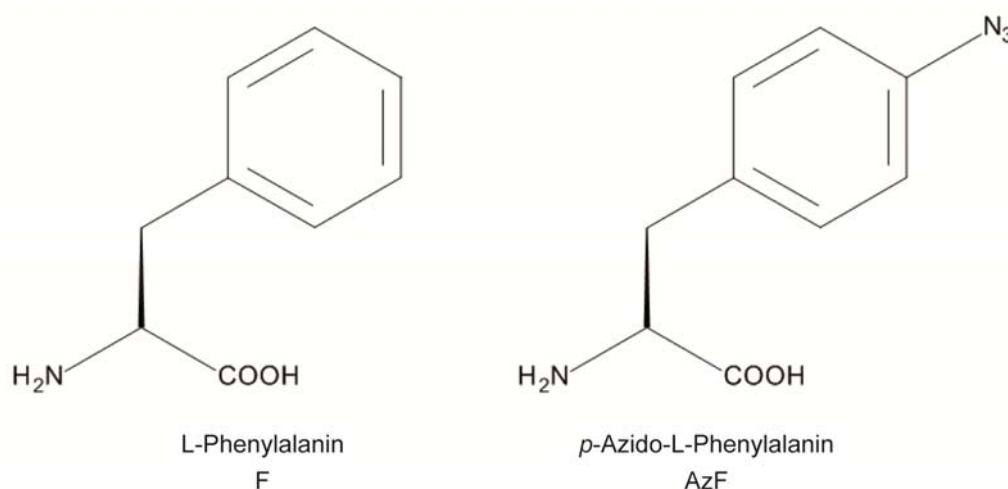


Abb. 3 Strukturformeln von Phenylalanin und *p*-Azidophenylalanin. Die natürliche Aminosäure Phenylalanin und die synthetische Aminosäure *p*-Azidophenylalanin. *p*-Azidophenylalanin unterscheidet sich von Phenylalanin nur durch die photoreaktive Azidogruppe in *para*-Position des Benzolringes.

3.4 Methoden zum Einbau synthetischer Aminosäuren in Proteine

Bedingt durch Limitationen der Proteinsynthese waren die Einsatzmöglichkeiten synthetischer Aminosäuren in der Biochemie lange Zeit sehr begrenzt. Wurden anfangs noch Festphasensynthesen mit geringen Proteinausbeuten angewandt, sind später unterschiedliche Techniken der zellfreien Proteinsynthese etabliert worden. Ein Meilenstein in dieser Entwicklung war der 2001 entwickelte erweiterte genetische Code [Wang, L *et al.* 2001], der die bis dato neueste Methode zur Integration synthetischer Aminosäuren in Proteine darstellt. Mit dieser Methode ist es inzwischen möglich, über 80 synthetische Aminosäuren mit unterschiedlichsten Funktionen sehr effizient *in vivo* in Proteine zu inkorporieren und das Spektrum an Möglichkeiten zu Proteinstudien mittels synthetischer Aminosäuren besser auszuschöpfen.

Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis, SPPS*) wurde 1963 von Merrifield etabliert [Merrifield, RB 1963]. Aufgrund der fundamentalen Bedeutung der Methode für die Biochemie wurde Merrifield 1984 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Das Prinzip der Methodik basiert auf einer schrittweisen Fusion von einzelnen Aminosäuren auf einer festen Phase aus polymeren Säulenmaterial in einem gelartigen System von C- in N-terminale Richtung. An die Gelmatrix aus Polystyren oder Polyamid wird die Aminosäure über funktionale Reste des Polymers gebunden. Die freien Aminogruppen der Aminosäuren werden jeweils durch chemische Gruppen (tert-Butoxycarbonyl-Gruppen, *Boc* oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppen *Fmoc*) vor einer unspezifischen Reaktion geschützt. Falls die Aminosäure reaktive Seitengruppen hat, müssen diese ebenfalls mit Schutzgruppen blockiert werden. Durch Zugabe einer N-terminal geschützten Aminosäure im Überschuss wird diese über ihre freie Carboxylgruppe an die freie Aminogruppe der immobilisierten Aminosäure gebunden. Durch chemische Abspaltung (Deprotektion) wird die schützende *Boc*-Gruppe N-terminal entfernt, so dass wieder eine freie Aminogruppe zur Reaktion mit der nächsten Aminosäure zur Verfügung steht [Maude, S *et al.* 2012]. Die Festphasenpeptidsynthese ist nur zur Synthese kürzerer Proteine geeignet (bis maximal etwa 200 Aminosäuren Länge und etwa 15 kDa), da mit jeder Aminosäure die Syntheseeffizienz abnimmt [Bayer, E 1991]. Weitere Nachteile sind Probleme bei der Faltung synthetisierter Proteine. Posttranslationale Modifikationen lassen sich nur durch speziell modifizierte Aminosäuren aufwändig einfügen.

Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese basiert auf der Verwendung von Präparationen zellfreier Extrakte, aus *E. coli*, Weizenkeimlingen oder Kaninchenretikulozyten (Review: [Katzen, F *et al.* 2005]). Da in den zellfreien Extrakten alle Komponenten zur Biosynthese von Proteinen enthalten sind, kann durch Zugabe einer exogenen RNA- oder DNA-Matrize eine schnelle Synthese des Zielproteins erfolgen. Ein weiterer Vorteil der zellfreien Proteinsynthese ist die Möglichkeit zur schnellen Aufreinigung und Probennahme, da kein vorheriger Aufschluss der Zellen mehr stattfinden muss. Ebenso können auch Proteine synthetisiert werden, die unter physiologischen Bedingungen toxisch für die Zelle wären. Für die Integration synthetischer

Aminosäuren müssen diese dem zellfreien Extrakt zugesetzt werden. Dies kann in Form von chemisch aminoacylierter tRNA [Thorson, JS *et al.* 1998] stattfinden. Der Nachteil der chemisch aminoacylierten tRNA liegt zum einen in der schlechten Ausbeute, die bei der Aminoacylierung erhalten wird, zudem kann die aminoacylierte tRNA in der Proteinsynthese nur einmal verwendet werden. Der Anspruch, ein regenerierbares System mit verbesserten Integrationsraten der artifiziellen Aminosäure in Proteine zu erhalten, wurde durch Kombination der synthetischen Aminosäure mit einer tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) zur *in vitro* Beladung erreicht [Kiga, D *et al.* 2002]. Da der Einbau der synthetischen Aminosäure positionsspezifisch erfolgen soll, ist es ebenso nötig, ein „freies“ Codon für die Translation zu verwenden. In diesem Zusammenhang sind Protokolle für die Codierung der synthetischen Aminosäure in der Nukleinsäure-Matrize basierend auf Quadruplet-Codons (Codons bestehend aus vier statt drei Basen) [Hohsaka, T *et al.* 2001], Nonsense-Codons (Stop-Codons) [Noren, CJ *et al.* 1989, Ellman, JA 1992] und Codons aus artifiziellen Basen [Bain, JD *et al.* 1992] entwickelt worden. Die decodierenden tRNAs müssen in ihren Anticodons entsprechend modifiziert werden.

Eine Weiterentwicklung der zellfreien Proteinsynthese ist durch die *PURE* Methodik (*protein synthesis using recombinant elements*) erreicht worden, bei der statt Rohextrakten rekombinant hergestellte Komponenten, wie Translationsfaktoren, RNA-Polymerase, tRNA-Synthetasen und aufgereinigte Ribosomen zusammen mit den weiteren für die Translation benötigten Komponenten unter definierten Bedingungen inkubiert werden, um eine kontrollierbare Proteinsynthese zu erreichen. Vorteile dieser Methode sind beispielsweise, dass im Gegensatz zu den Rohextrakten keine unerwünschten RNasen oder DNasen enthalten sind. Zudem können die Translationsbedingungen angepasst werden, um eine optimale Synthese und Faltung der Proteine zu erreichen. Für die Inkorporation von Aminosäuren über ein Stop-Codon gibt es Präparationen ohne Release Faktoren, so dass keine Konkurrenz mit der Suppressor-tRNA stattfindet und höhere Proteinmengen synthetisiert werden können [Shimizu, Y *et al.* 2005].

Dennoch sind die durch zellfreie Proteinsynthese erreichbaren Proteinmengen begrenzt und nicht ausreichend für viele Applikation, wie beispielsweise NMR oder medizinische Anwendungen [Furter, R 1998]. Die zellfreie Synthese ist außerdem nur für *in vitro* Studien zu Proteinfunktion, -struktur oder -interaktionen geeignet.

Der erweiterte genetische Code

Als Erweiterung des genetischen Codes wird die translationale *in vivo* Integration synthetischer Aminosäuren in Proteine bezeichnet. Der erweiterte genetische Code stellt die bis dato neueste Methode zur Integration synthetischer Aminosäuren in Proteine dar und beruht auf den früheren Studien zur *in vitro* Integration mittels zellfreier Proteinsynthese. Auch die Verwendung „freier“ Amber-Codons war ein wichtiger Schritt für den Erfolg der Methode [Noren, CJ *et al.* 1989, Ellman, JA 1992]. Wie bei zellfreien Systemen ist für die Erweiterung des genetischen Codes ein freies Codon zum positionsspezifischen Einbau der synthetischen Aminosäure nötig, das von dem gewählten Organismus nicht decodiert wird. Das in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendete Codon ist das Amber Stop Codon UAG. Weiterhin ist eine tRNA nötig, die das Amber Codon spezifisch decodiert und ausschließlich mit der synthetischen Aminosäure beladen wird, nicht jedoch mit einer der natürlichen Aminosäuren. Dies erfolgt durch eine tRNA-Synthetase (aaRS), welche substrat-spezifisch für eine synthetische Aminosäure ist, jedoch nicht für eine der natürlichen Aminosäuren (Abb. 4). Um diese Spezifität zwischen aaRS und tRNA zu gewährleisten, werden diese aus phylogenetisch entfernt verwandten Organismen verwendet. Für die Erweiterung des genetischen Codes von Eukaryoten werden daher in der Regel tRNA und aaRS aus Prokaryoten oder Archaeen etabliert. Da tRNA und aaRS unabhängig von endogenen tRNAs und aaRS funktionieren, werden sie als „orthogonales Pärchen“ bezeichnet. Die synthetische Aminosäure muss in das Cytoplasma transportiert werden, darf nicht metabolisiert werden und nicht toxisch für den Organismus sein.

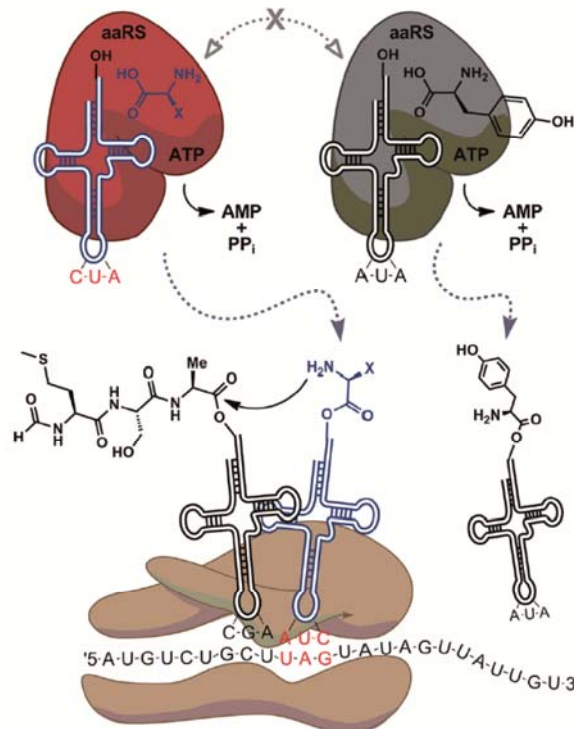


Abb. 4 Translation von Proteinen mit synthetischen Aminosäuren unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes. Die Amber-Suppressor-tRNA (mit rotem Anticodon CUA) wird durch die orthogonale aaRS (rot) mit der synthetischen Aminosäure aminoacyliert. Suppressor-tRNA und aaRS bilden ein orthogonales Pärchen, das nicht mit endogenen aaRS (dunkelgrün) oder tRNAs kreuzreagiert. Während der Translation am Ribosom (braun) wird die synthetische Aminosäure, codiert durch ein Amber Codon (UAG), in der mRNA in die wachsende Polypeptidkette integriert. [Young, TS *et al.* 2010b]

Die erste synthetische Aminosäure, die *in vivo* in Proteine von *E. coli* eingebaut wurde, war *p*-Fluorophenylalanin (*p*-F-Phe) [Furter, R 1998]. Das synthetische *p*-Fluorophenylalanin wurde positionsspezifisch in das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) integriert. Dazu wurde ein mutanter *E. coli* Stamm verwendet, für dessen Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PheRS) *p*-F-Phe kein Substrat ist. Die Integration in das Protein wurde vermittelt durch ein Paar aus Amber-Suppressor-tRNA ($tRNA^{Phe}$) und PheRS aus *S. cerevisiae*. Da neben der beschriebenen aaRS keine weiteren natürlichen aaRS mit Substratspezifität auch für Derivate ihrer korrespondierenden natürlichen Aminosäure verfügbar sind, war dieser Ansatz auf *p*-F-Phe begrenzt.

Dieses Problem wurde von der Arbeitsgruppe um Peter G. Schultz gelöst [Wang, L *et al.* 2001]. Sie verwendeten eine *Methanococcus jannaschii* Tyrosyl-tRNA-Synthetase ($TyrRS$) und die entsprechende Suppressor-tRNA ($tRNA^{Tyr}$). Durch Mutagenese der Erkennungselemente (*recognition elements*) und repetitive Selektionsrunden konnte

eine tRNA^{Tyr} identifiziert werden, welche nicht von einer *E. coli* aaRS erkannt und beladen wird. Die *MjTyrRS* wurde in fünf Resten der Substraterkennungstasche zufällig mutagenisiert und auf Erkennung der synthetischen Aminosäure selektiert. Negative Selektionsrunden wurden durchgeführt, um *MjTyrRS*-Varianten auszuschließen, welche die tRNA^{Tyr} mit natürlichen Aminosäuren beladen.

Nach dieser Methodik sind bis heute mehr als 80 synthetische Aminosäuren [Liu, CC *et al.* 2010] den genetischen Codes von *E. coli* [Liu, DR *et al.* 1999, Wang, L *et al.* 2001, Wang, L *et al.* 2002], Säugerzellen [Chen, PR *et al.* 2009, Takimoto, JK *et al.* 2009, Thibodeaux, GN *et al.* 2010, Hino, N *et al.* 2012], *S. cerevisiae* [Chin, JW *et al.* 2003a, Chin, JW *et al.* 2003b, Chen, S *et al.* 2007], *Pichia pastoris* [Young, TS *et al.* 2009] und seit 2011 auch multizellulären Organismen (*Caenorhabditis elegans*) [Greiss, S *et al.* 2011, Parrish, AR *et al.* 2012] zugefügt worden. Auch die genetischen Codes einiger pathogener Spezies (*Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*) [Wang, F *et al.* 2010, Lin, S *et al.* 2011] wurden erfolgreich erweitert. Das ursprüngliche System ist dabei stetig optimiert worden. Die Verbesserungen umfassen unter anderem weitere orthogonale Pärchen [Hancock, SM *et al.* 2010, Chatterjee, A *et al.* 2013b], optimierte tRNAs und aaRS für die effizientere Inkorporation synthetischer Aminosäuren [Guo, J *et al.* 2009, Young, TS *et al.* 2010a], tRNAs zur Decodierung von Quadruplet-Codons [Anderson, JC *et al.* 2004], Ribosomen zur verbesserten Translation von Quadruplet-Codons [Neumann, H *et al.* 2010] und aaRS mit Polysubstratspezifität [Young, DD *et al.* 2011].

Einige interessante Beispiele für biochemische oder pharmazeutische Studien, die mit synthetischen Aminosäuren unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes durchgeführt wurden, werden im Folgenden aufgeführt. Mit Hilfe von Photocrosslinker-Aminosäuren wurden in dem humanpathogenen Darmbakterium *Shigella flexneri* 69 *in vivo* Interaktionen des Virulenzfaktors shHdeA (ein Chaperon bei Säurestress) identifiziert, 54 dieser Proteine wurden zum ersten Mal als Interaktionspartner von shHdeA beschrieben [Lin, S *et al.* 2011]. Cho *et al.* zeigten 2011 in ihrer Studie, dass durch positionsspezifischen Einbau von *p*-Acetylphenylalanin an Position 35 und anschließender bioorthogonaler Konjugation mit PEG (Polyethylenglykol) eine stabilere Form des menschlichen Wachstumsfaktors (*human growth hormon*, hGH) mit verbesserten pharmakodynamischen Eigenschaften entsteht. hGH wird für die Behandlung von Kleinwuchs verwendet, die optimierte, PEG-lierte Variante befindet

sich gerade in der klinischen Testphase. Dieser Ansatz eignet sich jedoch nicht für jedes Protein, wie für *E. coli* Uricase (*urate oxidase*) gezeigt wurde, die durch Integration von *p*-Azidophenylalanin nur noch 50 % Aktivität zeigte [Chen, M *et al.* 2008]. Durch Einbau verschiedener synthetischer Aminosäuren in die Fluorophore von GFP konnten Varianten des Proteins mit veränderten Anregungseigenschaften hergestellt werden. Bei einer dieser Varianten ist die Fluoreszenz oxidationsabhängig und könnte somit als Redox-Sensor in lebenden Zellen genutzt werden [Wang, F *et al.* 2012]. Die hier aufgeführten Beispiele unterstreichen die breite Anwendbarkeit von synthetischen Aminosäuren *in vivo*. Die Methodik zur Erweiterung von genetischen Codes befindet sich seit 2001 weiterhin in der Entwicklung und wird nach wie vor auf immer weitere Organismen ausgeweitet. Mit der Synthese immer neuer synthetischer Aminosäuren sind auch in den nächsten Jahren Fortschritte für Biochemie und Pharmazie zu erwarten.

Da für die Erweiterung des genetischen Codes von *C. albicans* in der vorliegenden Arbeit die Komponenten verwendet werden sollten, die für den Einbau von AzF in *S. cerevisiae* optimiert wurden, soll im Folgenden kurz darauf eingegangen werden. Die Inkorporation von AzF in *S. cerevisiae* Proteine erfolgt mit einem mutagenisierten orthogonalen Pärchen aus *E. coli*. Die tRNA (*EcTyr*tRNA_{CUA}) enthält das Anticodon CUA für die Suppression des Amber Codons UAG und wird *in vivo* in *E. coli* durch die *E. coli* Tyrosyl-tRNA-Synthetase mit Tyrosin beladen. Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase wurde in sechs Aminosäuren des Substrataffinitätszentrums zufällig mutagenisiert. Positive und negative Selektionsrunden führten zu verschiedenen Varianten mit Spezifität für AzF unter Ausschluss von natürlichen Aminosäuren [Chin, JW *et al.* 2003a]. In *S. cerevisiae* werden *EcTyr*tRNA_{CUA} und AzF-RS von 2 μ Plasmiden exprimiert [Chen, S *et al.* 2007].

3.5 Modellproteine zur Studie von Protein-Protein Interaktionen in *C. albicans*

Die Modellproteine für die Anwendung des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* wurden unter anderem danach ausgewählt, dass sie bereits im Zusammenhang mit Protein-Protein Interaktionen, entweder aus gleichen oder heterologen Molekülen, beschrieben wurden. Für Tup1p war zudem von besonderem Interesse, dass es sich hierbei um einen zentralen Virulenzfaktor handelt.

Tsa1p

Tsa1p (*thiol specific antioxidant-like protein*) gehört zur Familie der TSA/AhPC Proteine und weist Ähnlichkeiten zu thiol-abhängigen Peroxiredoxinen (Prx) (auch als Thioredoxin Peroxidasen (Tpx) bezeichnet) auf. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Abwehr von oxidativen Stress kommen Peroxiredoxine in fast allen Organismen vor. Peroxiredoxine sind hoch abundant. In *E. coli* gehören sie beispielsweise zu den zehn abundantesten Proteinen [Link, AJ *et al.* 1997]. Ihre reduktive Funktion üben die Peroxiredoxine über ein „peroxidatives Cystein“ aus, zu dem je nach Klasse (2-Cys Prx typisch und untypisch oder 1-Cys Prx) noch ein „auflösendes Cystein“ im Protein vorkommen kann [Choi, HJ *et al.* 1998, Hofmann, B *et al.* 2002]. Hydroperoxide (ROOH) werden durch das peroxidative Cystein zu Alkohol reduziert (ROH), gleichzeitig wird der im Cystein enthaltene Schwefel zu Sulfensäure oxidiert. Durch das auflösende Cystein wird die Sulfensäure abgebaut, es entsteht eine Disulfidbindung zwischen beiden Cysteinen. Thioredoxin Proteine „regenerieren“ die Peroxiredoxine durch Reduktion wieder. Die typischen 2-Cys Prx und die 1-Cys Prx sind obligate Homodimere und können in Abhängigkeit von verschiedenen Umständen, vor allem aber dem Oxidationszustand des peroxidativen Cysteins, auch als Homodecamere vorkommen [Schroder, E *et al.* 2000, Wood, ZA *et al.* 2002] (Review: [Wood, ZA *et al.* 2003]).

Bei Tsa1p aus *C. albicans* handelt es sich ebenfalls um ein hoch abundantes Protein, das differenziell lokalisiert sowohl in Nucleus und Cytoplasma vorkommt und speziell in der hyphalen Morphologie auch in der Zellwand nachgewiesen werden konnte [Urban, C *et al.* 2003]. In *C. albicans* sind zwei genomische Loci für *TSA1* gefunden worden, *TSA1A* und *TSA1B*, die für die Sequenz des ORFs sowie unmittelbar flankierende Regionen identisch sind. Obwohl Tsa1p Homologe aus *Cryptococcus neoformans* und *Entamoeba histolytica* als Virulenzfaktoren beschrieben wurden [Missall, TA *et al.* 2004, Choi, MH *et al.* 2005], konnte für die *tsa1*-Deletionsmutante in *C. albicans* kein Einfluss auf die Virulenz beobachtet werden [Urban, C *et al.* 2005]. Peroxiredoxine können generell neben ihrer Funktion als antioxidatives Protein ein breites Spektrum an Funktionen in der Zelle übernehmen. *S. cerevisiae* Tsa1p Orthologe sind außerdem an dem Schutz vor Hitzeschock und DNA-Schädigung beteiligt [Ross, SJ *et al.* 2000, Wong, CM *et al.* 2002, Jang, HH *et al.* 2004, Tang, HM *et al.* 2009]. Für die Funktion als Chaperon in *S. cerevisiae* scheint vor allem auch die

Oligomerisierung als Pentamer aus Dimeren entscheidend zu sein. Auch für CaTsa1p konnte eine Di- und Oligomerisierung detektiert werden [Urban, C *et al.* 2005]. Neben seiner Funktion bei oxidativem Stress, dem Aufbau der Zellwand in Hyphen, sowie Stabilisierung des Genoms konnten jedoch keine Auswirkungen auf Hitzeschock-induzierten Stress gefunden werden [Urban, C *et al.* 2005]. Eine funktionelle Zuordnung der Oligomerisierung war in *C. albicans* somit bisher nicht möglich. Die Dimerisierung der Peroxiredoxine findet üblicherweise über intermolekulare Disulfidbrücken zwischen dem peroxidativen Cystein eines Moleküls und dem auflösenden Cystein des anderen Moleküls statt. In CaTsa1p befindet sich das peroxidative Cystein an Position 48, das auflösende Cystein an Position 169. Auch in *C. albicans* sind beide Cysteine an Dimerisierung und katalytischer Aktivität beteiligt [Brachhold, M 2011].

Für die Analyse von Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* war vor allem die Dimerisierungsdomäne von Tsa1p von Interesse. Zusätzlich kamen Domänen für die Oligomerisierung in Frage [de Oliveira, MA *et al.* 2007]. Da nicht abschließend geklärt ist, über welche Transportwege Tsa1p an die hyphale Zellwand gelangt, ist zudem eine Interaktion mit weiteren Proteinen denkbar [Brachhold, M 2011].

Tup1p

Tup1p (*deoxy thymidine monophosphate uptake*) ist ein zentraler Transkriptionsfaktor. Der Gename ist historisch durch das *S. cerevisiae* Ortholog bedingt und bezieht sich auf *tup1*-Deletionsmutanten in *S. cerevisiae*, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aufnahme von 2'-Deoxythymidin-5'-monophosphat (dTMP) isoliert wurden [Wickner, RB 1974]. Unter verschiedenen anderen Namen wurden weitere Mutanten in *S. cerevisiae* isoliert, die unter anderem Defekte in der Flokkulation, Katabolitrepression und Iso-2-Cytochrom C Expression zeigten. Später zeigte sich, dass es sich bei allen isolierten Mutanten um *tup1*-Mutanten handelte [Williams, FE *et al.* 1990]. Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von Tup1p bei der Regulation unterschiedlichster zellulärer Prozesse. Inzwischen ist bekannt, dass ScTup1p bis zu 3 % aller *S. cerevisiae* Gene durch Repression reguliert [DeRisi, JL *et al.* 1997]. Die transkriptionelle Repression erfolgt in einem globalen Repressorkomplex, der neben vier Tup1 Proteinen den Co-Repressor Ssn6p (Cyc8p) enthält [Varanasi, US *et al.*

1996]. Die Regulation der reprimierten Gene scheint dabei nicht durch direkte Bindung des Tup1p-Ssn6p Repressorkomplexes an DNA stattzufinden, sondern vermittelt durch spezifische DNA-Bindeproteine [Keleher, CA *et al.* 1992, Tzamarias, D *et al.* 1994, Treitel, MA *et al.* 1995]. Der Wirkmechanismus scheint dabei nun aufgeklärt: Wong und Struhl postulierten für den Tup1p-Ssn6p-Komplex eine Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen, welche unter regulären Bedingungen zu einer Repression der Zielgene führt. Die Repression wird unter anderem durch indirekte Effekte, wie die Nukleosomenanordnung oder die Inhibition des Mediator-Komplexes erreicht. Unter Stressbedingungen wird für manche Gene die Repression durch den Tup1p-Ssn6p-Repressorkomplex aufgehoben, wodurch das DNA-bindende Protein nun aktivierend wirkt und weitere Proteine rekrutieren kann, wie beispielsweise den Mediator-Komplex oder Chromatin-modifizierende Proteine [Wong, KH *et al.* 2011]. Die Maskierung der aktivierenden Domänen verschiedener DNA-bindender Proteine wird aufgrund der sehr diversen Proteinstrukturen vermutlich nicht einheitlich vermittelt, sondern über unterschiedliche Regionen des Tup1p-Ssn6p-Komplexes [Tzamarias, D *et al.* 1995]. Neben Interaktionen mit DNA-bindenden Proteinen wurden für ScTup1p außerdem Interaktionen mit Proteinen des Mediator-Komplexes, Histonen und Histon-Deacetylasen gezeigt [Edmondson, DG *et al.* 1996, Gromoller, A *et al.* 2000, Watson, AD *et al.* 2000].

Der Komplex aus Tup1p und Ssn6p muss daher in der Lage sein, eine Vielzahl an sehr unterschiedlichen Protein-Protein Interaktionen einzugehen. Dies wird vermittelt durch die Proteinstruktur von Tup1p und Ssn6p. Für ScTup1p sind drei Protein-Interaktionsdomänen bekannt: die N-terminale Domäne (Position 1 - 72), welche für die Homotetramerisierung von Tup1p sowie die Interaktion mit Ssn6p notwendig ist [Tzamarias, D *et al.* 1994, Jabet, C *et al.* 2000]. Die mittlere Domäne von ScTup1p (Position 73 - 386) interagiert mit Histonen H3 und H4 und vermittelt die repressorische Aktivität von ScTup1p [Tzamarias, D *et al.* 1994, Edmondson, DG *et al.* 1996]. Die C-terminale Domäne von ScTup1p (Position 330 - 706) interagiert mit DNA-Bindedomänen, wie beispielsweise gezeigt für *S. cerevisiae* Mat α 2p oder Mig1p [Shankar, CS *et al.* 1996, Komachi, K *et al.* 1997]. Für die N-terminale sowie die C-terminale Domäne sind separate Kristallstrukturen verfügbar [Jabet, C *et al.* 2000, Matsumura, H *et al.* 2012]. Die N-terminale Domäne von ScTup1p wurde als Homotetramer kristallisiert und zeigt eine Organisation eines Dimers aus Dimeren von

vier antiparallelen Helices [Matsumura, H *et al.* 2012]. Die C-terminale Domäne von ScTup1p enthält als Strukturmotiv WD40 Wiederholungen (*WD40 repeats*), die als siebenblättrige beta-Propellerstruktur angeordnet sind [Jabet, C *et al.* 2000]. Von *WD40 repeats* wird angenommen, dass sie eine allgemeine Oberfläche für Protein-Protein Interaktionen darstellen.

Da der Tup1p-Ssn6p-Repressorkomplex an der Regulation sehr vieler Gene beteiligt ist, überrascht es nicht, dass Homologe zu Tup1p und auch Ssn6p in verschiedenen Organismen zu finden sind. Tup1p Homologe kommen in unterschiedlichen Hefe-Spezies, aber auch höheren Eukaryoten und dem Menschen vor [Smith, RL *et al.* 2000]. Auch in *C. albicans* ist ein ScTup1p Ortholog gefunden worden, das eine Sequenzidentität von etwa 48 % aufweist [Jabet, C *et al.* 2000]. Interessanterweise ist Tup1p in *C. albicans* mit der Regulation der Hyphenmorphogenese in Verbindung gebracht worden [Braun, BR *et al.* 1997]. *tup1*-Deletionsmutanten zeigen konstitutives, filamentöses Wachstum, hauptsächlich in Form von Pseudohyphen. Bedingt durch das konstitutive Wachstum in der filamentösen Form ist der morphologische Wechsel zwischen Hefe- und Hyphenform nicht mehr möglich, somit konnte auch der Zusammenhang zur Virulenz gezeigt werden, da *tup1*-Deletionsstämme im Mausmodell avirulent sind [Braun, BR *et al.* 2001].

Homolog zu ScSsn6p gibt es auch in *C. albicans* ein Ssn6p [Hwang, CS *et al.* 2003]. Durch Transkriptionsanalysen wurde gezeigt, dass sich die Regulons von CaTup1p und CaSsn6p nur wenig überlappen. Daher ist anzunehmen, dass CaSsn6p im Vergleich zu *S. cerevisiae* nicht in dem gleichen Ausmaß für die Stabilisierung des Proteinkomplexes mit CaTup1p nötig ist. Möglicherweise ist eine Interaktion zwischen CaSsn6p und CaTup1p sogar promotorabhängig [Garcia-Sanchez, S *et al.* 2005]. Eine direkte Interaktion zwischen CaTup1p und CaSsn6p konnte durch *Tandem Affinity Purification* sowohl in der Hefe-, wie auch in der Hyphenform gezeigt werden [Kaneko, A *et al.* 2006]. In der gleichen Studie wurde ein weiteres Protein gefunden, Tcc1p (*Tup1-complex component*), welches unabhängig mit jeweils CaTup1p und CaSsn6p interagiert. Da in *S. cerevisiae* kein Tcc1p Homolog vorhanden ist, wäre eine *C. albicans*-spezifische Funktion in der Genregulation mit CaTup1p denkbar. Weitere mögliche Interaktionspartner mit CaTup1p sind DNA-Bindeproteine, wie CaNrg1p, CaMig1p und CaRfg1p, für deren *S. cerevisiae* Homologe eine Rekrutierung des Tup1p-Ssn6p Repressorkomplexes und eine Tup1p-abhängige

Repression diverser Zielgene bekannt ist [Treitel, MA *et al.* 1995, Park, SH *et al.* 1999, Mennella, TA *et al.* 2003]. Für den Tup1p-Ssn6p-Repressorkomplex aus *S. cerevisiae* ist eine Nrg1p-abhängige Repression von Promotoren Glucose-reprimierter Gene gezeigt worden, eine direkte Interaktion im *Yeast-Two-Hybrid* Experiment wurde jedoch nur für ScSsn6p gefunden [Park, SH *et al.* 1999]. In *C. albicans* gibt es eine starke Überschneidung zwischen Tup1p-vermittelter Repression und der Repression von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Nrg1p, hier insbesondere hyphenspezifischer Gene [Braun, BR *et al.* 2001, Garcia-Sanchez, S *et al.* 2005, Kadosh, D *et al.* 2005]. Auch CaRfg1p wurde in *C. albicans* als Repressor hyphenspezifischer Genen detektiert, in *S. cerevisiae* ist das homologe Protein Rox1p an der Repression von Hypoxie-assoziierten Genen beteiligt [Mennella, TA *et al.* 2003]. Analog zu ScMig1p sind für CaTup1p und CaMig1p gemeinsam regulierte Gensets hauptsächlich in der Kohlenstoffaufnahme und dem Kohlenstoffkatabolismus gefunden worden [Murad, AM *et al.* 2001a]. Eine physikalische Interaktion zwischen Tup1p und DNA-Bindeproteinen in *C. albicans* konnte bisher nicht gezeigt werden.

Die zentrale Rolle von CaTup1p in der Regulation einer Vielzahl Virulenz-assoziiierter Gene, die Daten aus *S. cerevisiae* über eine generelle Wirkungsweise als Repressorkomplex sowie diverse Wechselwirkungen mit Histonen, Histon-modifizierenden Proteinen und dem Transkriptionskomplex, machen CaTup1p zu einem Knotenpunkt eines äußerst komplexen Transkriptionsregulationsnetzwerkes. Eine detaillierte Studie der involvierten Protein-Protein Interaktionen ist daher vielversprechend.

4. Zielsetzung

Candida albicans gilt als wichtigstes fungales Pathogen des Menschen. Über komplexe Virulenzmechanismen erzielt der Pilz eine höchst dynamische Anpassung an unterschiedlichste ökologische Nischen bei der Kolonisierung und Invasion seines Wirtes, was eine universelle Behandlung von *C. albicans* verursachter Mykosen erschwert. Die Virulenzmechanismen, welche der Pathogenität von *C. albicans* zugrunde liegen, sind noch unzulänglich entschlüsselt, insbesondere im Bereich der Protein-Protein Interaktionen zentraler Virulenzregulatoren sind kaum Daten vorhanden. Ziel dieser Arbeit war daher, den genetischen Code von *C. albicans* um

die synthetische Photocrosslinker-Aminosäure *p*-Azidophenylalanin zu erweitern und durch Einbau in Proteine *in vivo* Interaktionsstudien durchführen zu können. Zu diesem Zweck sollte basierend auf dem erweiterten genetischen Code von *S. cerevisiae* das orthogonale Pärchen für *p*-Azidophenylalanin an die molekularen Charakteristika von *C. albicans* angepasst und optimiert werden. Die erfolgreiche Integration von *p*-Azidophenylalanin in Proteine sollte anhand von zwei Modellproteinen, dem differenziell lokalisierten Tsa1p und dem Virulenzfaktor Tup1p überprüft werden. Für diese Proteine sollten darüber hinaus als *proof of principle in vivo* Interaktionen in *C. albicans* detektiert und charakterisiert werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching) Carl Roth (Karlsruhe), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, jetzt Teil von Thermo Scientific), GE Healthcare (Freiburg), Life Technologies GmbH (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Th. Geyer GmbH & Co KG (Renningen), VWR International GmbH (Darmstadt). Die Bezugsquelle spezieller Chemikalien oder Verbrauchsmaterialien ist beim entsprechenden Protokoll angegeben. Für die Herstellung von Pufferlösungen und Kulturmedien wurde doppelt deionisiertes Wasser einer Millipore-Anlage verwendet.

1.2 Antibiotika / Antimykotika

Tabelle 1 Verwendete Antibiotika und Antimykotika

Substanz	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Chloramphenicol	50 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)
Nourseothricin	200 µg/ml	Werner Bioagents (Jena)

1.3 Reaktions-Kitsysteme

Tabelle 2 Verwendete Reaktions-Kitsysteme

Reaktions-Kit	Bezugsquelle
D _C Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (München)
HA-tagged Protein Purification Kit	MBL International
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
V5 tagged Protein Purification Kit	MBL International

1.4 Pufferlösungen

Die Herstellung von Puffer- und Stammlösungen erfolgte nach Standardprotokollen [Ausubel, FM *et al.* 1989, Sambrook, J *et al.* 1989a] mit doppelt deionisiertem Wasser. Spezielle Pufferlösungen sind bei den entsprechenden Protokollen angegeben.

Tabelle 3 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
PBS-T-Puffer	PBS-Puffer (pH 7,4)	
	Tween 20	0,05 %
TAE-Puffer (50-fach)	Tris	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA	50 mM
TBE-Puffer (10-fach)	Tris	890 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA	20 mM

1.5 Kulturmedien

Tabelle 4 Kulturmedien für Bakterien und Hefen

Medium	Bestandteile	Konzentration
LB-Medium (pH 7)	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
LB _{AMP}	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l

MATERIAL UND METHODEN

	Ampicillin	100 mg/l
LB _{CAP}	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Chloramphenicol	50 mg/l
YPD-Medium (pH 6,5)	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	Glukose	20 g/l
YPD Nou ²⁰⁰	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	Glukose	20 g/l
YPM-Medium	Nourseothricin	200 mg/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	Maltose	20 g/l
YPD + 10 % FCS	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	Glukose	20 g/l
SC-Medium (pH 5,9)	Fötales Kälberserum (FCS)	10 % (v/v)
	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)	1,5 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
	Aminosäure-Mix*	2 g/l
	Adenin	0,3 mM
	Histidin	0,3 mM
	Leucin	1,6 mM
	Tryptophan	0,4 mM
	Uridin	0,2 mM
	SC + AzF	Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)
(NH ₄) ₂ SO ₄		5 g/l
Aminosäure-Mix*		2 g/l
Adenin		0,3 mM
Histidin		0,3 mM
Leucin		1,6 mM
Tryptophan		0,4 mM
Uridin		0,2 mM
<i>p</i> -Azidophenylalanin		1 mM
SC ^{-TRP/URA} -Glukosemedium		Hefe-Stickstoff-Basis (YNB, Difco)
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
	Glukose	20 g/l
	Ade, Arg, Cys, Leu, Lys, Thr	jeweils 0,1 g/l

	Asp, His, Iso, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val	jeweils 0,05 g/l
MEM-Alpha Medium (α MEM)	Zellkulturmedium mit L-Glutamin, Desoxyribo-/Ribonukleotiden, ohne NaHCO ₃ (Gibco Life Technologies)	10,17 g/l
	NaHCO ₃	2,2 g/l

* jeweils 10 g Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val und 1 g PABA [Guthrie, C *et al.* 1991, Guthrie, C *et al.* 2002]

Die beschriebenen Medien wurden in zweifacher Konzentration hergestellt und entsprechend mit doppelt destilliertem Wasser oder für Agarplatten mit 4 % Agar auf die einfache Konzentration eingestellt (Endkonzentration Agar 2 % = 20 g/l).

1.6 Enzyme

Tabelle 5 Verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle / Referenz
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
<i>Taq</i> DNA Polymerase *	L. Schalwyk, ICRF (London)
Phusion High Fidelity Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen)

* Die *Taq* DNA Polymerase wurde isoliert nach Pluthero *et al.* [Pluthero, FG 1993]

1.7 Antikörper

Tabelle 6 Verwendete Antikörper

	Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
primär	Monoklonaler Maus anti-V5 Antikörper, Klon SV5-PK1 (SM 1691)	1:5.000	Acris (Herford)
	Polyklonaler Kaninchen anti-HA Antikörper (AP09230PU-N)	1:2.000	Acris (Herford)
sekundär	Polyklonaler Schaf anti-Maus IgG Antikörper HRP (NXA931)	1:5.000	GE Healthcare (Freiburg)
	Polyklonaler Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper HRP	1:5.000	GE Healthcare (Freiburg)

1.8 Plasmide

Tabelle 7 In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmid	hergestellt aus Plasmid	Referenz
pAR3-PGK1 + 3 SUP4 tRNA _{CUA}		[Chin, JW <i>et al.</i> 2003a]
pAR3 CTG opt-PGK1 + 3 SUP4 tRNA _{CUA}	pAR3-PGK1 + 3 SUP4 tRNACUA	diese Arbeit
pSFS2A		[Reuss, O <i>et al.</i> 2004]
pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT	pSFS2A	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT	diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 3 V5 ActT		diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 1 V5 ActT	pUC 57 AzF-RS 3	diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 2 V5 ActT	pUC 57 AzF-RS 3	diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 4 V5 ActT	pUC 57 AzF-RS 3	diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 5 V5 ActT	pUC 57 AzF-RS 3	diese Arbeit
pUC 57 ActPr AzF-RS 6 V5 ActT	pUC 57 AzF-RS 3	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 1 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 2 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 4 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 5 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 6 V5 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR	diese Arbeit
pSFS2A ActPr AzF-RS 1 ActT 3'FR	pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt ActT 3'FR	diese Arbeit
pUC 57 tE tRNA		diese Arbeit
pSFS2A tA FR2	pSFS2A	diese Arbeit
pSFS2A tA FR1 FR2	pSFS2A tA FR2	diese Arbeit
pSFS2A tA FR1 FR2+ PGK 3 tRNAs	pSFS2A tA FR1 FR2	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2	pSFS2A	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA	pSFS2A tE FR2	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA upFR	pSFS2A tE FR2 tRNA	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA 2 tRNAs	pSFS2A tE FR2 tRNA	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA 3 tRNAs	pSFS2A tE FR2 tRNA 2 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA 3 tRNAs upFR	pSFS2A tE FR2 tRNA 3 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA 4 tRNAs	pSFS2A tE FR2 tRNA 3 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A tE FR2 tRNA 4 tRNAs upFR	pSFS2A tE FR2 tRNA 4 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2	pSFS2A	diese Arbeit

pSFS2A snR52 FR2 1 tRNA	pSFS2A snR52 FR2	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 1 tRNA up FR	pSFS2A snR52 FR2 1 tRNA	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 2 tRNAs	pSFS2A snR52 FR2 1 tRNA	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 3 tRNAs	pSFS2A snR52 FR2 2 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 3 tRNAs upFR	pSFS2A snR52 FR2 3 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 4 tRNAs	pSFS2A snR52 FR2 3 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A snR52 FR2 4 tRNAs upFR	pSFS2A snR52 FR2 4 tRNAs	diese Arbeit
pSFS2A C-terminaler Tag V5 His6 (pSFS2A CT)	pSFS2A	diese Arbeit
pSFS2A CT GFP	pSFS2A CT	diese Arbeit
pSFS2A Eno1Pr CT GFP	pSFS2A CT GFP	diese Arbeit
pSFS2A Eno1Pr CT GFP EnoT	pSFS2A Eno1Pr CT GFP	diese Arbeit
pSFS2A Eno1Pr CT GFP N149X EnoT	pSFS2A Eno1Pr CT GFP EnoT	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 FR2	pSFS2A CT	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	pSFS2A CT Tsa FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 P49X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 G91X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 V134X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 L135X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 R1369X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 I138X	pSFS2A CT Tsa 1Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 T139X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 I140X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 N141X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 V168X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 P170X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa1 A171X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa E77X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa Y78X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tsa T104X	pSFS2A CT Tsa1 Fr1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A C-terminaler HA Tag (pSFS2A CT HA)	pSFS2A	diese Arbeit
pSFS2A CT HA Tsa1 FR1 ORF FR2	pSFS2A CT HA	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF	pSFS2A CT	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 Y61X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 D62X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit

pSFS2A CT Tup1 L63X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 E64X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 L65X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT Tup1 A66X	pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2	diese Arbeit
pSFS2A CT HA Tup1 FR1 ORF FR2	pSFS2A CT HA	diese Arbeit

1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden über die Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) bezogen. Kürzere Oligonukleotide bis etwa 40 Nukleotide Länge wurden per RP-HPLC aufgereinigt, längere Oligonukleotide ab 40 Nukleotide Länge wurden per PAGE aufgereinigt. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind in der Oligonukleotidsequenz unterstrichen.

Tabelle 8 Oligonukleotide für die Klonierung von Plasmid pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT 3'FR

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
AzRS for	ATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAA
ADH-Term rev NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> GAGCGACCTCATGCTATACCTGAG
ActPr 500 for NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCAAACTAGAGAATAATAAAGAAAA
ActPr rev RS	TTTAATCAAGTTACTGCTTGCCATTTTGAATGATTATATTTTTTAAATTAATATATCG
ActT for RS	ACCACCACCACCACCACTAAGAGTGAAATTCTGGAAATCTGG
ActT rev NotI	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CAATTTTATGATGGAATGAATGGGATG
HisTag rev	TTAGTGGTGGTGGTGGTGGT
Act 3' FR for XhoI	CCGCTCGAGGTGACCATAATCTAGCAACATC
Act 3' FR rev2 ApaI	GCTCGGGCCCTGGATTACTAACCATTGTTGGATT

Tabelle 9 Oligonukleotide für die Mutagenese der aus Plasmid pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR resultierenden AzF-RS Varianten

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
Ala183Met for	GCAAGGTTATTCTATGGCTTGTGCTA
AzRS1 rev	AACAAATTATATGAAAATTCAGTAAACTAATACC
Leu37Val for2	TGGCTCAAGGTCCAATTGCTTTAGTTTGTGGTTTTGATC
AzRS C37 rev	ATCTTTCAGCTAAAGCTTCTTCATCAGTAACTTG
Ala186Val for 2	GCTGCTTGTGTTAACAACAATATG
AzRS V4 rev 2	AGAATAACCTTGCAACAAATTATATGAAA
Val37Ile for2	TGGCTCAAGGTCCAATTGCTTTAATTTGTGGTTTTGATC
Asn126Asp for	ATTGCTGCTAATGATTATGATTGGTTC

AzRS V5 2 rev	AGCTGAATTTTCACCACAATCG
Ser182Asn / Ala183Phe for	TTGTTGCAAGGTTATAATTTTGCTTGTGTTAACAAA
AzRS V5 3 rev	ATTATATGAAAATTCAGTAAACTAATACCTTG
Leu37Thr for 2	TGGCTCAAGGTCCAATTGCTTTAACTTGTGGTTTTGATC

Tabelle 10 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A ActPr AzF-RS1 ActT 3'FR (ohne V5-Epitop)

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
ActPr 500 for SacI	TCC <u>CCGCGG</u> CGTCAAACTAGAGAATAATAAAGAAAAC
RS rev w/o V5 Tag	TTATTTCCAACAATCAAACAATAATTC

Tabelle 11 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A tE 4 tRNAs up FR

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
tE FR2 for SacI	TCC <u>CCGCGG</u> GAGATATGGGTAAATGGTTATGATCTCC
tE FR2 rev SacI	<u>CGAGCT</u> CCAAAGGTTTCCAATTCTTCTGTG
tE Prom for KpnI XhoI	GGGGT <u>ACC</u> CGCT <u>CGAG</u> TTGATGAAAAATTCGACGAAAA
tE Prom up for KpnI	GGGGT <u>ACC</u> ATCAATCAATCAGATTAAGACCAAC
tE Prom up rev XhoI	CCGCT <u>CGAG</u> AAAAGTTGAAAAATATGAGACTCAAAGA
tE Term rev Sall	ACGCGT <u>CGAC</u> AATAACATTCTGAGGGAATTGTTG

Tabelle 12 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A snR52 4 tRNAs up FR

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
snR52 FR2 for Not I	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CTACGATCAGAATTGTTGTTGACTTT
snR52 FR2 rev SacI	<u>CGAGCT</u> CATTTAGACGGTGTGGTGGTG
snR52 Pr220 for KpnI XhoI	GGGGT <u>ACC</u> CGCT <u>CGAG</u> AGTATTGCCTCATCAAAGAAACA
snR52 Pr300 rev EcTyrtrRNACUA	GGCCGCTCGGGAACCCACCAAATTAATAATAGTTTACGCAAGTCTC
tRNA N for	GGTGGGGTTCCCGAG
tE Term rev Sall	ACGCGT <u>CGAC</u> AATAACATTCTGAGGGAATTGTTG
snR52 Pr220 up for KpnI	GGGGT <u>ACC</u> CAAGAATGTTTACATCAAAGTTTCAA
snR52 Pr220 up rev XhoI	CCGCT <u>CGAG</u> CGAGTATAGTTATTGACCAATGACTT

Tabelle 13 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
C3-5	TCGAATTAATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGA GGGTTAGGGATAGGCTTACCC
C5-3	TCGAGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTC ATCATCACCATCACCATTAAT

Tabelle 14 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A Eno1Pr CT GFP EnoT und pSFS2A Eno1Pr CT GFP N149X EnoT

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
yeGFP for KpnI Stul	GGGGTACCGAAGGCCTATGTCTAAAGGTGAAGAATTATCACTG
yeGFP rev w/o TAA XhoI	CCGCTCGAGTTTGTACAATTCATCCATACCATG
Eno1 Pr for KpnI	GGGGTACCTTCACCTGATGTTGGCCAGA
Eno1 Pr rev Stul	GAAGGCCTTGTTGTAATATTCCTGAATTATCAATTG
Eno1 Ter for NotI	ATAAGAATGCGGCCGCGTTTGCCTCTGATTAATAAAAAAAAAAG
Eno1 Ter rev SacII	TCCCCGCGGGGAACGAGTTAATGCGTACTTG
yeGFP G216T for	GTTCAATGTTTTGCTAGATACCCAGATCA
yeGFP G216T rev	ACCATAACCGAAAGTAGTGACTAAGG
yeGFP N149X for	TATAACTCTCACTAGGTTTACATCATGG
yeGFP N149X rev	GTTGTATTCCAATTTGTGACCTAAAA

Tabelle 15 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT Tsa1 und den daraus resultierenden Varianten mit Amber Codon.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
Tsa FR2 for NotI	ATAAGAATGCGGCCGCCAAGCTTTGTTTTGTGTTGCTC
Tsa FR2 rev SacII	TCCCCGCGGGTCACCATAGCCGTCACCTTT
Tsa FR1 for KpnI	GGGGTACCACGTGTTGGATCTGAAGCAT
Tsa1 ORF rev w/o TAA XhoI 3	CCGCTCGAGTTTGTGACTTTGTTGAAGTATTCCTTG
Tsa P49X for	CATTGCTCTGCTAGTCAGAAATTAT
Tsa P49X rev	TGAAGGCCAATGGAATAAAGG
Tsa G91X anti	GAAGTCGACTTTGCCAATACCCTAGTCTTTTCTGGCGACATTGGT
Tsa V134X for	GATCCAAAGGGTTAGTTGAGACAAATC
Tsa V134X rev	AATCAAGAAAATACCTCTCAAGGCAAC
Tsa L135X for	CAAAGGGTGTCTAGAGACAAATCAC
Tsa L135X rev	GATCAATCAAGAAAATACCTCTCAAGG
Tsa R136X anti	GGCAAGTCATTGATGGTGATTTGCTACAAGACACCCTTTGGATCAATCA
Tsa I138X for	GTCTTGAGACAATAGACCATCAATGACT
Tsa I138X rev	ACCCTTTGGATCAATCAAGAAAATAC
Tsa T139X anti	ACCGACTGGCAAGTCATTGATCTAGATTTGTCTCAAGACACCCTT
Tsa I140X for	GACAAATCACCTAGAATGACTTGC
Tsa I140X rev	TCAAGACACCCTTTGGATCAAT
Tsa N141X for	ATCACCATCTAGGACTTGCCAGTC
Tsa N141X rev	TTGTCTCAAGACACCCTTTGGAT
Tsa V168X for	GAAAAATACGGTGAATAGTGCCAGCTAAC
Tsa V168X rev	AGTGAATTGGAAAGCCTCCAACA

Tsa P170X for	GTGAAGTTTGTAGGCTAACTGG
Tsa P170X rev	CGTATTTTTTCAGTGAATTGGA
Tsa A171X anti	GTTTCATCACCTGGGTGCCAGTTCTATGGACAAACTTCACCGTATTTTT
Tsa E77X for	CTCTACTGACTCCTAGTACACCTGGTTG
Tsa E77X rev	GCAAACAAAACCTTGAGCATCCTT
Tsa Y78X for	GACTCCGAATAGACCTGGTTGG
Tsa Y78X rev	AGTAGAGGCAAACAAAACCTTGAGCA
Tsa T104X for	CTTGGCTGACTAGAACCCTCCTT
Tsa T104X rev	ACTGGGAAGTCGACTTTGCC

Tabelle 16 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT HA

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
CT HA for	TCGAGTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTTAAT
CT HA rev	TCGAATTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAC

Tabelle 17 Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT Tup1 und den daraus resultierenden Varianten mit Amber Codon.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
Tup1 FR2 for NotI	ATAAGAATGCGGCCGCGTGTGTAGTATATATATATGTGAGAAAAAAAAACA
Tup1 FR2 rev SacII	TCCCGCGGACAGGTTGAAGCAATTTATTTAGTTAATG
Tup1 FR1 for KpnI	GGGGTACCGAGCTAGCTTAACGGACCAGCTAC
Tup1 ORF w/o TAA rev Xho I	CCGCTCGAGTTTTTGGTCCATTTCCAAATTCT
Tup1 Y61X for	GCCAAACAGTGTAGGACTTGGAGT
Tup1 Y61X rev	GGATTTGTTGCATTTCCGGC
Tup1 D62X for	CAAACAGTGTATTAGTTGGAGTTGGC
Tup1 D62X rev	GCGGATTTGTTGCATTTCCG
Tup1 L63X for	CAGTGTATGACTAGGAGTTGGCCC
Tup1 L63X rev	TTTGGCGGATTTGTTGCAT
Tup1 E64X for	GTGTATGACTTGTAGTTGGCCCATAG
Tup1 E64X rev	TGTTTGGCGGATTTGTTGC
Tup1 L65X for	TGACTTGGAGTAGGCCCATAGAA
Tup1 L65X rev/ Tup1 A66X rev	TACTACTGTTTGGCGGATTTGTT
Tup1 A66X for	TGACTTGGAGTTGTAGCATAGAAAAATC

Tabelle 18 Oligonukleotide für die Sequenzierung von hergestellten Plamiden bzw. zur Verifizierung der korrekten Integration in das *C. albicans* Genom

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz 5' – 3'
Act up for	GCAAGTCATTTGTACACCGAGA

Act down rev	TGGCATGTGAAGATCTTGGT
AR2 Start for	ATGGCTTCATCTAATTTGATTAAC
AR2 V5 rev	TTAAGTTGAATCTAAACCCAATAATGG
AR2 dist for	GTGCTGATTTGATGCAAGC
AR2 rev 1	GGAGCAACTGTTTTCTAATTTTAT
AR2 rev 2	GAATTTATATGGACTAGTTTTCTTTGG
FLP rev	GCTGTTCCGTTATGTGTAATCATC
MalPr rev	TGGTACTAGACAAAAATCAAACCAA
pSFS2A MCSI up for	GTAAAACGACGGCCAGTGAG
pSFS2A MCS II down rev	CGGATAACAATTTACACAGGA
SAT dist for	ATTTCCGGTGATCCCTGAGC
SAT dist dist for	CAAGTCTCGAACGAAACAGC
snR52 down rev	TGGAGAGCACATTTGGCATA
tE up for	CTATGTTTTCTTAGGTTTGTGTATTC
tE up up for	CCTGGGACTGTTCAAGCACT
tE down rev	ATGGTTTCTCCATTGCTTGC
tRNA N for	GGTGGGGTTCCCGAG
tRNA N rev	TGGTGGGGGAAGGATTC
Tsa1 FR1 up for	TGGCACGTAATATTTAAACACTGG
TsaORF int for	GAAATTTGCCGAAAAGGATG
Tsa1 ORF start for	ATGGCTCCAGTCGTTCAACA
Tup1 OFR Int for	CTCCCCTGACGGAAAACCTCT
Tup1 ORF Start for	ATGTCCATGTATCCCCAACG
Tup1 FR2 down rev	ACGCAAAGATTGCTGAGTTG
Tup1 FR2 int rev	GGGCAACTCGTATAACTTTGC
V5 for	GGTAAGCCTATCCCTAACCCTCT
V5 rev	CGTAGAATCGAGACCGAGGAG

1.10 *Escherichia coli* Stamm

Der *Escherichia coli* Stamm DH5 α (Genotyp: *F*-, *endA1*, *hsdR17* (*rk*-, *mk*-), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*argF-lac*)*U169*, λ -, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*) von Invitrogen (Karlsruhe) wurde für alle Klonierungs- und Mutagenesearbeiten verwendet.

1.11 *Candida albicans* Stämme

Tabelle 19 In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *Candida albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangs- stamm	Referenz
SC5314	<i>Candida albicans</i> Wildtyp (klinisches Isolat)		[Gillum, AM et al. 1984]
SPC1	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS V3 CTG opt</i>	SC5314	diese Arbeit
SPC4	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 CTG opt His6 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V5 His6</i>	SPC1	diese Arbeit
SPC7	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 CTG opt His6 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6 tE(CUC)1/te(cuc)1Δ::FRT 3 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC79	diese Arbeit
SPC8	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 Ca opt V5</i>	SC5314	diese Arbeit
SPC11	<i>tE(CUC)1/te(cuc)1Δ::FRT EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SC5314	diese Arbeit
SPC24	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 tEiteΔ::EcTyrtrRNA_{CUA}TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V5 His6</i>	SPC4	diese Arbeit
SPC25	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6 tE(CUC)1/te(cuc)1::FRT EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC75	diese Arbeit
SPC26	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6 tE(CUC)1/te(cuc)1Δ::FRT 3 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC75	diese Arbeit
SPC28	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6 SNR52/snr52Δ::3 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC75	diese Arbeit
SPC29	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC75	diese Arbeit
SPC30	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 SNR52/snr52Δ::FRT EcTyrtrRNA_{CUA} TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6</i>	SPC75	diese Arbeit
SPC43	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 1 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC3	diese Arbeit
SPC46	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC47	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 P49X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC48	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 G91X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC49	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V134X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC50	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 L135X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC51	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 R136X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC52	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 I138X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC53	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 T139X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC54	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 I140X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC55	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 N141X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

SPC56	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V168X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC57	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 P170X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC58	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 A171X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC59	wie SPC 43, außerdem <i>tsa1Δ::FRT TSA1 N141X V5 His6 /tsa1Δ::FRT TSA1 HA</i>	SPC55	diese Arbeit
SPC60	wie SPC 43, außerdem <i>tsa1Δ::FRT TSA1 A171X V5 His6 /tsa1Δ::FRT TSA1 HA</i>	SPC58	diese Arbeit
SPC61	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 E77X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC62	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 Y78X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC64	wie SPC43, außerdem <i>TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 T104X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
SPC75	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 F5X V5 His6</i>	SPC8	diese Arbeit
SPC77	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 CTG opt His6 TSA1/tsa1Δ::FRT TSA1 V5 His6 tA(AGC)3/ta(AGC)3 SUP4 3 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC4	diese Arbeit
SPC79	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 CTG opt His6 tE(CUC)1/te(cuc)1Δ::FRT EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC1	diese Arbeit
FKC1	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SPC8	diese Arbeit
FKC3	<i>SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	SC5314	diese Arbeit
FKC4	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA} ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP V5 His6</i>	FKC1	diese Arbeit
FKC10	<i>ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6</i>	SC5314	diese Arbeit
FKC12	<i>ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC10	diese Arbeit
FKC22	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 1 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC23	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 2 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC24	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 3 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC25	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 4 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC26	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 5 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC27	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 6 V5 ENO1/eno1Δ::FRT yeGFP N149X V5 His6 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC12	diese Arbeit
FKC30	<i>ACT1/act1Δ::FRT AzF-RS 1 V5 SNR52/snr52Δ::4 EcTyrtrRNA_{CUA}</i>	FKC3	diese Arbeit
YBC1	<i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 V5 His6</i>	SC5314	diese Arbeit
YBC2	<i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 HA</i>	SC5314	diese Arbeit
YBC4	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 Y61X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit

YBC5	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 D62X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
YBC6	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 L63X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
YBC7	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 E64X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
YBC8	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 L65X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
YBC9	wie SPC43, außerdem <i>TUP1/tup1Δ::FRT TUP1 A66X V5 His6</i>	SPC43	diese Arbeit
YBC18	wie SPC43, außerdem <i>tup1Δ::FRT TUP1 L63X V5 His6 /tup1Δ::FRT TUP1 HA</i>	YBC6	diese Arbeit
YBC19	wie SPC43, außerdem <i>tup1Δ::FRT TUP1 A66X V5 His6 /tup1Δ::FRT TUP1 HA</i>	YBC9	diese Arbeit

1.12 *Saccharomyces cerevisiae* Stamm

Tabelle 20 In dieser Arbeit verwendeter *Saccharomyces cerevisiae* Stamm

Stamm	Genotyp	Ausgangs- stamm	Referenz
MBS1	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 lys2-801_amber/lys2-801_amber ade2-101_ochre/ade2-101_ochre trp1-Δ63/trp1-Δ63 his3-Δ200/his3-Δ200 leu2-Δ1/leu2-Δ1 pYES2/CT-GAL4(V57X) pAR3-PGK1 3SUP4 tRNA_{CUA}</i>	YPH501	M. Berg, unveröffentlicht

2. Methoden

2.1 Kultivierung von *E. coli*

Bakterien mit plasmidcodierter Antibiotikaresistenz wurden 16 - 24 h bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) in LB Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) oder Chloramphenicol (50 µg/ml) kultiviert. Kultivierung auf Festmedien erfolgte auf entsprechenden Selektionsmedien mit 2 % Agar. Dauerkulturen wurden in 50 % Glycerin bei -80 °C gelagert.

2.2 Kultivierung von *C. albicans*

Candida albicans Stämme wurden in YPD-Medium oder SC-Medium bei 30 °C und 160 rpm kultiviert oder auf den entsprechenden Festmedien mit 2 % Agar. Dauerkulturen wurden in 30 % Glycerin bei -80 °C gelagert. Vorkulturen aus der Dauerkultur wurden in YPD-Medium oder SC-Medium angeimpft. Bei Zugabe von AzF zur Hauptkultur wurde AzF aus einer frisch hergestellten 667 mM AzF konzentrierten Lösung in 1 M NaOH dem jeweiligen Medium in einer Endkonzentration von 1 mM

zugesetzt. Filamentöses Wachstum wurde aus einer YPD Vorkultur durch Animpfen einer Hauptkultur in YPD + 10 % FCS oder α MEM auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 und Kultivierung bei 37 °C für 4 h induziert. Wachstumskurven wurden ebenfalls aus einer Vorkultur durch Animpfen des jeweiligen Mediums auf OD_{600} von 0,1 begonnen.

2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae Stämme wurden aus einer 48 h Vorkultur in $SC^{-TRP/URA}$ -Glukosemedium in frisches $SC^{-TRP/URA}$ -Glukosemedium mit oder ohne 1 mM AzF auf eine OD_{600} von 0,5 angeimpft und aufgrund des langsameren Wachstums über Nacht bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Für die weitere Verwendung zur RNA-Isolation oder RNA-Isolation unter sauren Bedingungen wurden Zellperlen hergestellt. Dauerkulturen wurden wie für *C. albicans* beschrieben angelegt.

2.4 GFP-Fluoreszenzassay

Zur Bestimmung der Translationseffizienz der unterschiedlichen AzF-RS Varianten wurde ein GFP-Fluoreszenzassay durchgeführt. Bei effizienterer translationaler Suppression würde mehr vollständig translatiertes GFP entstehen, was in einer messbaren, stärkeren Fluoreszenz der Kulturen resultieren würde. Die entsprechenden Stämme (FKC22 - FKC27) wurden aus einer Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,7 in SC-Medium mit und ohne Supplementation von 1 mM AzF angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 30 °C und 160 rpm. Anschließend wurden 10 ml der Kultur durch Zentrifugation (811 x g 5 min bei 4 °C) geerntet und in 5 ml Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 4 - 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Die optische Dichte der Kulturen wurde bei 600 nm bestimmt, jede Kultur wurde in 5 ml in Wasser auf eine OD_{600} von 2 eingestellt und nochmals kontrolliert. Jeweils 200 μ l pro Stamm wurden in Triplikaten in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten bei einer Exzitationswellenlänge von 498 nm und einer Emissionswellenlänge von 528 nm spektrometrisch vermessen (Infinite 200 Pro, Tecan). Da die Zellen in Wasser resuspendiert wurden, wurde als Blank Wasser eingesetzt und von den erhaltenen Fluoreszenzwerten abgezogen. Die Werte wurden über die OD_{600} der Zellsuspension und die Fluoreszenzwerte von Stamm SC5314 als Negativkontrolle normiert.

2.5 Methoden zur Analyse von DNA

2.5.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung extrachromosomaler Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *QIAprep Spin Mini Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die *E. coli* Stämme wurden über Nacht im entsprechenden LB-Selektionsmedium mit Antibiotika-Zusatz (LB_{AMP} oder LB_{CAP}) kultiviert. Nach maximal 16 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3.244 x g für 5 min pelletiert und der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 und 6-maliges Invertieren wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer N3 zugegeben und erneut 6-mal invertiert. Bei dem folgenden 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 16.060 x g wurden die Zellreste zusammen mit der chromosomalen DNA abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde auf die im Kit enthaltene Säule gegeben und durch Zentrifugation 1 min bei 16.060 x g wurde die Plasmid-DNA an die Säule gebunden. Anschließend wurde mit 750 µl Waschpuffer PE durch Zentrifugation 1 min bei 16.060 x g gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 min bei 16.060 x g zum Trocknen der Säule wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer EB, der zuvor auf 65 °C temperiert wurde und Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 16.060 x g für 1 min die Plasmid-DNA von der Säule eluiert. Die so isolierte DNA wurde weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Präparation genomischer DNA aus *C. albicans*

- Hefe-Lysispuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 2 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) SDS)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Carl Roth
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA)
- Glasperlen (Durchmesser 0,25 – 0,50 mm, Carl Roth)

Die Isolierung genomischer DNA aus *C. albicans* Stämmen erfolgte nach dem Protokoll von Hoffman und Winston [Hoffman, CS *et al.* 1987]. Dafür wurden 10 ml einer Übernachtskultur von *C. albicans* in 15 ml PP-Röhrchen überführt und für 5 min bei

800 x *g* pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Wasser gewaschen und erneut für 5 min bei 800 x *g* pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden das Pellet in 300 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in das zuvor ca. 300 µl Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,25 - 0,5 mm vorgelegt wurden. Es wurden 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und der Zellaufschluss erfolgte durch drei aufeinanderfolgende 5-minütige Vortex-Schritte auf höchster Stufe im Kühlraum. Zwischen den Aufschluss-Schritten wurden die Zellen jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Nach dem letzten Mal vortexen wurden die Glasperlen und Zelltrümmer bei 16.060 x *g* für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand der wässrigen Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml 100 % EtOH (-20 °C) wurden die Nukleinsäuren bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Durch Zentrifugation bei 16.060 x *g* für 10 min bei 4 °C wurden die Nukleinsäuren pelletiert, der Überstand wurde entfernt und das Nukleinsäure-Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 3 µl RNase A [10 µg/µl] und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min wurden noch enthaltene RNAs degradiert. Die Fällung der DNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 ml 100 % EtOH (-20 °C) und Inkubation bei -20 °C für mindestens 1 h. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 16.060 x *g* und 4 °C für 10 min wurde die präzipitierte DNA pelletiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml 70 % EtOH (-20 °C) durch Vortexen. Die DNA wurde erneut pelletiert (16.060 x *g*, 4 °C, 10 min) und nach Abnahme des Überstandes und Lufttrocknen des DNA-Pellets für ca. 5 min wurde die DNA je nach Pelletgröße in 50 – 200 µl molekularbiologischem Wasser aufgenommen. Ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 65 °C bewirkt ein vollständiges Lösen der DNA und eine Inaktivierung möglicherweise noch vorhandener DNasen. Im Anschluss daran kann die so präparierte DNA bei -20 °C gelagert werden.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm (A₂₆₀). Hierzu wurden entsprechende Verdünnungen in Wasser hergestellt und im Spektralphotometer V630 (Jasco) oder Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) vermessen.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *Taq*-Polymerase wurde standardmäßig verwendet, wenn die Amplifikation dem Nachweis von DNA-Fragmenten diene. Für Klonierungen, die höchste Sequenzgenauigkeit erfordern, wurde die *Phusion High Fidelity Polymerase* verwendet.

Polymerase-Kettenreaktion mit der *Taq*-Polymerase

- 10-fach ThermoPol Reaction Buffer (NEB)
- dNTPs (Fermentas, jeweils 25 mM)

PCRs wurden üblicherweise in einem Volumen von 50 µl angesetzt und enthielten bis zu 250 ng genomische DNA bzw. bis zu 5 ng Plasmid-DNA, 1-fach PCR-Puffer (ThermoPol Reaction Buffer), 0,2 mM dNTPs, 20 pmol je Oligonukleotid und 20 U *Taq*-Polymerase. Das PCR-Programm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C, es folgten 30 Zyklen von 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Hybridisierung der Oligonukleotide (Hybridisierungstemperatur abhängig von den Oligonukleotidsequenzen) und 1 min Elongation bei 72 °C mit 1 min pro kb. Ein abschließender Elongationsschritt von 5 min bei 72 °C folgte. Anschließend wurde die PCR bei 4 °C im PCR-Cycler gelagert, oder nach einem 15-minütigen Schritt bei 4 °C bei 20 °C.

Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide richtete sich nach den Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Oligonukleotide und wurde etwa 1 °C niedriger gesetzt als die niedrigste der beiden Schmelztemperaturen. Als Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase wurde 1 kb pro Minute angesetzt und die Elongationszeit wurde dementsprechend an die Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz angepasst.

Polymerase-Kettenreaktion mit der *Phusion High Fidelity Polymerase*

- dNTPs (Fermentas, jeweils 25 mM)

Die *Phusion High Fidelity Polymerase* wird aufgrund ihrer höheren Genauigkeit und Prozessivität besonders für die Amplifikation von zu klonierenden Sequenzen oder von sehr langen Sequenzen (bis zu 10 kb) eingesetzt. Üblicherweise wird die Reaktion in

einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Zu bis zu 200 ng genomischer DNA oder 1 ng Plasmid-DNA und 1-fach HF-Puffer werden dNTPs 0,2 mM, je 0,5 µM Oligonukleotide und 1 U *Phusion High Fidelity Polymerase* zugegeben. Die Amplifikationsbedingungen sind wie folgt: 30 sec initiale Denaturierung bei 98 °C, anschließend folgen 30 Zyklen Denaturierung für 7 sec bei 98 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide für 20 sec und Elongation bei 72 °C für 20 sec pro kb. Abschließend folgt ein finaler Elongationsschritt von 7 min bei 72 °C, danach wird die PCR-Reaktion entweder auf 4 °C im PCR-Cycler bis zur weiteren Verwendung gelagert oder nach 15 min bei 4 °C bei 20 °C gelagert.

Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden mit Primer3 berechnet (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Nach Angaben des Herstellers wurden bei Oligonukleotiden > 20 nt zu der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen 3 °C addiert, um die Hybridisierungstemperatur für die PCR zu erhalten. Bei Oligonukleotiden ≤ 20 nt wurde genau die niedrigere der beiden Schmelztemperaturen als Hybridisierungstemperatur eingesetzt.

Kolonie-PCR

Zur direkten Überprüfung von Transformanten ohne vorherige DNA-Isolation wurde eine PCR mit Kolonie-Material von *E. coli* oder *C. albicans* durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde eine geringe Menge Kolonie-Material mittels eines sterilen Zahnstochers in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion ist identisch, wie für die *Taq*-Polymerase oder *Phusion-Polymerase* beschrieben. Die Programme sind ebenfalls identisch durchgeführt worden, mit dem Unterschied, dass jeweils der initiale Denaturierungsschritt verlängert wurde. So wurde bei einer PCR mit der *Taq*-Polymerase bei 95 °C für 7 min denaturiert. Sollten Sequenzen über 2 kb aus Kolonie-Material amplifiziert werden, wurde die *Phusion-Polymerase* eingesetzt und die initiale Denaturierung bei 98 °C auf 3 min gegenüber dem Programm für Amplifikation genomischer DNA verlängert.

2.5.5 PCR-basierte Mutagenese

In Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Matrize standen unterschiedliche Polymerasen für die Mutagenese zur Verfügung aus denen die jeweils geeignetste ausgewählt wurde. Da die *Phusion High Fidelity Polymerase* von allen hier aufgeführten Polymerasen die höchste Synthesegenauigkeit aufweist, ist eine

Amplifizierung nach diesem Protokoll, sofern möglich, zu bevorzugen. Die verwendeten Polymerasen und daraus resultierenden Protokolle für die durchgeführten Mutagenesen sind im Folgenden aufgeführt.

Die Mutagenesen der Aminosäuren des Substrataffinitätszentrums von AzF-RS 3 zu den daraus resultierenden Varianten 1, 2, 4, 5, 6 wurden mit der *Phusion High Fidelity Polymerase* durchgeführt, als Matrize diente pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR. Die Mutagenesen von *TSA1* G91X, R136X, T139X, A171X wurden mit dem *QuikChange Multi-Site directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) durchgeführt. Die Mutagenesen von *TSA1* P49X, V134X, L135X, I138X, I140X, N141X, V168X und P170X wurden mit der *Expand Long Range Polymerase* (Roche) durchgeführt. Die Mutagenesen von *TSA1* E77X, Y78X und T104X wurden mit der *Phusion High Fidelity Polymerase* durchgeführt. Alle Mutagenesen von *TSA1* wurden mit Plasmid pSFS2A CT Tsa1 FR1 ORF FR2 als Matrize durchgeführt. Alle Mutagenesen von *TUP1* wurden ebenfalls mit der *Phusion High Fidelity Polymerase* und Plasmid pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2 durchgeführt.

Mutagenese mit dem *QuikChange Multi Site-directed Mutagenesis Kit*

- *QuikChange Multi Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene)

Da das *Multi Site-directed Mutagenesis Kit* ursprünglich für die Integration von mehreren Mutationen über einzelne Oligonukleotide in einer PCR Reaktion ausgelegt ist, wird nur ein Oligonukleotid für die Mutagenese verwendet und nach *DpnI*-Verdau der methylierten und hemimethylierten DNA wird ein einzelsträngiger DNA-Strang transformiert, der in den *E. coli* Zellen zum Doppelstrang synthetisiert wird. Die Mutagenese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, mit der Ausnahme, dass für die Transformation nicht die im Kit enthaltenen kompetenten Zellen verwendet wurden, sondern *E. coli* DH5 α kompetente Zellen.

Die Mutagenese wurde in 50 μ l Endvolumen mit 1-fach Reaktionspuffer, 0,75 μ l *QuikSolution*, 100 ng Plasmid DNA, 1 μ l dNTPs und 1 μ l Enzym-Mix, sowie 100 ng Primer durchgeführt. Das PCR-Programm lautete wie folgt: 1 min initiale Denaturierung bei 95 °C, 20 Zyklen von 1 min bei 95 °C, Hybridisierung für 1 min und 20 min Elongationszeit bei 65 °C. Abschließend wurde die Reaktion bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gehalten. 25 μ l des Mutagenese-Ansatzes wurden mit je 1 μ l

DpnI zur Restriktion der methylierten und hemimethylierten parentalen DNA versetzt. Die Restriktion wurde für 1,5 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden 20 µl des Restriktionsansatzes in 100 µl kompetente Zellen DH5α transformiert. Aus den auf Selektionsplatten kultivierten Klonen wurden Plasmidpräparationen hergestellt und durch Sequenzierung überprüft.

Mutagenese mit der *Phusion High Fidelity Polymerase*

- dNTPs (Fermentas, je 25 mM)

Die Amplifikation wurde mit zuvor phosphorylierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die einzubringende Mutation in der Mitte des *forward* Primers enthalten ist, flankiert von jeweils ca. 10 - 15 genau zur Sequenz komplementären Basen. Der reverse Primer wird genau angrenzend an das 5' Ende des *forward* Primers zwischen 20 und 30 Nukleotiden in die Gegenrichtung ausgewählt, so dass bei der Amplifikation des Plasmids ein lineares Amplifikat mit genau aneinander grenzenden Nukleotiden an den Enden entsteht. Für die Phosphorylierung wurden je 150 pmol des *forward* und *reverse* Primers in 1-fach T4-DNA-Ligase Puffer, welcher 1 mM ATP enthält, und 10 U T4-Polynukleotidkinase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die PCR wurde in 50 µl Endvolumen mit je 0,2 mM Nukleotiden, 1-fach HF-Puffer, 20 ng Plasmid-DNA, je 0,5 µM phosphorylierte Primer und 1 U *Phusion-Polymerase* durchgeführt. Das Programm wurde wie folgt gewählt: 30 sec bei 98 °C initiale Denaturierung, 30 Zyklen von 7 sec bei 98 °C Denaturierung, 20 sec Hybridisierung der Primer und Elongation bei 72 °C für 5 min entsprechend einer Amplikongröße von 10 kb. Abschließend erfolgte ein Elongationsschritt von 5 min bei 72 °C. Die Reaktion wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gehalten. Die Amplifikation wurde überprüft, indem 5 µl des PCR Ansatzes auf einem 0,8%igem Agarose-Gel aufgetrennt wurden. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde der PCR-Ansatz mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt und in 30 µl Puffer EB eluiert. Anschließend wurde die Ligation des linearisierten Vektors mit *blunt ends* in einem Volumen von 30 µl mit 26 µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 1-fach T4-DNA-Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Das Ligationsprodukt wurde direkt für

eine Restriktion mit *DpnI* eingesetzt. *DpnI* schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte parentale DNA aus *E. coli*, somit wird das als Matrize eingesetzte und nicht mutagenisierte Plasmid geschnitten, während in der PCR entstandene, unmethylierte Amplifikate intakt bleiben. Es wurden in einem Endvolumen von 20 µl 17 µl des ligierten, mutagenisierten Plasmids eingesetzt und mit 1-fach Puffer 4 (NEB) und 20 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C geschnitten. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung von *DpnI* für 20 min bei 80 °C. Die Transformation in *E. coli* (DH5α) wurde wie in Transformation beschrieben durchgeführt. Klone wurden von Selektionsplatten in Flüssigmedium angeimpft zur Herstellung von Plasmidpräparationen und die Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft.

Mutagenese mit der Roche Expand Long Polymerase

- Expand Long Template PCR System (Roche)
- dNTPs (Fermentas, je 25 mM)

Die Mutagenese wurde ebenfalls mit zuvor phosphorylierten Oligonukleotiden durchgeführt. Oligonukleotide wurden wie bereits für Mutagenese mit der *Phusion-Polymerase* beschrieben ausgewählt und phosphoryliert.

Für die PCR in 50 µl Endvolumen wurden dNTPs je 500 µM eingesetzt, je 0,5 µM phosphorylierte Oligonukleotide, 1-fach Puffer 2, 80 ng Plasmid-DNA sowie 0,75 µl der im Kit enthaltenen Enzymmischung. Die initiale Denaturierung der PCR erfolgte bei 93 °C für 2 min, es folgten 10 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 93 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide für 30 sec, Elongation bei 68 °C für 10 min. Anschließend folgten weitere 20 Zyklen mit Denaturierung bei 93 °C für 15 sec, Hybridisierung für 30 sec und Elongation bei 68 °C für 10 min und mit jedem Zyklus wurde der Elongationsschritt um 20 sec verlängert. Die finale Elongation wurde bei 68 °C für 7 min durchgeführt, anschließend wurde die Reaktion bis zur weiteren Verwendung auf 4 °C temperiert. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden 5 µl des PCR Ansatzes auf einem 0,8%igem Agarose-Gel separiert. Der PCR Ansatz wurde mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt und in 30 µl Puffer EB eluiert. Die Ligation, *DpnI* Restriktion, Transformation in kompetente *E. coli* DH5α sowie Sequenzierung erfolgte wie bereits in dem für die *Phusion High Fidelity Polymerase* beschriebenen Mutagenese-Protokoll.

2.5.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

QIAquick PCR Purification Kit

Das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) dient der Aufreinigung und Entsalzung linearer DNA-Fragmente im Bereich von 100 bp – 10 kb. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Aufreinigung wurde der entsprechende Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem 5-fachen Volumen Puffer PB versetzt, durch Vortexen gemischt und auf die Säule pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 16.060 x *g* für 1 min wurde der Durchfluss verworfen und die an die Säule gebundene DNA durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer PE durch einen weiteren Zentrifugationsschritt gewaschen. Durch erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 16.060 x *g* wurde die Säule getrocknet und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der an die Säule gebundenen DNA erfolgte, indem 30 - 50 µl Elutionspuffer EB (auf 65 °C temperiert) auf die Säule pipettiert wurde und nach einem 1-minütigen Inkubationsschritt für 1 min bei 16.060 x *g* zentrifugiert wurde. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden entweder direkt für nachfolgende Reaktionen weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

QIAquick Gel Extraction Kit

Das *QIAquick Gel Extraction Kit* wurde verwendet, wenn nach einer PCR unspezifische Nebenprodukte entfernt werden sollten, oder falls bei Restriktionen mehrere Produkte entstehen, aber nur mit einem bestimmten davon weitergearbeitet werden sollte. Üblicherweise wurden 50 µl eines PCR- oder Restriktionsansatzes mit der entsprechenden Menge 6 x Blaupuffer versetzt und in einem 0,8 % bis 1,2%igem Agarose-Gel, je nach gewünschter Auftrennung der DNA-Fragmente, elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden am UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 450 µl Puffer QG wurde das Gelstück für 10 min in einem Wasserbad oder Heizblock bei 50 °C geschmolzen. Anschließend wurde 150 µl 100 % Isopropanol zugegeben und die Mischung auf eine Säule pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 min bei 16.060 x *g* wurde die enthaltene DNA an das Säulenmaterial gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 750 µl Puffer PE durch Zentrifugation für 1 min bei 16.060 x *g*. Durch erneute Zentrifugation für 1 min bei 16.060 x *g* wurde die Säule getrocknet und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß

überführt. Nachfolgend wurden 30 – 50 µl Puffer EB (auf 65 °C temperiert) auf die Säule pipettiert und nach 1 min Inkubationszeit für 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen, aufgereinigten DNA-Fragmente wurden sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.5.7 Klonierung

Restriktion

Restriktionsansätze von Vektoren oder PCR-Produkten wurden üblicherweise in 50 µl Volumen mit bis zu 16 U Enzym über Nacht angesetzt. Am nächsten Tag wurde nochmals die halbe Menge Enzym zugegeben und für weitere 2 - 4 h inkubiert. Geschnittene Vektoren wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* wie beschrieben aufgereinigt, PCR Produkte, sofern nur ein spezifisches Produkt entstanden ist mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*. Die Elution erfolgte in beiden Fällen zur Aufkonzentrierung der Proben in 30 µl EB Puffer. Vor der Ligation von linearisiertem Vektor mit Insert wurde der Vektor dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern.

Dephosphorylierung

Die linearisierte, aufgereinigte Vektor-DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit dem entsprechenden Puffer und 1 µl Antarktischer Phosphatase (5 U) für 1 h bei 37 °C inkubiert, um freie Phosphate von den 5' Enden der einzelsträngigen DNA-Überhänge aus der Restriktion zu entfernen und damit eine Religation des Vektors während der Ligation zu verhindern. Nach der Inkubationszeit von 1 h wurde erneut 1 µl (5 U) Enzym zugegeben und weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 10 min bei 65 °C inaktiviert und über ein *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 30 µl Puffer EB eluiert.

Ligation

Jeweils 2 µl der aufgereinigten, linearisierten und dephosphorylierten Vektor-DNA und der aufgereinigten, geschnittenen Insert-DNA wurden auf einem 0,8%igem Agarose Gel aufgetrennt, um die Ligationismengen abzuschätzen. Abhängig von den Größen und Intensitäten der DNA-Banden wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von

etwa 1:10 zusammengegeben, dabei wurde darauf geachtet, dass mindestens 4 µl der Vektor-DNA eingesetzt wurden. Als Kontrolle für die Religation des Vektors wurde das gleiche Volumen Vektor-DNA ohne Insert-DNA ligiert. Es wurden 2 µl des T4-DNA-Ligase Puffers zugegeben und 1 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligationsreaktion wurde 1 h bei RT inkubiert und anschließend direkt für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* eingesetzt.

2.5.8 Klonierung spezieller Plasmide

pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT 3'FR

Die Mutagenese der ursprünglich in der AzF-RS enthaltenen 29 CUG Codons zu UUG Codons wurde mit dem *QuikChange Multi Site Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene durchgeführt [Palzer, S 2008]. Als Matrize diente Plasmid pAR3-pGK1 + 3 SUP4 tRNA_{CUA} [Chen, S *et al.* 2007] und als Resultat der Codon-Optimierung der AzF-RS wurde Plasmid pAR3 CTG opt-PGK1 + 3 SUP4 tRNA_{CUA} erhalten. Alle verwendeten Oligonukleotide für die im Folgenden beschriebene Klonierung sind in Tabelle 8 aufgeführt. In Plasmid pAR3 CTG opt-PGK1 + 3 SUP4 tRNA_{CUA} wurde der ursprüngliche *ScADH1* Promotor ausgetauscht. Dazu wurde der ORF der codon-optimierten AzF-RS 3 mit der *ScADH1* downstream Sequenz mit den Primern AzRS for und ADH1 Term rev NotI ausgehend von Plasmid pAR3 CTG opt-PGK1 + 3 SUP4 tRNA_{CUA} als Matrize amplifiziert. Die 500 bp lange upstream Sequenz von *ACT1* wurde mit den Primern ActPr 500 for NotI und ActPr rev RS aus genomischer DNA von Stamm SC5314 amplifiziert. Die aus beiden Amplifikationen resultierenden PCR-Produkte wurden in einer Fusions-PCR mit den Oligonukleotiden ActPr 500 for NotI und ADH1 Term rev NotI fusioniert. Das entstandene Produkt aus CUG-optimierter AzF-RS3 mit *CaACT1* Promotor und *ScADH1* downstream Sequenz wurde mittels NotI Schnittstellen in Vektor pSFS2A kloniert, so dass Plasmid pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG opt His₆ ADHT erhalten wurde. Die 424 bp lange *ACT1* downstream Sequenz wurde aus genomischer DNA von SC5314 mit den Primern ActT for RS und ActT rev NotI amplifiziert. Die codon-optimierte AzF-RS 3 wurde mit dem *ACT1* Promotor aus Plasmid pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG opt His₆ ADHT mit den Oligonukleotiden ActPr 500 for und HisTag rev amplifiziert. Die Fusion mit der *ACT1* downstream Sequenz wurde in einer Fusions-PCR mit beiden Amplifikaten als Matrize und den Primern ActPr 500 NotI und ActT rev NotI erreicht und das erhaltene Produkt wurde in Vektor pSFS2A kloniert, so dass Plasmid pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG

opt His₆ ActT generiert wurde. Um eine homologe Rekombination mit genomischer DNA in *C. albicans* zu gewährleisten, wurde eine weitere *ACT1* downstream Sequenz von 700 bp in den Vektor kloniert. Diese Sequenz grenzt unmittelbar an die als Transkriptionsterminator verwendete Sequenz ActT an und wurde mit den Primern Act 3' FR for XhoI und Act 3' FR rev2 ApaI amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und ApaI geschnitten und in Vektor pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG opt His₆ ActT ligiert, so dass Plasmid pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG opt His₆ ActT 3' FR generiert wurde.

pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3' FR und daraus resultierende Varianten

Die AzF-RS 3 wurde *in silico* vollständig für die Codon Usage von *C. albicans* optimiert und von GeneScript (USA) synthetisiert. Dabei wurde der ORF mit einem V5-Tag und *ACT1* flankierenden Regionen fusioniert, bestehend aus 479 bp unmittelbar upstream und 389 bp unmittelbar downstream des *ACT1* ORFs. Zusätzlich wurden Restriktionsschnittstellen für SacII am 5' Ende des Konstruktes und für NotI am 3' Ende des Konstruktes integriert. Über diese Schnittstellen wurde die 2.208 bp lange Sequenz aus Vektor pUC57 ActPr AzF-RS 3 V5 ActT ausgeschnitten und anstelle der CUG-optimierten Sequenz in Vektor pSFS2A ActPr500 AzF-RS 3 CTG opt His₆ ActT 3' FR integriert, so dass Plasmid pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3' FR erhalten wurde.

Ausgehend von Plasmid pUC57 ActPr AzF-RS 3 V5 ActT wurden die Aminosäuren des aktiven Zentrums entsprechend Tabelle 24 durch PCR-basierte Mutagenese mit den Primern aus Tabelle 9 mutagenisiert, um die weiteren Varianten der AzF-RS in Plasmiden pUC57 AzF-RS 1 – 6 zu erhalten. Die AzF-RS Varianten 1 bis 6 wurden wie beschrieben kloniert, so dass Plasmide pSFS2A ActPr AzF-RS V5 ActT 3' FR Varianten 1 – 6 generiert wurden.

pSFS2A ActPr AzF-RS 1 ActT 3'FR

Um das mit der AzF-RS fusionierte V5-Epitop zu entfernen und eine mögliche Überlagerung von Crosslink-Signalen der ebenfalls V5-getagten Modellproteine im Western Blot zu vermeiden, wurde ein 1.779 bp langes Produkt aus *ACT1* Promotor und AzF-RS 1 mit einem Stop Codon anstelle des V5-Epitops mit den Oligonukleotiden ActPr 500 Sac II und RS rev w/o V5 Tag amplifiziert (Tabelle 10). Als

Matrize diente Plasmid pUC57 ActPr AzF-RS 1 V5 ActT. In einer zweiten PCR wurde ein 389 bp Fragment der *ACT1* downstream flankierenden Region mit Primern ActT for RS und ActT rev NotI (Tabelle 10) aus genomischer DNA amplifiziert. Die Produkte beider PCRs wurden in einer Fusions-PCR mit den Primern ActPr 500 for SacII und ActT rev NotI (Tabelle 10) fusioniert. Das entstandene 2.176 bp lange PCR-Produkt wurde gelaufgereinigt, mit *NotI* und *SacII* geschnitten und ersetzte die V5-getagte AzF-RS3 in dem ebenso geschnittenen Vektor pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3' FR, so dass Vektor pSFS2A ActPr AzF-RS 1 ActT 3'FR erhalten wurde.

pSFS2A tE FR2 tRNA upFR und pSFS2A tE FR2 4tRNAs upFR

Für die Transkription der *EcTyrRNA_{CUA}* unter regulatorischen Sequenzen des Glutaminsäure tRNA Gens *tE(CUC)1* wurde die Sequenz der *EcTyrRNA_{CUA}* mit 400 bp upstream von *tE(CUC)1* und 101 bp downstream von *tE(CUC)1* fusioniert synthetisiert (GeneScript, USA). An das 5' Ende der Sequenz wurde eine *Apal* Schnittstelle integriert und an das 3' Ende wurde eine *XhoI* Schnittstelle integriert. Für die homologe Rekombination mit genomischer DNA wurde eine downstream flankierende Region von 627 bp mit den Primern tE FR2 for *SacII* und tE FR2 rev *SacI* (Tabelle 11) amplifiziert, mit *SacII* und *SacI* geschnitten und in den Vektor pSFS2A kloniert, so dass Plasmid pSFS2A tE FR2 erhalten wurde. Das 602 bp lange DNA-Fragment der *EcTyrRNA_{CUA}* mit *tE(CUC)1* regulatorischen Sequenzen wurde durch Restriktion mit *Apal* und *XhoI* aus Vektor pUC57 tE tRNA geschnitten und in Vektor pSFS2A tE FR2 kloniert, so dass Vektor pSFS2A tE FR2 tRNA upFR generiert wurde. Für die Integration der *EcTyrRNA_{CUA}* mit *tE(CUC)1* regulatorischen Sequenzen in mehreren Kopien wurde die *EcTyrRNA_{CUA}* mit 250 bp upstream Sequenz und 101 bp downstream Sequenz mit den Primern tE Prom for *KpnI* *XhoI* und tE Term rev *SalI* (Tabelle 11) aus Plasmid pSFS2A tE FR2 tRNA upFR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit *KpnI* und *SalI* in den *KpnI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pSFS2A tE FR2 kloniert. Durch die Integration des Inserts wurde eine *XhoI* Schnittstelle reintegriert, so dass in aufeinanderfolgenden Klonierungsschritten bis zu vier Kopien der *EcTyrRNA_{CUA}* mit *tE(CUC)1* regulatorischen Sequenzen integriert werden konnten. Um eine längere 5' flankierende Sequenz für die homologe Rekombination mit genomischer DNA zu erhalten, wurde ein 350 bp Fragment unmittelbar 5' von der upstream flankierenden Region des *tE(CUC)1* Gens mit den Oligonukleotiden tE Prom up for *KpnI* und tE

Prom up rev XhoI (Tabelle 11) aus genomischer DNA amplifiziert und nach Restriktion mit *KpnI* und *XhoI* in Plasmid pSFS2A tE FR2 tRNA, pSFS2A tE FR2 3 tRNAs bzw. pSFS2A tE FR2 4 tRNAs kloniert, um die finalen Plasmide pSFS2A tE FR2 tRNA upFR, pSFS2A tE FR2 3 tRNAs upFR bzw. pSFS2A tE FR2 4 tRNAs upFR zu generieren.

pSFS2A snR52 4 tRNAs up FR

Für die Transkription der heterologen *EcTyrtrRNA_{CUA}* in *C. albicans* wurde die 426 bp lange *SNR52* downstream Region aus genomischer DNA mit den Primern snR52 FR2 for NotI und snR52 FR2 rev SacI (Tabelle 12) amplifiziert und über die *NotI* und *SacI* Schnittstellen in Vektor pSFS2A kloniert. Ein 258 bp Fragment mit integrierten *KpnI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen und einem 3' Überhang mit der *EcTyrtrRNA_{CUA}* Sequenz wurde aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden snR52 Pr 220 for *KpnI* *XhoI* und snR52 Pr 300 rev *EcTyrtrRNA_{CUA}* (Tabelle 12) amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde mit Primern tRNA N for und tE Term rev Sall (Tabelle 12) aus Plasmid pSFS2A tE FR2 tRNA up FR als Matrize ein 193 bp Fragment aus *EcTyrtrRNA_{CUA}* und tE downstream flankierender Region amplifiziert. In einer Fusions-PCR wurden beide DNA-Fragmente durch Amplifikation mit den Primern snR52 Pr 220 for *KpnI* *XhoI* und tE Term rev Sall fusioniert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und Sall geschnitten, während der Vektor pSFS2A snR52 FR2 mit *KpnI* und *XhoI* geschnitten wurde. Durch Ligation des PCR-Produktes in den Vektor wird eine neue *XhoI* Schnittstelle über das Insert eingefügt. Die Insertion der *EcTyrtrRNA_{CUA}* Sequenz mit regulatorischen *SNR52* upstream und *tE(CUC)1* downstream Sequenzen konnte in weiteren Klonierungen wiederholt werden, so dass bis zu vier Kopien der *EcTyrtrRNA_{CUA}* mit den regulatorischen Sequenzen hintereinander kloniert werden konnten. Um eine längere Sequenz für die homologe Rekombination mit genomischer DNA in *C. albicans* zu erhalten, wurde ein 217 bp langes DNA-Fragment unmittelbar 5' von der regulatorische upstream *SNR52* Sequenz verwendet, das mit Primern snR52 Pr 220 up FR for *KpnI* und snR52 up FR rev *XhoI* (Tabelle 12) amplifiziert wurde. Durch Restriktion mit *KpnI* und *XhoI* wurde das Insert in Vektor pSFS2A snR52 FR2 4 tRNAs kloniert, so dass der finale Vektor pSFS2A snR52 FR2 4 tRNAs upFR erhalten wurde. Für die Integration der *EcTyrtrRNA_{CUA}* in einer oder drei Kopien wurde die *SNR52* upstream flankierende

Region ebenfalls in die Vektoren pSFS2A snR52 FR2 1 tRNA und pSFS2A snR52 3 tRNAs kloniert.

pSFS2A C-terminaler Tag V5 His₆ (pSFS2A CT)

Plasmid pSFS2A CT wurde hergestellt, um Zielproteine fusioniert mit einem C-terminalen V5/His₆-Peptid epitop exprimieren zu können. Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide C3-5 und C5-3 (Tabelle 13) phosphoryliert und durch Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen als Doppelstrang zusammengelagert. Die daraus resultierenden einzelsträngigen Überhänge wurden verwendet, um eine *dead-end* Klonierung in den *XhoI* geschnittenen pSFS2A Vektor durchzuführen, so dass Vektor pSFS2A CT erhalten wurde.

pSFS2A Eno1Pr CT GFP EnoT und pSFS2A Eno1Pr CT GFP N149X EnoT

Für eine konstitutive, starke Expression von yeGFP als Reporterkonstrukt für die Translation mit aminoacylierten Suppressor-tRNAs wurden die regulatorischen Sequenzen des *ENO1* Locus ausgewählt. Zunächst wurde der yeGFP ORF aus Plasmid pSFS2A-als1 [Purschke, FG 2012] mit den Oligonukleotiden yeGFP for KpnI Stul und yeGFP rev w/o TAA XhoI (Tabelle 14) amplifiziert und nach Restriktion mit *KpnI* und *XhoI* in Plasmid pSFS2A CT integriert, so dass pSFS2A CT GFP generiert wurde. Die upstream regulatorische Sequenz von *ENO1* wurde mit den Primern Eno1 Pr for KpnI und Eno1 Pr rev Stul (Tabelle 14) mit genomischer DNA als Matrize amplifiziert. Das so erhaltene 416 bp lange PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *Stul* geschnitten und in Vektor pSFS2A CT GFP integriert, so dass pSFS2A Eno1Pr CT GFP erhalten wurde. Es wurde ein 400 bp langes Fragment der 3' flankierenden Sequenz des *ENO1* ORFs mit den Primern Eno1 Ter for NotI und Eno1 rev SacII (Tabelle 14) amplifiziert und nach Restriktion mit *NotI* und *SacII* in Plasmid pSFS2A Eno1Pr CT GFP ligiert. Nach Sequenzierung des Plasmids zeigte sich, dass bereits in Vektor pSFS2A-als1 eine Punktmutation (T216G) enthalten war, welche durch PCR-basierte Mutagenese mit den Oligonukleotiden yeGFP G216T for und rev (Tabelle 14) korrigiert wurde. Aus dem so erhaltenen Plasmid pSFS2A Eno1Pr CT GFP EnoT wurde durch PCR-basierte Mutagenese mit den Oligonukleotiden yeGFP N149X for und rev (Tabelle 14) Plasmid pSFS2A Eno1Pr CT GFP N149X EnoT generiert.

pSFS2A CT Tsa FR1 ORF FR2 und daraus resultierende Varianten

Die Expression des C-terminal getagtem Tsa1p bzw. der daraus mutagenisierten Varianten mit Amber Codons sollte vom endogenen *TSA1A* Locus aus stattfinden, daher wurden die unmittelbar flankierenden Sequenzen des *TSA1* ORFs am *TSA1A* Locus für die homologe Rekombination in den Transformationsvektor kloniert. Zu diesem Zweck wurden zunächst 518 bp der unmittelbar downstream flankierenden Region zum ORF mit den Oligonukleotiden Tsa1 FR2 for NotI und Tsa1 FR2 rev SacII (Tabelle 15) aus genomischer DNA amplifiziert und über die *NotI* und *SacII* Schnittstellen in Vektor pSFS2A CT kloniert, so dass Plasmid pSFS2A CT Tsa1 FR2 erhalten wurde. Der ORF von *TSA1* wurde ohne Stop Codon zusammen mit einer upstream flankierenden Sequenz von 884 bp aus genomischer DNA amplifiziert unter Verwendung von Primern Tsa1 FR1 for KpnI und Tsa1 ORF rev w/o TAA XhoI 3 (Tabelle 15). Das resultierende PCR-Produkt von 1485 bp wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* geschnitten und *in frame* zum C-terminalen V5/His6-Tag in Vektor pSFS2A CT Tsa1 FR2 ligiert, so dass Plasmid pSFS2A CT Tsa FR1 ORF FR2 erhalten wurde.

pSFS2A C-terminaler HA-Tag (pSFS2A CT HA)

Zur fusionierten Expression von Zielproteinen mit einem C-terminalen HA-Epitop wurde das Plasmid pSFS2A CT HA kloniert. Dazu wurden die Oligonukleotide CT HA for und CT HA rev (Tabelle 16) phosphoryliert und anschließend durch Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen zu einem Doppelstrang mit einzelsträngigen Überhängen zusammengelagert. Das Insert wurde in den *XhoI* geschnittenen Vektor pSFS2A *dead end* kloniert, so dass Vektor pSFS2A CT HA erhalten wurde.

pSFS2A CT HA Tsa1 FR1 ORF FR2

Der *TSA1* ORF wurde ohne das Stop Codon aber mit der upstream flankierenden Region aus Plasmid pSFS2A CT Tsa1 FR1 ORF FR2 mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pSFS2A CT HA kloniert. Die flankierende Region Tsa1 FR2 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *SacII* aus Vektor pSFS2A CT Tsa1 FR1 ORF FR2 geschnitten und in Plasmid pSFS2A CT HA Tsa1 ORF FR1 kloniert, so dass der finale Vektor pSFS2A CT HA Tsa1 FR1 ORF FR2 generiert wurde.

pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2 und daraus resultierende Varianten

Für die homologe Rekombination mit genomischer DNA wurde eine 1.254 bp lange flankierende Region unmittelbar downstream des *TUP1* ORFs mit den Primern Tup1 FR2 for NotI und Tup1 FR2 rev SacII (Tabelle 17) aus genomischer DNA amplifiziert. Nach Restriktion mit *NotI* und *SacII* wurde das Insert in Plasmid pSFS2A CT kloniert. Der *TUP1* ORF ohne Stop Codon aber mit upstream flankierender Region wurde aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden Tup1 FR1 for KpnI und Tup1 ORF w/o TAA rev XhoI (Tabelle 17) amplifiziert. Das resultierende 2.090 bp lange PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen von *KpnI* und *XhoI* in Vektor pSFS2A CT Tup1 FR2 kloniert. Der somit erhaltene Vektor pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2 wurde als Matrize für die PCR-basierte Mutagenese zur positionsspezifischen Integration von Amber Codons mit den Primern aus Tabelle 17 verwendet.

pSFS2A CT HA Tup1 FR1 ORF FR2

pSFS2A CT HA Tup1 FR1 ORF FR2 wurde wie für pSFS2A CT HA Tsa1 FR1 ORF FR2 beschrieben kloniert, durch Restriktion des Vektors pSFS2A CT Tup1 FR1 ORF FR2 und Integration in Plasmid pSFS2A CT HA.

2.6 Transformation

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

- Puffer TFB1 (30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 10 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin)
- Puffer TFB2 (10 mM Na-MOPS, pH 7; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % (v/v) Glycerin)

Zur Herstellung chemisch kompetenter DH5 α wurden 2 x 500 ml LB-Medium aus einer Übernachtskultur im Verhältnis 1:200 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht wurde. Die Kulturen wurden bei 3.000 x g und 4 °C für 15 min pelletiert (Beckmann Zentrifuge Rotor JA-10) und nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellpellets jeweils in 100 ml Puffer TFB1 resuspendiert. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 3.000 x g und 4 °C für 15 min. Anschließend wurden die Zellpellets jeweils in 20 ml Puffer TFB2 resuspendiert. Bei der Präparation ist darauf zu achten, dass die Zellen immer auf Eis

gehalten werden und steril gearbeitet wird. Nach Aliquotieren der Zellen werden sie bei -80 °C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation von DH5 α Zellen wurden die Protokolle nach Higa und Mandel [Higa, A *et al.* 1970] sowie nach Cohen *et al.* [Cohen, SN *et al.* 1972] verwendet. Aliquots chemisch kompetenter Zellen wurden 20 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je 20 μ l Ligationsansatz 100 μ l kompetente Zellen zugegeben und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min, dann wurden die Zellen erneut 5 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurde 900 μ l LB-Medium zugegeben und die Zellen wurden 45 min unter Schütteln (160 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 16.060 x *g* für 5 sec pelletiert und es wurden 900 μ l des Überstandes abpipettiert. In dem verbliebenen Volumen wurde das Zellpellet resuspendiert und die Zellen wurden auf Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker (LB_{AMP} 100 μ g/ml oder LB_{CAP} 50 μ g/ml) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C konnten die Bakterienkolonien für die Überprüfung durch Kolonie-PCR oder zum Animpfen von Flüssigmedium für die Präparation von Plasmid-DNA verwendet werden.

2.6.2 Transformation von *C. albicans*

- 1 M Lithiumacetat (LiAc)
- 10-fach TE-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA;)
- 1 M Dithiothreitol (DTT)
- 1 M Sorbitol
- 0,5 % (v/v) Natriumhypochlorit
- Elektroporationsküvetten, Spaltbreite 0,4 cm (Bio-Rad)
- Elektroporator MicroPulser (Bio-Rad)

Die Transformation von *C. albicans* Stämmen mit DNA-Kassetten erfolgte nach dem Protokoll von Reuss *et al.* [Reuss, O *et al.* 2004]. Aus einer Vorkultur wurden 50 ml YPD im Verhältnis 1:20.000 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 811 x *g* für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 8 ml sterilem Wasser resuspendiert und nach

Zugabe von je 1 ml 10-fach TE-Puffer und 1 M LiAc für 1 h bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Danach wurden 250 µl 1 M DTT zugegeben und erneut 30 min bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden mit eiskaltem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und bei 811 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut bei 811 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und ein erneuter Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde das Sorbitol bis auf einen Überstand von etwa 1 ml abpipettiert und die kompetenten Zellen wurden in dem verbleibendem Sorbitol resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 40 µl zu je 10 µl eines Restriktionsansatzes des zu transformierenden Plasmids pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung aus kompetenten Zellen und exogener DNA in die zuvor mit 0,5 % Natriumhypochlorit und 70 % EtOH gewaschenen und getrockneten Elektroporationsküvetten überführt. Im Elektroporator wurde im Programm „Sc2“ ein elektrischer Impuls von 1,5 kV gegeben. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Sorbitol aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 381 x g für 2 min wurde das Zellpellet in 1 ml YPD-Medium aufgenommen und die Zellen wurden 4 h bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 381 x g für 2 min pelletiert und nach Abpipettieren von 900 µl Überstand in dem verbleibendem YPD-Medium resuspendiert und auf YPD-Platten mit 200 µg/ml Nourseothricin ausplattiert. Die *C. albicans* Kolonien können nach 24 - 36 h weiterverwendet werden.

Regeneration des Selektionsmarkers

Die *SAT1*-Flipper-Kassette sollte nach Transformation in *C. albicans* wieder aus dem Genom ausgeschnitten werden, zum einen, damit bei Austausch von Allelen mit mutanten Varianten der Locus weitestgehend im endogenen Zustand bleibt und zum anderen, damit die Nourseothricin-Resistenz (*caSAT1*, Streptothricin-Acetyltransferase) erneut als dominanter Selektionsmarker für weitere Transformationen im selben Stamm zur Verfügung steht. Da der vor dem Flippase-Gen befindliche Maltose-Promotor (*Mal2*-Promotor) „leaky“ ist, reicht normalerweise die Inkubation der Stämme in regulärem, Glucose-enthaltendem YPD-Medium zur Induktion. Effizientere Aktivierung der *FLP*-Rekombinase findet jedoch in YPM-Medium statt, das als Kohlenstoffquelle 2% Maltose enthält. Aus einer Übernachtskultur in YPD-Nou²⁰⁰-

Medium werden 20 ml YPM-Medium im Verhältnis 1:2.000 angeimpft und 24 h bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Kultur so verdünnt, dass in 100 µl etwa 300 Zellen enthalten waren, die auf YPD-Nourseothricin-Platten mit 12,5 µg/ml Nourseothricin ausplattiert wurden. Nach Inkubation zwischen 36 h und 48 h bei 30 °C sind deutlich größere, Nourseothricin-resistente (Nou^R) von kleineren, Nourseothricin-sensitiven (Nou^S) Kolonien unterscheidbar. Die Nourseothricin-sensitiven Kolonien, die somit die SAT1-Flipper-Kassette nicht mehr enthalten, wurden weiter auf YPD- und YPD- Nou²⁰⁰-Platten vereinzelt. Bei Exzision der SAT1-Flipper-Kassette bleibt eine FRT-Sequenz (*FLP* recombination target) im Genom zurück.

2.7 Methoden zur Analyse von RNA

2.7.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *C. albicans* und *S. cerevisiae*

- 0,5 % Natriumhypochlorit

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden die jeweiligen Stämme in entsprechendem Medium (*C. albicans*: SC-Medium, *S. cerevisiae*: SC^{-TRP/URA}-Glukosemedium) kultiviert. Frische Kulturen wurden aus Übernachtskulturen (*S. cerevisiae* 2 Tage alte Kulturen aufgrund des langsameren Wachstums) auf eine OD₆₀₀ von 0,2 (*S. cerevisiae*: OD₆₀₀ von 0,5) angeimpft und 4 h (*S. cerevisiae* 7 h) bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 811 x *g* geerntet, der Überstand wurde bis auf ca. 0,5 ml abgenommen und das Zellpellet wurde in dem verbleibendem Medium resuspendiert. Durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff wurden die Zellen schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer Schwingmühle der Firma Retsch (Retsch MM20). Die zum Aufschluss verwendeten Teflon-Behälter und Wolframcarbidge-Kugeln wurden zuvor in 0,5 % Natriumhypochlorit und 70 % EtOH gereinigt und getrocknet. Durch Schütteln der gefrorenen Zellperlen in den Teflon-Behältern mit einer Wolframcarbidge-Kugel (2 min mit 30 Schwingungen/sec) wurden die Zellperlen zu feinem Zellpulver homogenisiert. Vor dem Aufschluss wurden die Behälter in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte mit dem

RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Laut Angaben des Herstellers werden selektiv nur RNAs über 200 nt Länge angereichert, tatsächlich wurden aber auch kleinere RNAs aufgereinigt. Das Kit ist in diesem Zusammenhang für die Analyse von tRNAs in der Gesamt-RNA verwendet worden. Das Zellpulver wurde unmittelbar nach dem Zermahlen in 600 µl Puffer RLT mit 0,01 % (v/v) β-Mercaptoethanol aufgenommen und gevortext. Es folgten zwei Zentrifugations-schritte bei 16.060 x *g* für je 2 min, nachdem der Überstand jeweils in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, um Zelltrümmer zu entfernen. Zu den klaren Überständen wurden 700 µl 70 % DEPC-EtOH gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurden 700 µl der Mischung auf die Säule pipettiert und 15 sec bei 9.520 x *g* zentrifugiert. Je nach Volumen der Mischung wurde dieser Schritt ein zweites Mal wiederholt. Die an die Säule gebundene RNA wurde durch Waschen mit 700 µl Puffer RW1 und anschließende Zentrifugation bei 9.250 x *g* für 10 sec gereinigt. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 µl Puffer RPE. Nach dem ersten Waschen wurde erneut bei 9.250 x *g* für 15 sec zentrifugiert, nach dem zweiten Waschen mit Puffer RPE wurde bei 9.250 x *g* für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die an die Säule gebundene RNA wurde durch Aufpipettieren von 30 - 50 µl RNase-freiem Wasser auf die Säulenmatrix, Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 9.250 x *g* für 1 min eluiert.

2.7.2 Isolation von Gesamt-RNA unter sauren Bedingungen

- Natriumacetat-Puffer (0,3 M Natriumacetat, pH 4.5-5.0; 10 mM Na₂EDTA in DEPC-H₂O)
- Roti-Aqua-Phenol (pH 4,5 Carl Roth)
- Natriumacetat 10 mM, pH 5,0 (in DEPC-H₂O)
- Tris-HCl 1 M, pH 9,5 (in DEPC-H₂O)

Die Isolation der Gesamt-RNA unter sauren Bedingungen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Köhrer und Rajbhandary [Kohrer, C *et al.* 2008]. Die dazu benötigten Puffer wurden zur Vermeidung von RNase-Aktivität mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser hergestellt. Die *C. albicans* Stämme wurden aus einer Vorkultur in SC-Medium mit oder ohne AzF auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und 4 h bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) kultiviert. *S. cerevisiae*

Stämme wurden aus einer zwei Tage kultivierten Vorkultur in SC^{-TRP/URA}-Glukosemedium mit und ohne AzF auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und 7 h bei 30 °C auf eine OD₆₀₀ von 1 - 1,2 unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurden, wie bei Isolation von Gesamt-RNA beschrieben, Zellperlen durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff hergestellt und in der Schwing-Mühle homogenisiert.

Das Zellpulver wurde in 500 µl Natriumacetat-Puffer aufgenommen. Für Proben, die anschließend deacyliert werden sollten, wurde die doppelte Menge Zellperlen und Natriumacetat-Puffer eingesetzt. Der Mischung aus Zellpulver und Natriumacetat-Puffer (ca. 750 µl) wurde das gleiche Volumen mit Wasser äquilibrierten Phenols zugegeben und 10 sec gevortext. Die Probe wurde 15 min lang jeweils 10 sec gevortext und anschließend 10 sec auf Eis gekühlt, um eine Degradation der RNA durch Erwärmung zu verhindern. Nach dem Vortexen wurde 15 min bei 16.060 x g und 4 °C zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wurde in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Der organischen Phase wurde erneut das halbe Volumen (375 µl) Natriumacetat-Puffer zugegeben und nochmals 15 min lang 10 sec gevortext und 10 sec auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation 15 min bei 16.060 x g und 4 °C wurden die wässrigen Phasen beider Extraktionen im 15 ml PP-Röhrchen vereinigt und das 2,5-fache Volumen (3,75 ml) 100 % EtOH (-20 °C) wurde zugegeben. Anschließend wurde die RNA für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Die Mischung aus Ethanol und Puffer wurde bei 12.000 x g (Beckmann Zentrifuge Rotor JA 25-50) und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet zwei Mal mit je 1 ml 70 % DEPC-EtOH (-20 °C) gewaschen und unter der Sterilbank für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA für die Analyse aminoacylierter Proben wurde je nach Pellet-Größe in 80 - 120 µl 10 mM Natriumacetat pH 5,0 resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Sollte die Probe anschließend deacyliert werden, wurde das RNA-Pellet je nach Größe in 80 - 120 µl eiskaltem DEPC-H₂O aufgenommen. 1 M Tris-HCl pH 9,5 wurde zu einer Endkonzentration von 0,2 M zugegeben und durch Inkubation bei 37 °C für 45 min wurden die beladenen tRNAs deacyliert. Danach wurden die Proben wie beschrieben mit dem 2,5-fachen Volumen 100 % EtOH (-20 °C) gefällt und zur weiteren Lagerung wurde das RNA-Pellet in 10 mM Natriumacetat pH 5,0 aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch durch Extinktionsmessung bei 260 nm (A₂₆₀). Hierzu wurden entsprechende Verdünnungen in Wasser hergestellt und im Spektralphotometer V630 (Jasco) oder Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) vermessen. Die Qualität wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm berechnet und lag üblicherweise über einem Wert von 1,9.

2.7.4 Sequenzspezifischer Nachweis von tRNAs durch Northern Blot

- Harnstoff-Acrylamid Stammlösung (10 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1; 8 M (w/v) Harnstoff; 1-fach TBE-Puffer)
- Formamid-Ladepuffer (98 % (v/v) Formamid, deionisiert; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,025 % (w/v) Xylencyanol; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau)
- 0,5-fach TBE Puffer (44,5 mM Tris; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA)
- Low Range ssRNA Ladder (NEB)
- SYBR Gold (Life Technologies)
- Hybond-N Nylonmembran (GE Healthcare)
- Church-Puffer (7 % (w/v) SDS; 1 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA; 250 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2)
- 2-fach SSC Puffer (300 mM NaCl; 30 mM Natriumcitrat; pH 7,0)
- PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad)

Für die Transkriptions-Analyse der heterolog exprimierten *EcTyr*tRNA_{CUA} wurde ein Northern Blot nach einem modifizierten Protokoll von Brown *et al.* [Brown, T *et al.* 2004] durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Gel (10 % Acrylamid/Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 1-fach TBE Puffer, 0,1 % TEMED, 0,1% APS) der Maße 16 cm x 18 cm x 1,5 mm gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde ein Vorlauf von 30 min bei 220 V in 0,5-fach TBE durchgeführt. Nach Ende des Gelvorlaufs wurden je 20 µg Gesamt-RNA (*S. cerevisiae*: 1 µg) mit dem gleichen Volumen Formamid-Ladepuffer vermischt und nach einem 2-minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde die Low Range ssRNA Ladder nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Auftrennung wurde für 3 h bei 220 V bei Raumtemperatur durchgeführt, anschließend wurde das Gel auf 10 x 17 cm zugeschnitten (von oben). Die im Gel enthaltene RNA wurde in 150 ml 0,5-fach TBE mit SYBR Gold in einer Verdünnung von 1:50.000 für 10 min bei Raumtemperatur

gefärbt und in der UV-Kammer visualisiert. Der Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran (Hybond-N) wurde per Elektrotransfer (Hoefer TE77X Semi-Dry Transfer Unit) mit 0,5-fach TBE als Transferpuffer bei 300 mA für 45 min durchgeführt. Anschließend wurde die RNA mit der Membran durch zweimalige Bestrahlung (Stratalinker, Stratagene) quervernetzt. Es folgte ein Waschschrift in 2-fach SSC-Puffer, anschließend wurde die Membran getrocknet und konnte entweder direkt für eine Hybridisierung weiterverwendet werden oder für einen späteren Zeitpunkt bei -20 °C gelagert werden.

Nach einer Prähybridisierung der Membran von 1 h bei 65 °C in 15 ml Church-Puffer, wurde die radioaktiv markierte *EcTyrRNA*_{CUA}-spezifische Sonde zugegeben (tRNA Sonde 2, Sequenz 5'-3':TCTGCTCCCTTTGGCCGCTCGGGAACCCCACC [Chen, S *et al.* 2007]). Zur radioaktiven Markierung des DNA-Oligonukleotids wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz 0,8 µM tRNA Sonde 2, 1-fach T4-PNK-Puffer, 20 Units T4-PNK und 2,5 mCi γ -³²P-ATP (25 µl 6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) zusammenpipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) transferiert ein radioaktives ³²P_i (*inorganic phosphate*, Orthophosphat) von der gamma-Position des radioaktiven γ -³²P-ATP auf das 5'-Ende des Oligonukleotids. Nach der Markierungsreaktion werden spezifisch markierte Oligonukleotide durch Aufreinigung mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* gewonnen, während nicht in der Reaktion verwendetes γ -³²P-ATP und Reaktionsprodukte abgereichert werden. Das *QIAquick Nucleotide Removal Kit* wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zu der 50 µl Markierungsreaktion wurden 500 µl Puffer PN zugegeben und auf die Säule pipettiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 3.427 x g wurde mit 500 µl Puffer PE durch Zentrifugation von 1 min bei 3.427 x g gewaschen. Der Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Durch Zentrifugation von 1 min bei 16.060 x g wurde die Säule getrocknet und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der gebundenen, radioaktiv markierten Oligonukleotide erfolgte durch Pipettieren von 30 µl Puffer EB auf die Säule, 1-minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 16.060 x g. Für eine erhöhte Ausbeute an radioaktiv markierten Oligonukleotiden kann das Eluat in einem zweiten Elutionsschritt eingesetzt werden.

Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde wurde in 15 ml frischem Church-Puffer über Nacht bei 65 °C durchgeführt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran zwei Mal 15 min mit jeweils 15 ml 1-fach SSC 0,1 % SDS und anschließend mit 15 ml des stringenteren Waschpuffers 0,1-fach SSC 1% SDS, ebenfalls 15 min gewaschen. Alle Waschschriffe wurden im Hybridisierungssofen bei 65 °C durchgeführt.

Die gewaschene, hybridisierte Membran wurde in Folie eingeschweißt und je nach Radioaktivität 3 - 6 h auf Autoradiographie-Platten (MS Phosphorbildplatten, Fuji Photo Film) exponiert und anschließend im Fluoreszenz-Laser-Scanner FLA-5100 (Fuji Photo Film) mit einer Laser-Wellenlänge von 635 nm und Filter IP (*Image Plate*) ausgewertet.

Quantifizierung der *Ec*TyrtrRNA_{CUA} Expression mittels Densitometrie

Die Quantifizierung der *Ec*TyrtrRNA_{CUA} Expression erfolgte semiquantitativ über die Intensitäten im Northern Blot. Es wurde die Software AIDA Image Analyzer v 4.10 im Modus 1D Evaluation verwendet. Um jede Bande wurde ein Densitometrie-Fenster gleicher Größe gelegt und die Bandenintensität abzüglich des Hintergrundes quantifiziert.

2.7.5 Nachweis aminoacylierter tRNAs durch *Acid Urea PAGE*

- Saure Harnstoff-Acrylamid Stammlösung (6,5 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1; 8 M (w/v) Harnstoff; 0,1 M Natriumacetat pH 5,0)
- AUP-Proben-Ladepuffer (0,1 M Natriumacetat pH 5,0; 8 M (w/v) Harnstoff; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol)
- AUP-Elektrophoresepuffer (0,1 M Natriumacetat, pH 5,0)
- Low Range ssRNA Ladder (NEB)
- SYBR Gold (Life Technologies)
- AUP-Transferpuffer (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA)
- Hybond-N Nylonmembran
- Church-Puffer (7 % (w/v) SDS; 1 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA; 250 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2)
- PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad)

Für eine Auftrennung der beladenen und unbeladenen tRNAs wurde ein Gel (6,5 % Acrylamid/Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 0,1 M Natriumacetat, 0,15 % (v/v) TEMED und 0,07 % (v/v) APS) der Maße 16 cm x 18 cm x 1 mm gegossen. Nach Aus-

polymerisieren des Gels und einem Vorlauf bei 160 V für 30 min in AUP-Elektrophoresepuffer wurden jeweils 20 µg der RNA-Probe mit dem gleichen Volumen AUP-Proben-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde die Low Range ssRNA Ladder nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Gellauf wurde für 6 - 7 h bei 160 V im Kühlraum durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel hinausgelaufen war und die Xylencyanol-Front noch 4 cm vom unteren Gelrand entfernt war. Für *S. cerevisiae* Proben wurden nur 1 µg der sauren Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel entsprechend zugeschnitten, so dass nur noch der Bereich mit den tRNAs, 5 S rRNA und 5,8 S rRNA enthalten war (7 cm vom unteren Rand abgeschnitten). Zur Qualitätskontrolle der RNA und des Gellaufs wurde in 0,1 M Natriumacetat pH 5,0 mit einer 50.000-fachen Verdünnung von SYBR Gold für 15 min gefärbt. Nach Visualisieren der RNA in der UV-Kammer wurde das Gel über Elektrotransfer (Hoefer TE77X Semi Dry Transfer Unit) für 45 min bei 300 mA mit AUP-Transferpuffer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, GE Healthcare) transferiert. Die an die Nylonmembran gebundene RNA wurde in einem UV-Crosslinker (Stratalinker, Stratagene) mit der Membran quervernetzt. Nach Waschen der Membran in Wasser wurde die radioaktive Markierung der einzelsträngigen Sonde (tRNA Sonde 2), sowie Prähybridisierungs-, Hybridisierungs-, Wasch- und Entwicklungsschritte wie für den regulären Northern Blot beschrieben durchgeführt.

Quantifizierung der Beladungseffizienz der *EcTyr*tRNA_{CUA} mittels Densitometrie

Die Beladungseffizienzen der verschiedenen AzF-RS Varianten wurden über die Intensitäten der beladenen und unbeladenen *EcTyr*tRNA_{CUA} im Northern Blot bestimmt. Es wurde die Software AIDA Image Analyzer v 4.10 im Modus 1D Evaluation verwendet. Es wurde jeweils ein Densitometrie-Fenster gleicher Größe über die Banden beladener und unbeladener tRNA einer Spur gelegt. Die Bandenintensitäten wurden abzüglich des Hintergrundes quantifiziert und die resultierenden Werte von beladener und unbeladener tRNA wurden addiert und als 100 % deklariert. Die Anteile an beladener tRNA in der oberen Bande wurde entsprechend der 100 % der für die gesamte Spur gemessenen Intensität ermittelt.

2.8 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.8.1 Crosslink-Induktion

- Bio-Link UV Crosslinker, Peqlab

Die zu untersuchenden Stämme wurden aus einer Übernachtskultur in das jeweilige SC-Medium angeimpft. Abhängig vom analysierten Protein wurden Stämme mit Tsa1p Varianten auf eine OD₆₀₀ von 0,7 angeimpft, Stämme mit Tup1p Varianten wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft. Es wurden jeweils Kulturen mit oder ohne Supplementation von 1 mM AzF hergestellt. Nach 4 h Kultivierung bei 30 °C und 160 rpm wurden die Kulturen für UV-Bestrahlung je nach Volumen in Petrischalen überführt, für größere Ansätze zur Proteinaufreinigung wurden die Kulturen in Kunststoffschalen überführt. Die Quervernetzung wurde durch UV-Bestrahlung (Bio-Link UV Crosslinker, Peqlab) für 30 min bei 365 nm induziert. Die Kulturen wurden direkt weiterverwendet oder nach Pelletierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.8.2 Proteinisolation

- PGSK-Puffer (3,3 mM NaH₂PO₄; 49,4 mM Na₂HPO₄; 48,4 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 61 mM Glukose)
- 25-fach Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA, Roche
- PMSF (100 mM)
- Glasperlen (Durchmesser 0,25 – 0,50 mm, Carl Roth)

Die Kulturen wurden wie in *C. albicans* Kultivierung und Crosslink Induktion beschrieben kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 811 x *g* pelletiert und entweder direkt weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Volumen des Zellpellets wurde abgeschätzt und etwa das gleiche Volumen PGSK-Puffer, supplementiert mit Protease-Inhibitor Cocktail und 1 mM PMSF, zugegeben. Das Zellpellet wurde darin resuspendiert und nochmals das gleiche Volumen Glasperlen zugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch Vortexen der Zellen mit Glasperlen für drei Mal 5 min im Kühlraum, dazwischen wurde jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation bei 16.060 x *g* und 4 °C für 10 min vom Lysat abgetrennt. Die Überstände wurden in frische 1, 5 ml Reaktionsgefäße überführt und je nach weiterem Verwendungszweck

für weitere Reaktionen (z.B. Immunopräzipitation, Affinitätschromatographie) eingesetzt oder für die Analyse im Western Blot per Wessel-Flügge-Fällung präzipitiert.

2.8.3 Proteinfällung

- Methanol/Chloroform 4:1
- 100 % Methanol
- 1 % (w/v) SDS
- 1 M NaOH

Die Präzipitation der Proteine wurde nach einem modifizierten Protokoll von Wessel und Flügge durchgeführt [Wessel, D *et al.* 1984]. Zu diesem Zweck wurden üblicherweise 200 µl Proteinlysate in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Lysat wurde das 5-fache Volumen Methanol/Chloroform 4:1 (1000 µl) zugegeben und gevortext, anschließend wurde das 3-fache Volumen des Lysats (600 µl) Wasser zugegeben und erneut gevortext. Die Mischung wurde bei 16.060 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. An der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase bildete sich ein Proteinpellet. Nach Abnahme der oberen Phase wurde das Proteinpellet durch Zugabe des 6-fachen Volumens (600 µl) 100 % Methanol und durch vorsichtiges Schwenken gewaschen. Durch erneutes Zentrifugieren bei 16.060 x g für 1 min wurde das Proteinpellet am Boden des 2 ml Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet wurde an der Luft getrocknet, bevor es in etwa dem gleichen Volumen 1 % SDS mit 50 mM NaOH gelöst wurde.

2.8.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde abgewandelt nach Lowry [Lowry, OH *et al.* 1951] mit dem Bio-Rad *Dc Protein Assay Kit* nach Angaben des Herstellers im Mikrotiterplatten-Format bestimmt. Die Eichgerade wurde mit einer BSA-Stammlösung von NEB (10 mg/ml) hergestellt. Es wurden dafür sechs verschiedene BSA-Verdünnungen in Wasser hergestellt (2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml), für die Leermessung wurde Wasser verwendet. Von den Proteinlysaten wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:10 in Wasser hergestellt. Von allen Eichlösungen und Proteinverdünnungen wurden je 5 µl in Triplikaten in die

Mikrotiterplatte pipettiert. Aus Reagenz A und Reagenz S wurde eine Arbeitslösung von je 25 µl Reagenz A, supplementiert mit 0,5 µl Reagenz S hergestellt, je Probe und Standardverdünnung wurden 25 µl dieser Arbeitslösung zupipettiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl Reagenz B zugegeben. Im Auslesegerät (Synergy2, BioTek) wurde die Platte 10 sec geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 750 nm ausgelesen. Anhand der Werte der Eichgerade wurden die Protein-konzentrationen der Proteinlysate berechnet.

2.8.5 Immunpräzipitation

- IP-Lysepuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; pH 8,0)
- 25-fach Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA, Roche
- PMSF (100 mM)
- Glasperlen (Durchmesser 0,25 – 0,50 mm, Carl Roth)
- 4-fach Laemmli-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 8,0; 4 mM EDTA; 4 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; Bromphenolblau)

Die Aufreinigung wildtypischer oder mutanter Proteinen mit V5- oder HA-Epitop erfolgte mit Hilfe des *V5 tagged Protein Purification Kit* oder des *HA tagged Protein Purification Kit* (MBL International) nach Angaben des Herstellers.

Für je eine Aufreinigung wurden 50 ml Kultur des entsprechenden *C. albicans* Stammes wie bereits beschrieben kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. Die Pellets wurden einmal in 500 µl IP-Lysepuffer nativ gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren bei 381 x g wurden die Pellets in je 750 µl IP-Lysepuffer nativ, supplementiert mit Protease-Inhibitor Cocktail (ohne EDTA) und 1 mM PMSF aufgenommen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß, in das etwa das gleiche Volumen Glasperlen vorgelegt wurde, pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch dreimaliges Vortexen für 5 min und dazwischen Kühlung der Proben auf Eis für 5 min. Die Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 15 min bei 4 °C abgetrennt und die Proteinlysate wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Falls mehrere Proben des gleichen Stammes analysiert werden sollten, wurden die Kulturmengen sowie die benötigten Puffervolumina entsprechend hochskaliert und der Aufschluss erfolgte statt im 2 ml Reaktionsgefäß in einem 15 ml PP-Röhrchen oder 50 ml PP-Röhrchen mit dem entsprechenden Volumen Glasperlen.

Jeweils 500 µl dieser Proteinlysate wurden mit Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1 % versetzt und für die Aufreinigung mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* oder *HA tagged Protein Purification Kit* in einer Zentrifugationssäule eingesetzt. Zu den jeweils 500 µl wurden 20 µl der Antikörper-gekoppelten *Beads* pipettiert und die Säule wurde mit dem mitgelieferten Schraubdeckel verschlossen. Die Inkubation erfolgte für 1 h rotierend im Kühlraum. Anschließend wurde der Verschluss der Säule entfernt, der Deckel gelockert und der Durchfluss durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 10 sec in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die in der Säule zurückgehaltenen *Beads* wurden mit 200 µl der im Kit enthaltenen Waschlösung durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 10 sec gewaschen. Der Waschschrift wurde weitere zwei Male wiederholt. Die Elution erfolgte mit dem im Kit enthaltenen V5- oder HA-Peptid (jeweils 2 mg/ml). Dazu wurden jeweils 20 µl Peptid auf die *Beads* pipettiert und die Öffnung der Säule wurde mit dem Verschluss blockiert. Für das V5 Kit wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit dem HA Kit aufgereinigte Proben wurden für die erste Elution für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernen des Verschlusses wurde durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 10 sec das erste Eluat in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die zweite Elution erfolgte erneut mit 20 µl Peptidlösung, für das V5-Peptid wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, für das HA-Peptid wurde 1 min bei 4 °C inkubiert. Das zweite Eluat wurde durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 10 sec im gleichen Reaktionsgefäß aufgefangen und so mit dem ersten Eluat vereinigt. Anschließend wurde mit 4-fach Laemmli-Puffer unspezifisch eluiert, um durch die stark reduzierenden Bedingungen alle noch gebundenen Proteine sowie die Antikörper von den *Beads* zu eluieren. Dazu wurden 40 µl 4-fach Laemmli-Puffer auf die *Beads* pipettiert und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation bei 16.060 x g für 10 sec eluiert.

2.8.6 Nickel-Affinitätschromatographie

- Lysepuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0)
- Waschpuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0)
- Elutionspuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 8,0)
- Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden)
- Chromatographie-Säule 10 ml, Durchmesser 0,9 cm (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Als weitere Möglichkeit zur Aufreinigung wildtypischer oder mutanter Proteine wurde über das 6-fach Histidin-Epitop (His₆-Tag) die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen angewandt. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der Immunpräzipitation liegt in der Anwendbarkeit für größere Volumina, für die eine Immunpräzipitation nicht geeignet ist. Die Affinitätschromatographie wurde mittels Durchfluss durch Schwerkraft (*gravity flow*) durchgeführt.

Für eine Aufreinigung im analytischen Maßstab wurden 100 ml Kultur der entsprechenden Stämme wie bereits beschrieben kultiviert und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt weiterverwendet. Nach Waschen der Pellets mit 5 ml sterilem Wasser wurde die Zellsuspension in ein 50 ml PP Röhrchen überführt und entsprechend der Pelletgröße (ca. 1 - 2 ml) wurde das Pellet in dem doppelten Volumen Lysepuffer, supplementiert mit 1-fach Protease-Inhibitor Cocktail (ohne EDTA) und 1 mM PMSF aufgenommen und das einfache Volumen Glasperlen zugegeben. Durch vier- bis sechsmaliges Vortexen für jeweils 5 min bei Raumtemperatur und dazwischen Kühlung der Proben auf Eis für 5 min wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 16.000 x *g* für 15 min bei 4 °C (Beckmann Zentrifuge, Rotor JA 25-50) wurden klare Lysate erhalten. Die Lysate wurden entweder direkt für eine Aufreinigung weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um in der Säule eine gewisse Schichtdicke und damit nicht zu schnellen Durchfluss zu gewährleisten, wurde nicht weniger als 500 µl des Ni-NTA Säulenmaterial verwendet, was einer Bindekapazität von 5 - 10 mg Fusionsprotein pro ml Bettvolumen entspricht. Die Ni-NTA Agarose wurde nach Pipettieren in die Säule mit 5 ml Lysepuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Lysat auf die Säule gegeben und der Durchfluss wurde aufgefangen. Die Säule wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, dieser wurde ebenfalls für spätere Analysen gesammelt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Überschuss an Imidazol, welches mit der ionischen Bindung zwischen den Nickel-Ionen und dem His₆-Tag konkurriert und dadurch die Proteine von der Nickel-NTA Agarose ablöst. Dazu wurde in zwei Schritten mit jeweils 500 µl Elutionspuffer eluiert, alle noch unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine wurden durch 4-fach Laemmli Puffer abgelöst.

Für eine Hochskalierung der Aufreinigung wurden 1 Liter Kultur verwendet und in 500 ml Zentrifugenbechern pelletiert. Die Pellets wurden jeweils mit 10 ml Wasser gewaschen und in einem 50 ml PP Röhrchen vereinigt und erneut pelletiert. Die Zellpellets wurden entweder direkt weiterverwendet oder in etwa 10 % ihres Volumens in Lysepuffer resuspendiert und in flüssigen Stickstoff getropft und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Aus einer Kultur von 1 Liter mit einer OD₆₀₀ von 1,2 - 1,5 wurde ein Zellpellet von etwa 7,5 ml Volumen erhalten. Das Zellpellet wurde im doppelten Volumen Lysepuffer, supplementiert mit 1-fach Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA und 1 mM PMSF, aufgenommen und auf zwei 50 ml PP-Röhrchen verteilt, zu denen jeweils etwa 4 ml Glasperlen (entsprechend der Pelletgröße) zugegeben wurden. Durch vier- bis sechsmaliges Vortexen von jeweils 5 min mit dazwischenliegenden Kühlschritten von 5 min auf Eis wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 16.000 x g (Beckmann Zentrifuge Rotor JA 25-50), bei Bedarf auch durch mehrmaliges Zentrifugieren, wurden klare Lysate erhalten. Aus 1 Liter Kultur wurden etwa 20 ml klare Proteinlysate erhalten. In zwei 10 ml Chromatographie-Säulen wurden jeweils 1,5 ml Ni-NTA Agarose pipettiert und mit jeweils 30 ml Lysepuffer äquilibriert. Die Säulen wurden jeweils mit 60 ml Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde in zwei Schritten mit jeweils 2 ml Elutionspuffer und ein weiteres Mal unspezifisch mit 1 ml 4-fach Laemmli Puffer.

2.8.7 Kombination von Affinitätschromatographie und Immunpräzipitation

- Lysepuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0)
- Waschpuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0)
- Elutionspuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 8,0)
- Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden)
- Chromatographie-Säule 10 ml, Durchmesser 0,9 cm (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- Zeba Spin Columns 5 ml (Gelfiltrationssäulen, Thermo Scientific)
- IP-Lysepuffer nativ (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; pH 8,0)
- Amicon Ultra-0,5 ; MWCO 30 kDa (Millipore)

Für eine verbesserte Aufreinigung der Crosslink-Produkte in einem für massenspektroskopische Analysen ausreichendem Maßstab wurde die Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit der Immunpräzipitation über einen anti-V5 Antikörper gekoppelt. Zu diesem Zweck wurden 1 Liter Kultur von Stamm YBC6 bei 30 °C von einer OD₆₀₀ von 0,5 für 4 - 6 h bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,5 in Anwesenheit von 1 mM AzF in SC-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen auf drei Kunststoffschalen verteilt und bei 365 nm für 45 min bestrahlt (Bio-Link UV Crosslinker, Peqlab). Der Aufschluss und die Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Aus der Aufreinigung über den His₆-Tag wurden 4 ml der ersten Elution in Elutionspuffer (E1) erhalten. Um die Pufferbedingungen für die nachfolgende Immunpräzipitation anzupassen, wurde ein Pufferaustausch mittels Gelfiltrationssäulen (Zeba Spin Columns, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Größenaustauschchromatographie werden Proteine zurückgehalten und Salze aus der Probe entfernt. Eine Säule mit 5 ml Säulenmaterial hat eine Kapazität von 700 µl - 2000 µl Probenvolumen, somit wurden die 4 ml Probe E1 auf drei Gelfiltrationssäulen aufgeteilt. Zur Vorbereitung der Säulenmatrix wurde die Lagerungsflüssigkeit durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 2 min abzentrifugiert. Die resultierende Säulenmatrix wurde mit je 2,5 ml IP-Lysepuffer nativ durch erneute Zentrifugation wie oben angegeben äquilibriert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt. Auf die so vorbereitete Säulenmatrix wurde die Probe pipettiert und durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 2 min in einem frischen 15 ml PP-Röhrchen aufgefangen. Die Eluate der drei verwendeten Gelfiltrationssäulen wurden anschließend wieder vereinigt, so dass 4 ml Imidazol-freies Eluat aus der Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhalten wurde. Dem Eluat wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zugesetzt und jeweils 500 µl wurden für eine Aufreinigung mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* eingesetzt, wie bereits unter Immunpräzipitation beschrieben. Aus sieben Aufreinigungen wurden insgesamt 280 µl Eluat erhalten. Für eine Reduktion des Volumens wurden Ultrazentrifugationssäulen (Amicon Ultra 0,5) mit einem Größenausschluss (*molecular weight cut off, MWCO*) von 30 kDa verwendet. Die 280 µl Eluat wurden auf den Filter pipettiert und durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 min wurde das Volumen auf etwa 23 µl reduziert. Durch Umkehren des Filters, Überführen in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation bei 1.000 x g für

2 min wurde das Retentat aus der Filtration gesammelt. Das gesamte Retentat wurde mit 4-fach Laemmli-Puffer versetzt und für eine SDS-PAGE eingesetzt.

2.8.8 Staudinger-Ligation

- 25-fach Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA, Roche
- DyLight 550-Phosphine, Pierce (10 mM in DMSO)

Zur kovalenten Markierung von AzF-enthaltendem Tsa1p mit einem fluoreszenzmarkierten Phosphin wurden die Stämme SPC46 (orthogonales Pärchen und Tsa1p WT) und SPC55 (orthogonales Pärchen und Tsa1p N141X) aus einer Vorkultur in frischem SC-Medium auf OD₆₀₀ von 0,7 in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 ml angeimpft und in An- oder Abwesenheit von 1 mM AzF für 4 h bei 30 °C unter Schütteln (160 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 381 x g für 5 min geerntet und zwei Mal in 1-fach PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in etwa 10 % ihres Volumens 1-fach PBS aufgenommen und durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff für eine spätere Verwendung schockgefroren.

Die gefrorenen Zellen wurden in jeweils 1 ml 1-fach PBS-Puffer aufgenommen, supplementiert mit Protease-Inhibitor Cocktail ohne EDTA und auf jeweils zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit je 400 µl Glasperlen verteilt. In vier Vortexschritten von jeweils 5 min wurden die Zellen aufgeschlossen, dazwischen wurden die Ansätze für jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 16.060 x g und 4 °C abgetrennt. Der klare Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration (5 – 6 µg/µl) wurde wie beschrieben bestimmt. Zu 990 µl Proteinlysate in PBS-Puffer wurden 10 µl DyLight 550 Stammlösung 10 mM in DMSO zu einer Endkonzentration von 100 µM pipettiert. Die Reaktion wurde in einem Lichtschutz-Reaktionsgefäß für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl der Markierungsreaktion für eine Wessel-Flügge-Fällung, wie unter Proteinfällung beschrieben, eingesetzt. 495 µl der Markierungsreaktion wurden auf eine Endkonzentration von 1 % mit Triton X-100 versetzt und wie beschrieben mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* aufgereinigt. Von den Proteinlysaten vor und nach der Staudinger-Ligation wurden jeweils 100 µg aufgetragen, für die Auswertung im Western Blot wurde jeweils ¼ der Eluate (10 µl)

aufgetragen, für die Auswertung im Fluoreszenz-Scanner und die anschließende Coomassie-Färbung wurden $\frac{3}{4}$ der Eluate (30 μ l) eingesetzt.

Die Auswertung im Fluoreszenz-Scanner FLA-5100 (Fuji Photo Film) wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Laser 532 nm, Filter Cy3, Intensität 650 V. Das Gel wurde anschließend 1 h in Fixierlösung inkubiert und weiter behandelt, wie unter Coomassie-Färbung beschrieben.

2.8.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- 4-fach Laemmli-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; Bromphenolblau)
- 4-fach Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS)
- 4-fach Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS)
- Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 37,5 : 1; 30 % (Bio-Rad)
- Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 10 % (w/v)
- TEMED (Tetramethylethyldiamin)
- 10-fach Elektrophorese-Puffer (250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS)
- Größenstandards: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Spectra Multicolor High Range Protein Ladder
- PROTEAN® II xi Cell von Bio-Rad (große Gele)
- SE 250 Mighty Small II von Hoefer (kleine Gele)

Die SDS-PAGE zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen erfolgte nach Laemmli [Laemmli, UK 1970] und Sambrook *et al.* [Sambrook, J *et al.* 1989b]. Die Komponenten für das Gel wurden entsprechend Tabelle 21 oder Tabelle 22 zusammenpipettiert und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zur Polymerisation wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 1 h Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel entsprechend Tabelle 23 gegossen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele entweder bis zum Gebrauch bei 4 °C in feuchte Tücher verpackt gelagert oder direkt weiterverwendet.

Für die Beladung der Gele wurde der Kamm entfernt und die Geltaschen wurden mit 1-fach Elektrophorese-Puffer gespült. Die Gele wurden entsprechend der Angaben des Herstellers in die Laufapparatur eingespannt und die Kammern wurden mit 1-fach Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit 4-fach Laemmli-Puffer

versetzt, so dass die Endkonzentration des Probenpuffers 1-fach war und anschließend 3 min bei 95 °C denaturiert. Nach Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei kleinen Gelen mit 120 V und bei großen Gelen mit 150 V für 2 - 3 h durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war.

Tabelle 21 Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2 kleine Gele)

Acrylamid-/Bisacrylamid-Konzentration	8 %	10 %	12 %	16 %
ddH ₂ O	5,8 ml	5 ml	4,2 ml	2,6 ml
4-fach Trenngel-Puffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %	3,2 ml	4 ml	4,8 ml	6,4 ml
TEMED	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl
APS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tabelle 22 Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2 große Gele)

Acrylamid-/Bisacrylamid-Konzentration	8 %	10 %	12 %	16 %
ddH ₂ O	23,3 ml	20,4 ml	17 ml	10,7 ml
4-fach Trenngel-Puffer	12,2 ml	12,2 ml	12,2 ml	12,2 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %	13,1 ml	16 ml	19,4 ml	25,8 ml
TEMED	56,7 µl	56,7 µl	56,7 µl	56,7 µl
APS 10 %	405 µl	405 µl	405 µl	405 µl

Tabelle 23 Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE (1 Gel)

Sammelgel	klein	groß
ddH ₂ O	1,5 ml	3 ml
4-fach Sammelgel-Puffer	0,6 ml	1,3 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %	0,33 ml	0,67 ml
TEMED	2,5 µl	5 µl
APS 10 %	25 µl	50 µl

2.8.10 Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Coomassie-Färbung

- Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure)
- Färbestammlösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure; 10 % (w/v) Ammoniumsulfat; die Lösung wird nicht filtriert)

- Färbelösung (80 % (v/v) Färbestammlösung; 20 % (v/v) Methanol)
- Entfärbelösung (1 % (v/v) Essigsäure)

Die Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Neuhoff *et al.* [Neuhoff, V *et al.* 1988]. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Polyacrylamidgel durch Inkubation in Fixierlösung für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken fixiert. Anschließend wurde das Gel in Wasser zwei Mal für jeweils 10 min gewaschen. Die Färbelösung wurde direkt vor dem Gebrauch frisch hergestellt durch Mischen der Stammlösung mit 100 % Methanol im Verhältnis 4:1. Für ein kleines Gel wurden 100 ml Färbelösung hergestellt, für ein großes Gel wurden 300 ml Färbelösung angesetzt. Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur für 24 h. Anschließend wurde das Gel zum Entfärben in einen frischen Kunststoffbehälter mit Entfärbelösung überführt und in drei Waschsritten von jeweils 15 min entfärbt. Für die weitere Analyse per Massenspektrometrie wurden die entsprechenden Gelstücke mit Einweg-Skalpellen ausgeschnitten und in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C bis zur Probenvorbereitung gelagert. Diente das Gel dokumentarischen Zwecken, wurde es in einem konventionellen Scanner eingescannt. Mit der colloidalen Coomassie-Färbung nach dem hier beschriebenen Protokoll war es möglich, Proteinbanden ab ca. 20 - 50 ng Protein zuverlässig anzufärben.

2.8.11 Nachweis spezifischer Proteine durch Western Blot

- Immobilon-P (PVDF-Membran, Porengröße 0,45 µm, Millipore)
- Transferpuffer (2,5 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol)
- Blockierlösung (Magermilchpulver 5 % (w/v) in PBS)
- PBS-T-Puffer mit 1 % (w/v) BSA
- ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)

Für die Analyse der translationalen Suppression wurden 40 µg Gesamtprotein in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel (Tsa1p) oder in einem 8%igem SDS-Polyacrylamidgel (Tup1p) aufgetrennt. Bis zu 100 µg Proteinextrakt wurden für die Analyse von Crosslinks auf die beschriebenen Gele aufgetragen.

Für die Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine zunächst von dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert. Auf die Anode der Blottingapparatur (Hoefer TE77X Semi-Dry Transfer Unit) wurden drei zuvor in Transferpuffer gewässerte Whatman-Papiere (0,34 mm) gelegt. Die PVDF-Membran wurde ebenfalls genau auf Gelmaße zugeschnitten, 1 min in Methanol und anschließend 2 min in Transferpuffer äquiliert und auf den Whatman-Papierstapel gelegt. Auf die Membran wurde das Polyacrylamidgel gelegt und mit weiteren drei in Transferpuffer gewässerten Whatman-Papieren bedeckt. Aus dem so aufgebauten Stapel wurden Luftblasen durch Rollen eines Reagenzglases entfernt und die Kathode wurde aufgelegt. Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran wurde mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran in Blockierlösung überführt und entweder für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert oder über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Im Anschluss an den Blockierschritt wurde die Membran für 10 min bei Raumtemperatur in PBS-T-Puffer gewaschen. Die jeweiligen verwendeten Primärantikörper wurden entsprechend Tabelle 6 in PBS-T-Puffer mit 0,5 % BSA verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit der Membran inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in PBS-T-Puffer für jeweils 5 min. Anschließend wurde ein entsprechender Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelter sekundärer Antikörper in der jeweiligen Verdünnung für 30 min bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Nach drei Waschschrten in PBS-T-Puffer wurde die Membran mit dem *ECL Plus Kit* nach Angaben des Herstellers entwickelt. Für eine kleine Membran wurden 2 ml Reagenz A und 50 μl Reagenz B gemischt, für eine große Membran wurden die doppelten Mengen verwendet. In der LAS-1000 CCD Kamera (Fuji Photo Film) wurde die aus der Umsetzung von Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase resultierende Chemilumineszenz detektiert und dokumentiert.

2.8.12 Massenspektrometrie

Tsa1p Proben wurden von der Toplab GmbH (Martinsried) mittels MALDI-TOF nach Standardprotokollen analysiert. Tup1p Proben wurden mittels Nano-LC-ESI-MS/MS an der Universität Hohenheim analysiert. Duplikate der Proben wurden außerdem mittels MALDI-TOF analysiert (In Zusammenarbeit mit Dr. E. Hiller, Fraunhofer IGB, Stuttgart).

Nano-LC-ESI-MS/MS

Die Proteine wurden im Gel proteolytisch mit Trypsin geschnitten nach Shevchenko *et al.* [Shevchenko, A *et al.* 1996]. Anschließend wurden die Gelstücke mit 50 % Acetonitril 0,1 % Ameisensäure für 15 min extrahiert. Der Überstand wurde gesammelt und die Gelstücke wurden für 15 min mit 5 % Ameisensäure bedeckt. Anschließend wurde das gleiche Volumen 50 % Acetonitril zugegeben. Nach 10 min Inkubation wurde erneut der Überstand abgenommen. Die gesammelten, vereinigten Überstände wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert. Die getrockneten Proben wurden anschließend in 0,1 % Ameisensäure aufgenommen. Die Nano-LC-ESI-MS/MS Messungen wurden mit einem ACQUITY nano-UPLC system (Waters, USA) in Verbindung mit einem LTQ-Orbitrap XL Hybrid Massenspektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt. Die tryptisch gespaltenen Proben wurden über eine vorgeschaltete Säule (2 cm x 180 µm, Symmetry C18, 5 µm Partikelgröße, Waters, USA) entsalzt und konzentriert und über eine 25 cm x 75 µm BEH 130 C18 Reversed Phase Säule (1.7 µm particle size, Waters, USA) aufgetrennt. Eine Gradientenelution wurde mit 1 % Acetonitril bis 50 % Acetonitril in 0,1 % Ameisensäure über 90 min durchgeführt. Das LTQ-Orbitrap wurde mit der XCalibur 2.0.7 Software betrieben. Mascot 2.3 (Matrix Science, UK) wurde als Suchmaschine zur Proteinidentifikation verwendet. Die Spektren wurden gegen die Hefe-Datenbank der NCBI-Proteinsequenz-Datenbank gesucht. Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinen gewählt. Variable Modifikationen waren die Oxidierung von Methioninen und Serin/Threonin/Tyrosin Phosphorylierungen. Um die Detektion von Peptiden der V5/His₆-Epitope zu gewährleisten wurden die entsprechenden Peptide außerdem durch Vergleich mit der Sequenz des Tup1 V5/His₆ Fusionsproteins zugeordnet. Zur Identifikation von *p*-Aminophenylalanin wurde *p*-Aminophenylalanin als variable Modifikation von Leucin 63 in CaTup1p gewählt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Scaffold 3 Software dargestellt.

MALDI-TOF

- 50 mM NH₄HCO₃
- 50 mM NH₄HCO₃/Acetonitril 1:1
- 25 mM NH₄HCO₃
- 10 mM DTT in 50 mM NH₄HCO₃ (aus 1 M Stammlösung DTT in NH₄HCO₃)

- 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 (aus 1 M Stammlösung Iodacetamid in NH_4HCO_3)
- Trypsin-Puffer (25 ng/ μl Trypsin, Promega in 25 mM NH_4HCO_3)
- 1 % (v/v) Trifluoressigsäure
- 50 % (v/v) Acetonitril 1 % (v/v) TFA

Die Probenvorbereitung zur MALDI-TOF Messung erfolgte ebenfalls nach Shevchenko *et al.* [Shevchenko, A *et al.* 1996, Shevchenko, A *et al.* 2006]. Die Coomassie-gefärbten Gelstücke wurden mit Einweg-Kanülen in ca. 1 mm x 1 mm große Würfel zerteilt und für 15 min zuerst in Wasser und anschließend in 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril 1:1 gewaschen. Bei starker Färbung der Gelstücke musste der Waschschrift mit 50 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril 1:1 mehrfach wiederholt werden. Anschließend wurde 30 – 50 μl Acetonitril zugegeben, so dass die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Nach 3 min Inkubation wurde das Acetonitril von den geschrumpften Gelstücken wieder abgenommen und die Gelstücke wurden in 100 μl 50 mM NH_4HCO_3 5 min quellen gelassen. Das gleiche Volumen Acetonitril wurde zugegeben und nach 15 min Inkubation wurde der Überstand entfernt. Die Gelstücke wurden erneut mit Acetonitril bedeckt und nach dem Schrumpfen und Entfernen des Überstandes für 10 min in der Vakuumzentrifuge (Speedvac SPD 1010-230, Thermo Scientific) getrocknet.

Zur Reduktion und Alkylierung der Proteine in den Gelstücken wurden die entsprechenden Lösungen unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 50 μl 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 bedeckt und 3 min quellen gelassen. Anschließend wurde 45 min bei 56 °C inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgenommen und die Gelstücke wurden mit 50 μl 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 bedeckt und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde erneut entfernt und die Gelstücke wurden mit 30 μl Acetonitril geschrumpft und für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die tryptische Proteolyse wurden die getrockneten Gelstücke mit 30 μl Trypsin-Puffer bedeckt und 30 min auf Eis inkubiert. Falls nötig, wurde nochmals Trypsin-Puffer zugegeben, um die Gelstücke vollständig zu bedecken. Anschließend wurden 15 μl 25 mM NH_4HCO_3 zugegeben und nach weiteren 45 min auf Eis wurde der Ansatz 15 h bei 37 °C inkubiert.

Die Peptide wurden durch Zugabe des gleichen Volumens (ca. 15 µl) 1 % Trifluoressigsäure und Inkubation bei RT für 2 h extrahiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, anschließend wurden die Gelstücke mit 15 µl 50 % Acetonitril 1% Trifluoressigsäure bedeckt und 1 h bei RT ein zweites Mal extrahiert. Die Überstände der ersten und zweiten Extraktion wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge für 1 h getrocknet. Anschließend wurden die extrahierten Peptide in 20 µl 5 % Acetonitril 0,1 % Trifluoressigsäure aufgenommen, gevortext, 1 min im Ultraschallbad behandelt und für 10 min bei 30 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über ZipTipC18 Pipettenspitzen nach Angaben des Herstellers. (Millipore). Durch jeweils dreimaliges Auf- und Abpipettieren in 50 % Acetonitril und anschließend 0,1 % Trifluoressigsäure wurde das Säulenmaterial äquilibriert. Die Probe wurde durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren auf die Säule geladen, anschließend wurde drei Mal in 0,1 % Trifluoressigsäure gewaschen und die Peptide wurden in 2 µl 50 % Acetonitril in ein frisches 0,5 ml Low-Bind Reaktionsgefäß eluiert. Von den so vorbereiteten Proben wurden jeweils 1 µl auf einen vorbeschichteten MALDI-Probenträger (*prespotted anchor chip*, Bruker Daltonik) aufgebracht und nach 5 min Inkubation gewaschen und getrocknet. Die monoisotopischen Molekülmassen wurden in einem ultraflex II TOF/TOF 200 Massenspektrometer (Bruker Daltonik) gemessen. Die Massen wurden im Bereich von 700 – 4000 Da im Reflektor Modus gemessen. Die Proteine wurden über Suche mit MASCOT identifiziert, als Datenbanken wurden die translatierten ORFs des Assembly 19 bzw. Assembly 21 von *C. albicans* verwendet

Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinen gewählt. Variable Modifikation war die Oxidation von Methioninen. Um die Detektion von Peptiden der V5/His₆-Epitope zu gewährleisten wurden die entsprechenden Peptide außerdem durch Vergleich mit der Sequenz des Tup1 V5/His₆ Fusionsproteins zugeordnet. Zur Identifikation von *p*-Aminophenylalanin wurde *p*-Aminophenylalanin als variable Modifikation von Leucin 63 in CaTup1p gewählt.

2.9 Datenbanken und Datenverarbeitung

- Die verwendeten Gen- und Proteinsequenzen sowie die *codon usage* Tabelle für *C. albicans* entstammen der Candida Genome Database (CGD) (<http://www.candidagenome.org/>). Gensequenzen anderer Spezies wurden der

Datenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) entnommen. Proteinsequenzen anderer Spezies entstammen der Datenbank Universal Protein Resource (UniProt) (<http://www.uniprot.org/>).

- Die in dieser Arbeit verwendeten Kristallstrukturen von Proteinen entstammen der Proteindatenbank Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Farbliche Änderungen oder Visualisierungen von Aminosäuren wurden mit der Protein Workshop Software von PDB durchgeführt.
- Homologievergleiche zweier Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).
- Homologievergleiche mehrerer Sequenzen erfolgten mittels des Programmes „ClustalOmega“ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).
- Auswertung von Proteinsequenzen zur Ermittlung von Molekulargewicht oder isoelektrischen Punkts erfolgte mit dem Programm „Compute pI/Mw tool“ (http://web.expasy.org/compute_pi/).
- Die Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich geeigneter Oligonukleotidsequenzen für die PCR sowie die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe der Primer3 Software des Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).
- DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Clone Manager 9 Software (Scientific & Educational Software) visualisiert, virtuell geschnitten und kloniert.
- DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt.
- Speziell für einzelne Methoden verwendete Programme und Datenbanken sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

ERGEBNISSE

Insbesondere in dem klinisch relevanten humanpathogenen Pilz *C. albicans* fehlen Methoden zur Analyse direkter Protein-Protein Interaktionen *in vivo*. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Methode des erweiterten genetischen Codes zum Einbau synthetischer Aminosäuren in Proteine ausgehend von dem für *S. cerevisiae* verfügbaren System für *C. albicans* etabliert und optimiert werden. Ziel war somit, auch in *C. albicans* eine Analyse von Interaktionen vermittelt durch den Einbau einer synthetischen Photocrosslinker-Aminosäure in Zielproteine zu ermöglichen und dadurch die Interaktionen von beispielsweise wichtigen Virulenzfaktoren in der Zelle gezielt zu bestimmten Zeitpunkten *in vivo* zu untersuchen. Zunächst sollten unter Berücksichtigung der molekularen Besonderheiten von *C. albicans* die einzelnen Komponenten, *EcTyr*tRNA_{CUA} und AzF-RS, in *C. albicans* heterolog exprimiert werden. Sofern nötig und durchführbar, sollte die Expression darüber hinaus optimiert werden, um einen bestmöglichen Einbau von AzF in mutante Zielproteine in *C. albicans* zu erhalten. *EcTyr*tRNA_{CUA} und AzF-RS sollten in diesem Zusammenhang auch hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. An den Modellproteinen Tsa1p und Tup1p sollte für verschiedene, an Interaktionen beteiligten Positionen der positionsspezifische Einbau von AzF *in vivo* gezeigt werden und nach Möglichkeit auch die kovalente Kreuzvernetzung zu interagierenden Proteinen *in vivo*. Die Identität solcher möglichen Interaktionspartner sollte durch massenspektrometrische Verfahren aufgeklärt werden (Abb. 5).

1. Etablierung und Optimierung der *EcTyr*tRNA_{CUA} Expression

1.1 Polymerase III-regulatorische Sequenzen

Die Transkription von RNA Genen ist in Eukaryoten grundsätzlich in drei Klassen eingeteilt: die Gene der 5,8 S, 18 S und 26 S bzw. 28 S rRNA werden von der RNA-Polymerase I (Pol I) transkribiert, proteinkodierende Gene werden von RNA-Polymerase II (Pol II) in mRNAs transkribiert und Gene der 5 S rRNA, tRNAs und einiger snRNAs werden von RNA-Polymerase III (Pol III) transkribiert [Sentenac, A 1985].

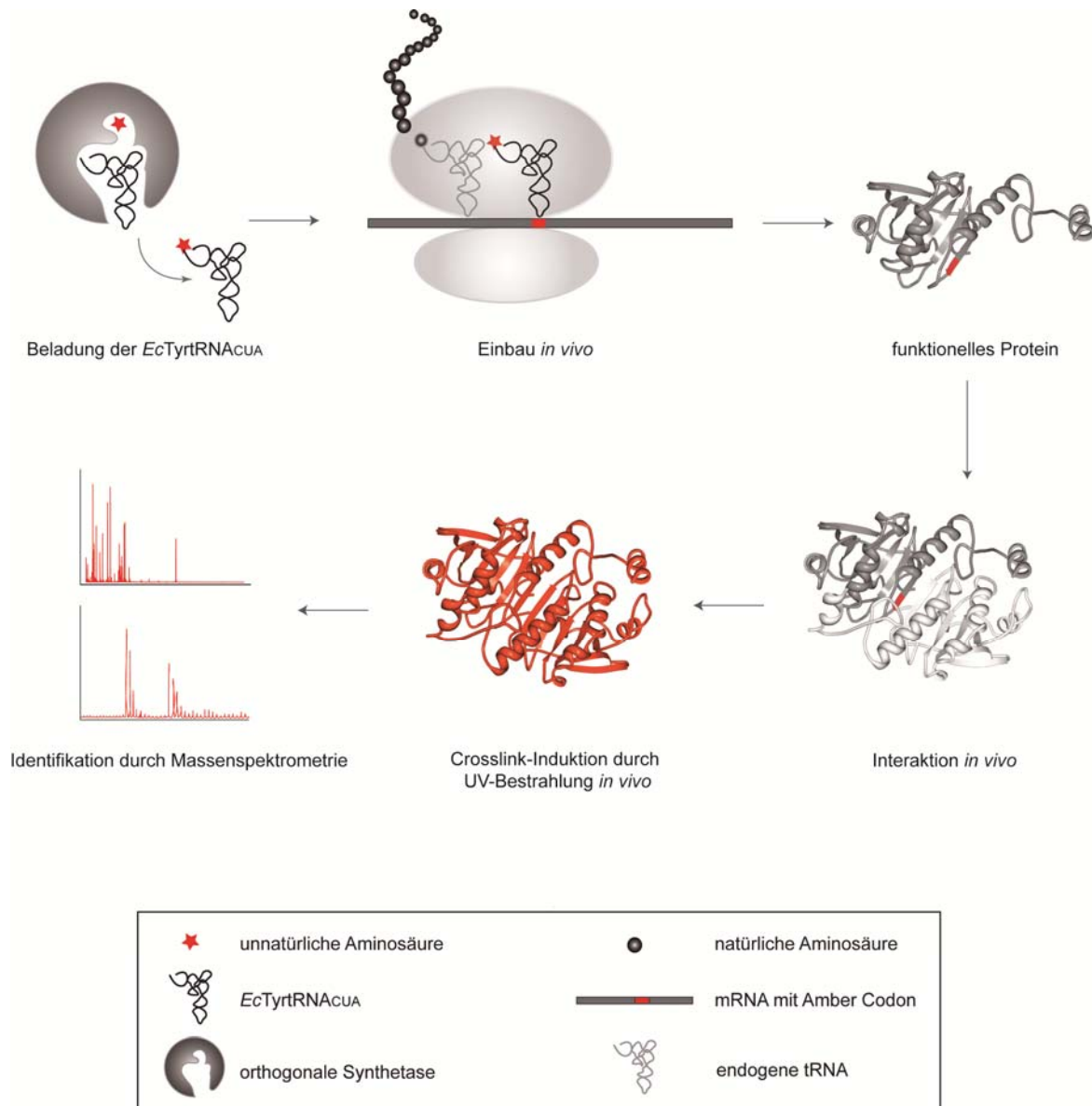


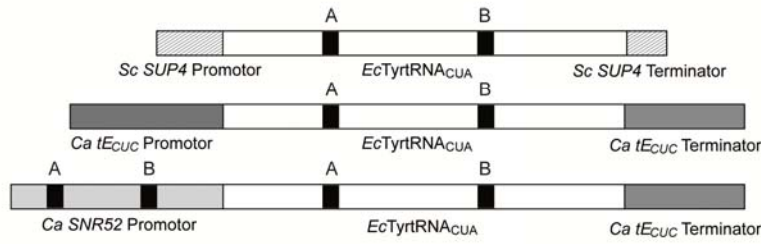
Abb. 5 Strategie zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen mit dem erweiterten genetischen Code. Durch heterologe Expression der *EcTyr*tRNA_{CUA} und der AzF-RS wird die Inkorporation von AzF in Proteine *in vivo* ermöglicht. Interagiert das nur in einer Aminosäure modifizierte Protein *in vivo* mit anderen Proteinen, kann die Interaktion durch Crosslink-Induktion mit UV-Licht kovalent verbunden werden. Somit ist der Protein-Protein Komplex stabil für weitere Aufreinigungs- und Detektionsschritte, z. B. mit massenspektrometrischen Verfahren.

Während bei Pol II-transkribierten Genen die regulatorischen Sequenzen außerhalb des reifen Transkriptes liegen, weisen Pol III-transkribierte Gene in der Regel interne regulatorische Sequenzen auf, die sogenannten A- und B-Boxen [Galli, G *et al.* 1981, Ciliberto, G *et al.* 1983]. Für die Transkriptionsinitiation bindet zunächst TFIIC und dann TFIIB an die DNA und beide rekrutieren Pol III [Schramm, L *et al.* 2002]. Kritisch für die Bindung von TFIIC ist dabei vor allem die Sequenz der B-Box [Baker, RE *et al.* 1986]. Da zumindest bei den tRNAs ein Zusammenhang zwischen der Promotor-

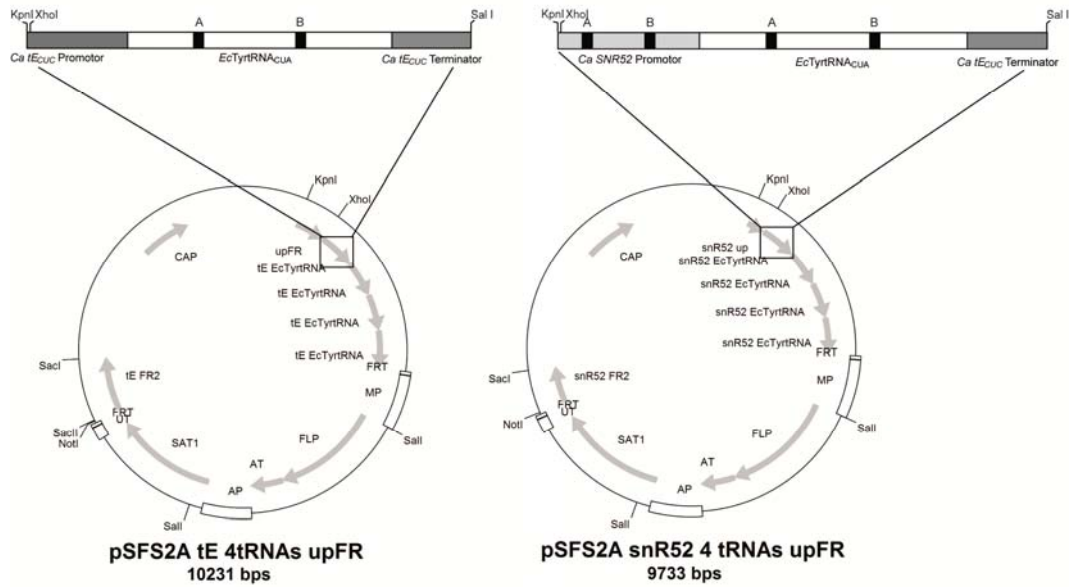
sequenz und der Tertiärstruktur vorliegt, sind Bereiche dieser A- und B-Boxen über alle Reiche, Prokaryoten und Eukaryoten, hinweg konserviert [Marck, C *et al.* 2002]. Für die heterologe Expression von tRNA-Genen bedeutet dies, dass in einigen Fällen die internen A- und B-Boxen ausreichend konserviert sind, um eine Transkriptionsinitiation im Zielorganismus zu vermitteln [Edwards, H *et al.* 1990, Chen, S *et al.* 2007]. Die Termination der Pol III-Transkription ist im Vergleich zur Initiation nicht stringent sequenzabhängig, ein T-reicher Abschnitt ist für die Termination ausreichend [Braglia, P *et al.* 2005].

Für die Expression der *EcTyr*tRNA_{CUA} in *C. albicans* wurde daher zunächst überprüft, ob, wie in *S. cerevisiae*, allein die internen A- und B-Boxen zur Transkriptionsinitiation ausreichend sind bzw. ob die Kombination mit der *S. cerevisiae* SUP4 Sequenz zu transkribierter *EcTyr*tRNA_{CUA} führt (Abb. 6A und Abb. 6C). Da für Hefen teilweise auch eine Regulation der Transkription durch Promotorelemente upstream der Sequenz stattfinden kann [Dieci, G *et al.* 2000, Giuliadori, S *et al.* 2003], wurden zur heterologen Expression der *EcTyr*tRNA_{CUA} in *C. albicans* zwei verschiedene upstream Sequenzen verwendet. Es wurde eine Sequenz upstream eines *C. albicans* tRNA Gens vor die *EcTyr*tRNA_{CUA} kloniert (Abb. 6A). Dazu wurde das Gen für die Glutaminsäure tRNA mit CUC Anticodon (*tE(CUC)1*) gewählt. Dieses Gen liegt in nur einer Kopie im *C. albicans* Genom vor [Marck, C *et al.* 2006] und das GAG Codon wird von den beiden für Glutaminsäure codierenden Codons zwar nicht am häufigsten verwendet, aber zumindest zu 21 % (*C. albicans* Codon Usage Table). Dies spricht für eine relative starke Transkription des *tE(CUC)1* Gens, um ausreichende Mengen tRNA für eine effiziente Translation zu synthetisieren. Als zweite regulatorische Sequenz wurde die upstream Sequenz des *SNR52* Gens verwendet (Abb. 6A). Das *SNR52* Gen gehört ebenfalls zu den Pol III transkribierten Genen und sein Produkt ist eine nicht-kodierende (*non-coding*, nc) kleine nukleoläre (*small nucleolar*, sno) RNA, die in der rRNA Modifizierung involviert ist. Eine Besonderheit des *SNR52* Gens ist, dass im Gegensatz zu den tRNA Genen die für die Transkriptionsinitiation benötigten A- und B-Box Elemente upstream der snoRNA codierenden Sequenz und außerhalb des reifen Transkripts lokalisiert sind [Harismendy, O *et al.* 2003, Roberts, DN *et al.* 2003] (Abb. 6A).

A



B



C

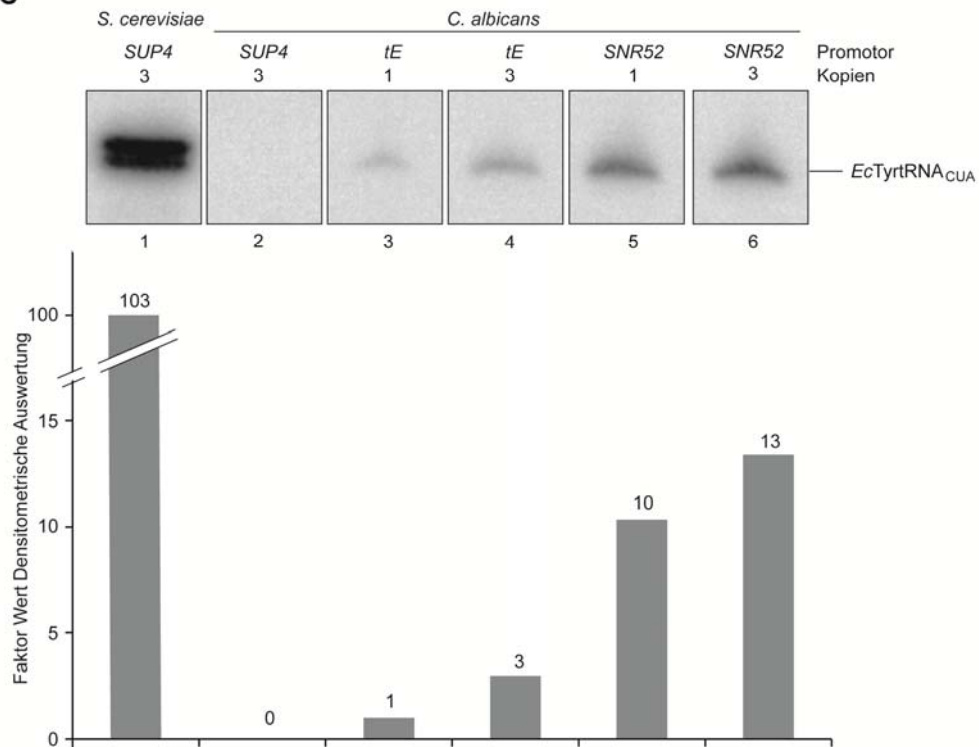


Abb. 6 Expression und Optimierung der *EcTyrtrRNA_{CUA}*. (A) Schematische Darstellung der *EcTyrtrRNA_{CUA}*, sowie der zur heterologen Expression verwendeten regulatorischen Sequenzen. Aus *S. cerevisiae* wurden die *SUP4* flankierenden Sequenzen (*Sc SUP4*) verwendet, aus *C. albicans* die flankierenden Regionen der Glutaminsäure-tDNA (*Ca tE_{CUC}*), sowie die upstream flankierende Region des *SNR52* Gens (*Ca SNR52*). A- und B-Boxen sind als schwarze Balken dargestellt. (B) Darstellung der Klonierungsstrategie zur mehrfachen Integration der *EcTyrtrRNA_{CUA}* Expressionskassetten in den Transformationsvektor. Die Kasette wird über die *KpnI/SalI* Schnittstellen in den *KpnI/XhoI* geschnittenen Vektor kloniert. Durch eine im Insert enthaltene *XhoI* Schnittstelle können durch Wiederholung dieser Schritte mehrere Kassetten hintereinander kloniert werden. (C) Northern Blot sowie densitometrische Auswertung des Northern Blots zur Quantifizierung der heterologen *EcTyrtrRNA_{CUA}* Expression. Die *EcTyrtrRNA_{CUA}* wurde mit verschiedenen regulatorischen Sequenzen (*Sc SUP4*, *Ca tE_{CUC}*, *Ca SNR52*) sowie in einer bzw. drei Kopien chromosomal integriert. In *S. cerevisiae* Stamm MBS1 (Positivkontrolle) wurde die tRNA von einem 2 μ Plasmid exprimiert, hier wurden 1 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Für *C. albicans* Proben wurden jeweils 20 μ g RNA aufgetragen. Die densitometrische Auswertung wurde auf die Transkriptmengen unter *tE_{CUC}* Regulation in einer Kopie normiert. Die oberhalb der Balken dargestellten Zahlen sind somit das Vielfache der hier gemessenen Intensität.

Eine Fusion der *SNR52* upstream Sequenz mit einem heterologen tRNA Gen zur Expression in *S. cerevisiae* ist bereits erfolgreich beschrieben worden [Wang, Q *et al.* 2008, Hancock, SM *et al.* 2010]. Für die Transkription der *EcTyrtrRNA_{CUA}* unter *SUP4* Regulation wurden die drei tRNAs von *S. cerevisiae SUP4* regulatorischen Sequenzen flankiert mit dem *PGK1* Promotor aus Plasmid pAR3-PGK1 + 3 *SUP4* tRNA_{CUA} [Chen, S *et al.* 2007] ausgeschnitten und in Plasmid pSFS2A tA FR1 FR2 kloniert, zur chromosomalen Integration am *tA(AGC)3* Genlocus. Zur Expression der *EcTyrtrRNA_{CUA}* mit *C. albicans tE(CUC)1* regulatorischen Sequenzen wurden 250 bp upstream der *tE(CUC)1* Sequenz und 100 bp downstream flankierend mit der *EcTyrtrRNA_{CUA}* Sequenz in Plasmid pUC 57 tE tRNA synthetisiert (GenScript, USA). Zur chromosomalen Integration am *tE(CUC)1* Genlocus wurde dieses Insert in Vektor pSFS2A tE FR2 kloniert. Da die regulatorischen Sequenzen für die Transkriptionstermination von Pol III Genen in der Regel keine hohe Sequenzspezifität aufweisen, wurde für die Klonierung mit der *SNR52* upstream Region (220 bp) die *tE(CUC)1* downstream Region als Terminationssequenz hinter der *EcTyrtrRNA_{CUA}* belassen. In Abb. 6A ist der schematische Aufbau der zur tRNA Expression verwendeten Konstrukte dargestellt.

1.2 Kopienzahl der *EcTyrtrRNA_{CUA}*

Neben den regulatorischen Sequenzen hat vor allem auch die Anzahl der tRNA Gene im Genom direkten Einfluss auf die Abundanz der reifen tRNA in der Zelle. In

C. albicans reicht die Häufigkeit der tRNA Gene von einer Kopie (z.B. *tS(CAG)*) bis hin zu 7 Genkopien (z.B. *tA(AGC)*) [Marck, C *et al.* 2006]. Um diesen Faktor zu berücksichtigen, wurden Konstrukte für die Integration der tRNA unter der jeweiligen regulatorischen Sequenz in unterschiedlichen Kopienzahlen im Genom hergestellt (Abb. 6). Für die Erhöhung der Kopienzahl wurden die Inserts mit *KpnI/XhoI* und *SaII* Überhängen in aufeinanderfolgenden Schritten in die Plasmide pSFS2A *tE* 1 tRNA und pSFS2A *snR52* 1 tRNA kloniert, bis eine Kopienzahl von vier Inserts erreicht war (Abb. 6B).

Die so erhaltenen Konstrukte mit unterschiedlichen regulatorischen Sequenzen und Kopienzahlen wurden chromosomal in die jeweiligen *C. albicans* Genloci integriert. Die Detektion der *EcTyrtrRNA_{CUA}* in der Gesamt-RNA mit einer komplementären DNA-Sonde im Northern Blot zeigte, dass eine Transkription der *EcTyrtrRNA_{CUA}* mit *S. cerevisiae SUP4* regulatorischen Sequenzen nicht nachweisbar war (Abb. 6C, Spur 2). Dies lässt auch den indirekten Rückschluss zu, dass im Gegensatz zu *S. cerevisiae* [Chen, S *et al.* 2007] für eine Transkription in *C. albicans* die Konservierung der internen A- und B-Boxen aus *E. coli* nicht ausreichend ist, obwohl der Vergleich mit Hefe-Konsensussequenzen eine teilweise Konservierung der A-Box und eine vollständige Konservierung der B-Box zeigte [Edwards, H *et al.* 1990]. Die Fusion mit *tE(CUC)1* regulatorischen Sequenzen führte zur Transkription der *EcTyrtrRNA_{CUA}* (Abb. 6C, Spur 3), durch Erhöhung der Kopienzahl auf drei stieg auch die Menge an Transkript in der Gesamt-RNA um den Faktor drei (Abb. 6C, Spur 4). Im Vergleich zur *tE* Promotorsequenz war die Transkription der *EcTyrtrRNA_{CUA}* unter Regulation der *SNR52* upstream Sequenz etwa um den Faktor 10 erhöht (Abb. 6C, Spur 5). Bei drei Kopien des Konstruktes im Genom war die Menge an *EcTyrtrRNA_{CUA}* Transkript in der Gesamt RNA zwar erhöht (Abb. 6C, Spur 6), hier war aber kein linearer Anstieg um den Faktor drei in der densitometrischen Auswertung messbar. Möglicherweise lag die reife tRNA in der Zelle bereits in Sättigung vor. Die *EcTyrtrRNA_{CUA}* Menge war in *S. cerevisiae* Stamm MBS 1 um den Faktor 103 höher, verglichen mit Expression in *C. albicans* unter *tE(CUC)1* regulatorischer Sequenz und in 1 Kopie (Abb. 6C). Da von *S. cerevisiae* Gesamt-RNA 1 µg aufgetragen wurden und von *C. albicans* Stämmen Gesamt-RNA 20 µg aufgetragen wurden ist der Faktor an transkribierter *EcTyrtrRNA_{CUA}* in *S. cerevisiae* ca. 2000-fach höher als unter *tE_{CUC}* Regulation in einer Kopie in *C. albicans*. Dies ist vor allem auf die Expression der

EcTyrRNA_{CUA} von einem 2 μ Plasmid in *S. cerevisiae* zurückzuführen, das in sehr hohen Kopienzahlen in der Zelle vorliegen kann (50 - 100 Kopien) [Zakian, VA *et al.* 1979]. Im Gegensatz dazu steht die chromosomale Integration der *EcTyrRNA_{CUA}*, die nur in geringen Kopienzahlen möglich ist, da in *C. albicans* stabile Plasmidsysteme für die Genexpression fehlen [Kurtz, MB *et al.* 1987, Cannon, RD *et al.* 1992, Pla, J *et al.* 1995]. Die Transkription der natürlichen Glutaminsäure-tRNA war vergleichbar mit den Transkriptmengen, die unter Regulation der *tE(CUC)1* upstream Region für die *EcTyrRNA_{CUA}* erhalten wurde (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich für die heterologe *EcTyrRNA_{CUA}* Expression festhalten, dass sich durch Kombination geeigneter Pol III-regulatorischer Sequenzen sowie einer Erhöhung der Kopienzahl des tRNA Gens eine für *C. albicans* signifikante Transkription erzielen ließ. Für weitere Arbeiten wurde die *EcTyrRNA_{CUA}* daher unter *SNR52* Regulation in vier Kopien in das Genom integriert.

2. Etablierung und Optimierung der Expression der AzF-tRNA-Synthetase

2.1 Transkription der tRNA-Synthetase für *p*-Azidophenylalanin

Die Transkription der heterologen tRNA-Synthetase für *p*-Azidophenylalanin (AzF-RS) erfolgt in dem von Schultz und Mitarbeitern für *S. cerevisiae* etablierten System von einem 2 μ Plasmid unter Regulation des konstitutiven *ADH1* Promotors (pAR3-PGK1 + 3 SUP4 tRNA_{CUA}) [Chen, S *et al.* 2007]. Da regulatorische Sequenzen in der Regel zwischen Spezies wenig konserviert sind, ist für eine Transkription in *C. albicans* eine *C. albicans*-spezifische Promotorsequenz upstream des AzF-RS Gens notwendig. Um eine konstitutive, starke Transkription zu erreichen, wurden die regulatorischen Sequenzen des Aktin-Gens *ACT1* upstream und downstream der AzF-RS kloniert (Abb. 7A). Fusioniert mit dem *open reading frame* (ORF) der AzF-RS war in dem ursprünglich zur Verfügung gestellten Plasmid ein 6-fach Histidin-Epitop (His₆-Tag) zur erleichterten Detektion des Proteins im Western Blot vorhanden.

2.2 Codon Usage

Ein weiterer Faktor bei der Expression heterologer Gene ist die spezies-spezifische Codon Usage [Grantham, R *et al.* 1981]. Die Codon Usage einer Spezies ergibt sich aus der Frequenz synonymen Codons in proteincodierenden Genen. Sie korreliert dabei mit der Abundanz der für die Aminosäure kognaten tRNA. Eine akzeptierte Hypothese in diesem Zusammenhang ist, dass die Codon Usage ein Mechanismus zur Regulation der Translationseffizienz ist, so dass für grundlegende zelluläre Prozesse benötigte Proteine in ihrer Gensequenz eine optimalere Codon Usage aufweisen als selten benötigte Proteine. Abweichend von dem universellen genetischen Code wird in *C. albicans* das Leucin-codierende Codon CUG aberrant überwiegend als Serin translatiert [Santos, MA *et al.* 1995]. Da die tRNA-Synthetase mit Spezifität für *p*-Azidophenylalanin ursprünglich aus einer *E. coli* Tyrosyl-tRNA-Synthetase durch Mutagenese von Aminosäuren des aktiven Zentrums für Substratspezifität generiert wurde [Chin, JW *et al.* 2003a], weist das Gen aufgrund der unterschiedlichen Codon Usage in *E. coli* 29 CUG Codons auf (Abb. 7B). Um eine korrekt translatierte Aminosäuresequenz zu gewährleisten, wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit [Palzer, S 2008] die 29 enthaltenen CUG Codons zu Leucin-codierenden UUG Codons mutagenisiert. Nach chromosomaler Integration der so optimierten AzF-RS in den *C. albicans* Stamm SC5314 konnte über quantitative RT-PCR (qRT-PCR) zwar die Transkription der AzF-RS detektiert werden, eine Detektion des Proteins war jedoch nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Da die Codon Usage des AzF-RS Gens nach wie vor stark zu der für *C. albicans* optimalen Codon Usage abwich, wurde die AzF-RS Gensequenz *in silico* vollständig für die Translation in *C. albicans* codon-optimiert (Abb. 7B) und mit einem C-terminal fusioniertem V5-Epitop synthetisiert (GenScript, USA). Die vollständige Codon-Optimierung führte nach Integration im *ACT1* Locus von *C. albicans* zu einer im Western Blot detektierbaren Expression der AzF-RS (Abb. 7C).

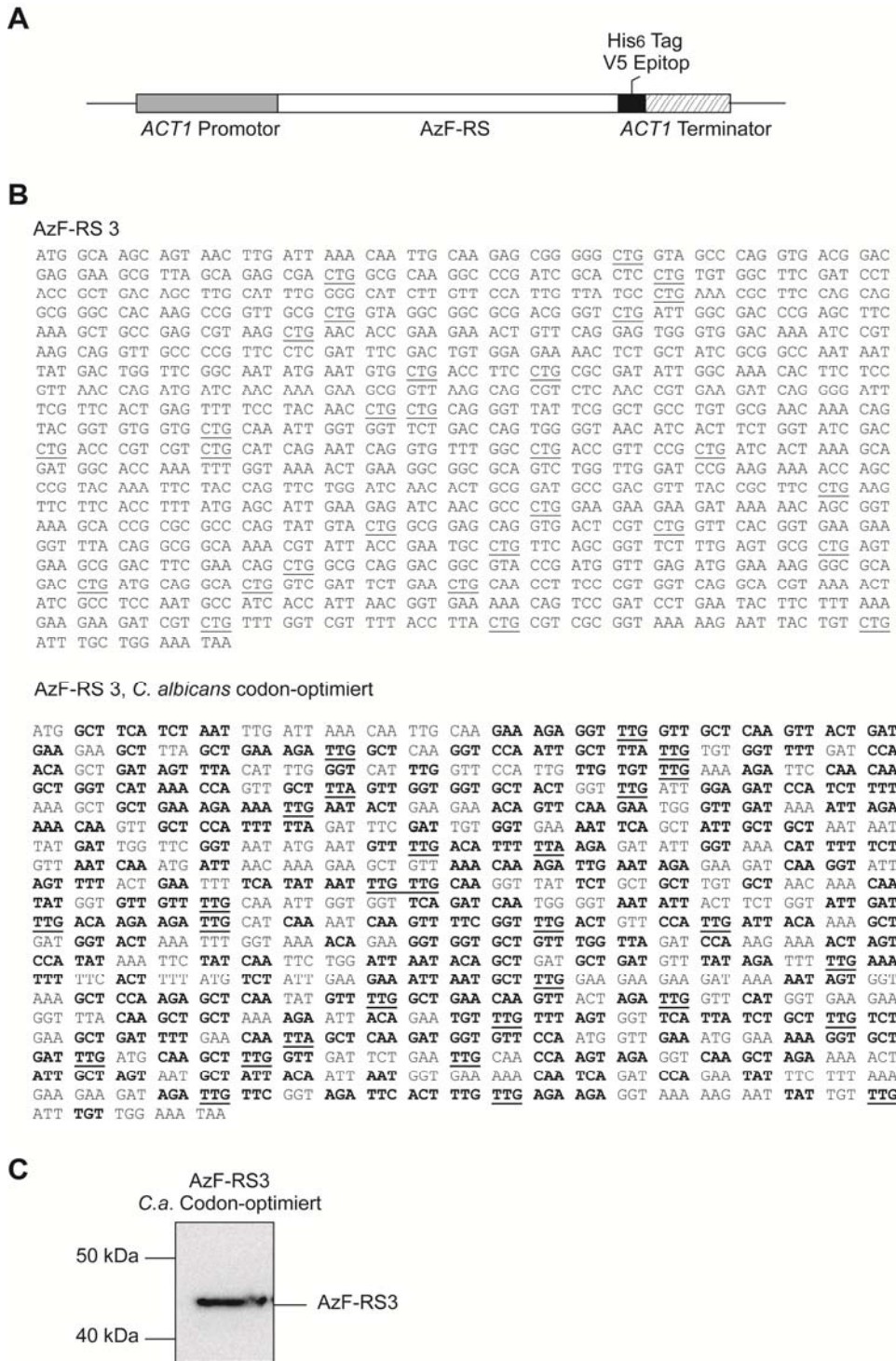


Abb. 7 Expression und Optimierung der AzF-RS. (A) Schematische Darstellung der chromosomalen Integration der AzF-RS. C-terminal war ein His₆-Tag fusioniert, bei der vollständig codon-optimierten Variante wurde dieser durch ein V5-Epitop ersetzt und für die Ausgangsstämme zur Expression mutanter Proteine entfernt. (B) DNA-Sequenz der ursprünglich für heterologe Expression in *S. cerevisiae* optimierten AzF-RS (AzF-RS 3) und der vollständig für die Codon Usage in *C. albicans* optimierten AzF-RS. Die 29 CTG/CUG Codons, die in der optimierten Variante durch TTG/UUG Codons ersetzt wurden, sind unterstrichen. Alle weiteren optimierten Codons sind fett gedruckt. (C) Western Blot der *C. albicans* codon-optimierten AzF-RS. Die Detektion erfolgte mit dem anti-V5 Antikörper.

3. Funktionalität des orthogonalen Pärchens in *C. albicans*

3.1 AzF-RS Varianten

Neben der hier bereits beschriebenen AzF-RS Variante 3 wurden bei der Etablierung des genetischen Codes in *S. cerevisiae* durch Screening einer Bibliothek mutagenisierter *E. coli* Tyrosyl-tRNA-Synthetasen fünf weitere Varianten mit Substrataffinität für AzF beschrieben [Chin, JW *et al.* 2003a]. Diese Varianten unterscheiden sich im Vergleich zu Variante 3 in einer bis allen der insgesamt fünf mutagenisierten Aminosäuren der Substrataffinität-vermittelnden Tasche der tRNA Synthetase (Tabelle 24).

Aminosäure	37	126	182	183	186
AzF-RS 3	Leu	Asn	Ser	Ala	Ala
AzF-RS 1	Leu	Asn	Ser	Met	Ala
AzF-RS 2	Val	Asn	Ser	Ala	Ala
AzF-RS 4	Val	Asn	Ser	Ala	Val
AzF-RS 5	Ile	Asp	Asn	Phe	Val
AzF-RS 6	Thr	Asn	Ser	Ala	Leu

Tabelle 24 Aminosäuren des aktiven Zentrums der AzF-RS Varianten. Nach Chin *et al.* [Chin, JW *et al.* 2003a]. Aminosäuren, die sich von der ursprünglich verwendeten AzF-RS Variante 3 unterscheiden, sind fett gedruckt.

Um eine möglichst hohe Suppressions-Rate des Amber Codons in mutanten Proteinen zu erhalten, sollte in weiteren Experimenten überprüft werden, welche der Varianten die höchste Beladungs-Effizienz der *EcTyrtrRNA_{CUA}* in *C. albicans* erreicht. Ausgehend von der für die Codon Usage von *C. albicans* optimierten AzF-RS 3 wurden alle weiteren Varianten durch PCR-basierte Mutagenese der Codons des aktiven Zentrums hergestellt und chromosomal in Stämme integriert, die bereits die *EcTyrtrRNA_{CUA}* unter *SNR52* Regulation in vier Kopien enthielten (FKC3).

3.2 Beladung der *EcTyrtrRNA_{CUA}* in *C. albicans*

Durch erfolgreiche Anpassung und Optimierung der Komponenten konnte eine heterologe Expression von *EcTyrtrRNA_{CUA}* und AzF-RS in *C. albicans* erreicht werden. Für die Suppression des Amber Codons in mutanten Proteinen ist jedoch auch ein spezifisches, funktionelles Interagieren von *EcTyrtrRNA_{CUA}* und AzF-RS nötig. Zur

Überprüfung, ob das orthogonale Pärchen aus tRNA und AzF-RS in *C. albicans* tatsächlich interagiert, wurde das Verhältnis aminoacylierter zu nicht aminoacylierter tRNA in der Zelle in einer sauren Harnstoff Polyacrylamid Gelelektrophorese bestimmt (*acid urea PAGE, AUP* [Kohrer, C *et al.* 2008]). Durch RNA-Isolation bei saurem pH bleibt die Ester-Bindung zwischen Aminosäure und tRNA der aminoacylierten tRNAs erhalten. Durch elektrophoretische Auftrennung im Gel und Northern Blot mit tRNA-spezifischen Sonden können aminoacylierte von nicht aminoacylierten tRNAs unterschieden werden.

In Abb. 8 ist das Ergebnis der AUP gezeigt. Ausgehend von *S. cerevisiae* Stamm MBS1 ist für die Beladung in *S. cerevisiae* in Abwesenheit von AzF (Spur 1) nur ein geringer Anteil der tRNA mit natürlichen Aminosäuren beladen (8,8 %), in Anwesenheit von AzF (Spur 2) liegen 44,8 % der *EcTyrtrRNA*_{CUA} aminoacyliert vor. Wird die AzF-RS 3 in der codon-optimierten Form in *C. albicans* exprimiert, sind die Ergebnisse vergleichbar. In Abwesenheit von AzF (Spur 3) werden 12,2 % der *EcTyrtrRNA*_{CUA}, in Anwesenheit von AzF (Spur 4) 41,6 % der *EcTyrtrRNA*_{CUA} aminoacyliert. Verglichen mit AzF-RS 3 zeigen die AzF-RS Varianten 2, 5 und 6 ähnliche Beladungseffizienzen in Anwesenheit von AzF (etwa 31 – 54 %). Dies gilt auch für die unspezifische Beladung in Abwesenheit von AzF (etwa 13 – 18 %). Deutliche Abweichungen davon sind für AzF-RS 1 und AzF-RS 4 zu beobachten. AzF-RS1 zeigt in Anwesenheit von AzF eine deutlich verbesserte Beladungseffizienz der *EcTyrtrRNA*_{CUA} von 61,5 % (Spur 6). Für AzF-RS 4 ist hingegen keine spezifische Aktivität detektierbar, da die Beladungseffizienzen sich in An- und Abwesenheit von AzF kaum unterscheiden (20,9 % und 22,4 %, Spuren 9 und 10).

Für die analysierte *EcTyrtrRNA*_{CUA} ist sowohl in *S. cerevisiae* wie auch in *C. albicans* eine Beladung in Abwesenheit von AzF beobachtet worden (Abb. 8 Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13). Dies kann entweder darauf hindeuten, dass die AzF-RS Varianten auch Substrataffinität für eine oder mehrere natürliche Aminosäure zeigen, oder dass die *EcTyrtrRNA*_{CUA} von endogenen aaRS mit der synthetischen Aminosäure oder mit natürlichen Aminosäuren fehlbeladen wird.

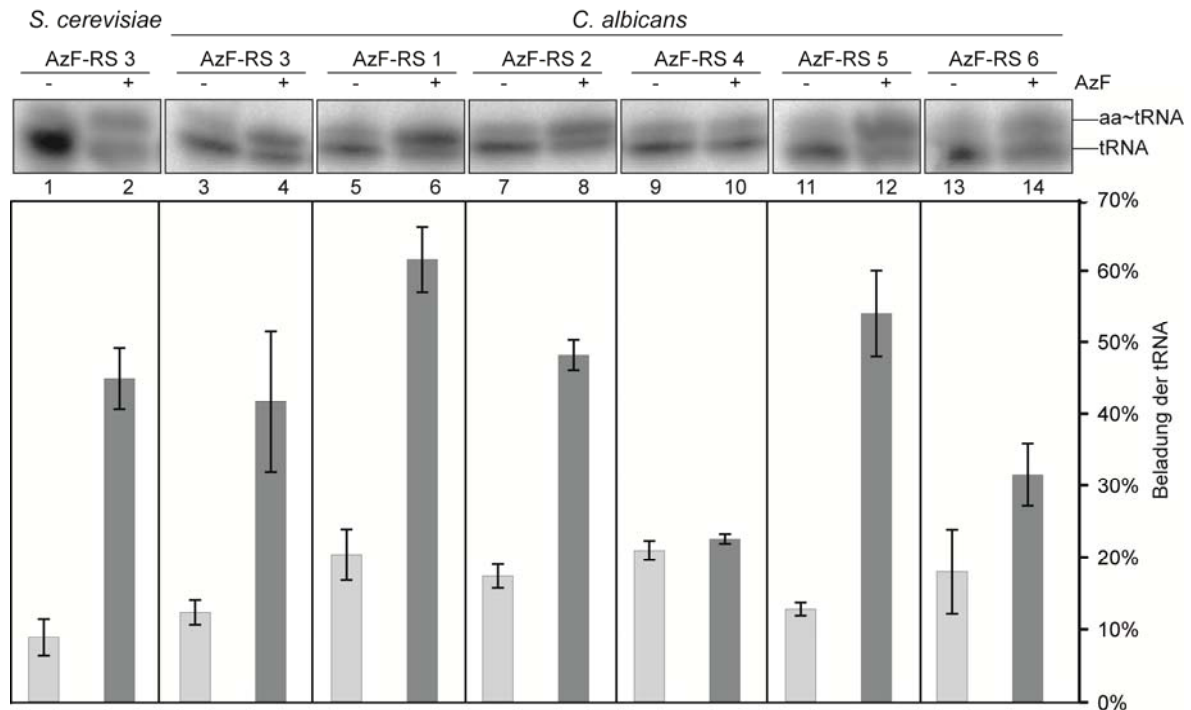


Abb. 8 Aminoacylierung der *EcTyr*tRNA_{CUA} in Abhängigkeit der AzF-RS Varianten (n=3). Die Beladungseffizienz der AzF-RS Varianten wurde mittels AUP und densitometrischer Auswertung der Northern Blots ermittelt. Die Stämme MBS1 und FKC22 - FKC27 wurden in mit AzF supplementiertem (+) oder nicht supplementiertem (-) Medium kultiviert. Die obere Bande entspricht beladener *EcTyr*tRNA_{CUA} (aa~tRNA), unbeladene *EcTyr*tRNA_{CUA} (tRNA) migriert darunter.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die *EcTyr*tRNA_{CUA} in Abwesenheit einer funktionellen AzF-RS in *C. albicans* exprimiert und die Beladung der tRNA wurde ebenfalls mittels AUP und Northern Blot überprüft (Abb. 9). Wie für die Stämme mit AzF-RS beobachtet, findet auch hier eine Beladung der *EcTyr*tRNA_{CUA} statt (Abb. 9, Spuren 1 und 2), die durch Deacetylierung der Probe vollständig verschwindet (Abb. 9, Spur 3). In Abwesenheit einer funktionellen AzF-RS deutet dies auf eine Fehlbeladung durch endogene aaRS hin. Da die Beladung unabhängig von der Supplementation des Mediums mit AzF ist, findet die Fehlbeladung mit einer oder mehreren natürlichen Aminosäuren statt.

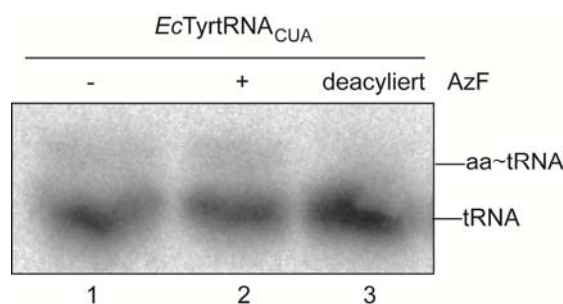


Abb. 9 Aminoacylierung der *Ec*TyrtRNA_{CUA} in Abwesenheit einer AzF-RS. Der Stamm SPC7 (ohne eine funktionelle AzF-RS) wurde in Medium mit und ohne Supplementation von AzF (+ oder -) inkubiert, die tRNAs wurden unter sauren Bedingungen isoliert und die Probe in Anwesenheit von AzF wurde halbiert und ein Aliquot wurde einer Deacetylierungsreaktion unterzogen (deacetyliert). Die untere Bande entspricht unbeladener *Ec*TyrtRNA_{CUA} (tRNA), die obere Bande entspricht aminoacylierter *Ec*TyrtRNA_{CUA} (aa~tRNA).

Die Ergebnisse aus den Beladungsexperimenten deuten darauf hin, dass das orthogonale Pärchen aus *Ec*TyrtRNA_{CUA} und AzF-RS in *C. albicans* funktionell ist, da in Anwesenheit von AzF bei allen Varianten, bis auf Variante 4, eine spezifische Aminoacylierung der *Ec*TyrtRNA_{CUA} mit AzF stattfindet. Daraus lässt sich auch schließen, dass die synthetische Aminosäure AzF in *C. albicans* effizient aufgenommen wird und im Cytosol zur Beladung der tRNA zur Verfügung steht. Die Effizienz der Aminoacylierung ist abhängig von den Aminosäuren des Substrataffinitätszentrums der verschiedenen Varianten und dementsprechend variierend zwischen den untersuchten Varianten.

3.3 Quantifizierung der Translation mit yeGFP

Weiterhin wurde, um den Effekt der tRNA-Beladung auf die Translation eines Zielproteins überprüfen und quantifizieren zu können, *GFP* (*green fluorescent protein*) als Reporter verwendet. Durch Einfügen eines Amber Codons im ORF von *GFP* kann die Effizienz der Interaktion zwischen AzF-RS und *Ec*TyrtRNA_{CUA} anhand der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden, da die Menge an translatiertem Protein direkt mit der verfügbaren Menge aminoacylierter tRNA korreliert (Abb. 10A). *GFP*, ursprünglich ein Protein aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*, absorbiert Licht der Wellenlänge 395 nm und 470 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 510 nm [Morise, H *et al.* 1974]. Die Möglichkeit, *GFP* heterolog zu exprimieren, beispielsweise auch als Fusionsprotein, macht es zu einem vielgenutzten Werkzeug der Molekularbiologie. Vorteile der Anwendung von *GFP* liegen beispielsweise darin, dass die Fluoreszenz *in vivo* auch über längere Zeiträume gemessen werden kann und eine Lyse somit unnötig ist. Aus diesem Grund wurde *GFP* als Reporterprotein gewählt, da die Menge an mutantern Protein schnell und unkompliziert quantitativ im Mikrowell-Format bestimmt werden kann. Für die Anwendung in *C. albicans* ist die nicht-kanonische Codon Usage zu beachten. Neben einer Variante, die in Bezug auf das einzige CUG Codon in der Aminosäuresequenz optimiert wurde [Morschhauser, J *et al.* 1998] gibt es ein weiteres, vollständig an den Codon Usage von *C. albicans* angepasstes *GFP*,

das *yeast enhanced GFP* (*yeGFP*) [Cormack, BP *et al.* 1997]. Das *yeGFP* wurde zur konstitutiven Expression vom *ENO1* Locus mit dessen regulatorischen Sequenzen kloniert, über *Site-directed Mutagenesis* wurde Position N149 im *yeGFP* ORF durch ein Amber Codon ersetzt. Das *yeGFP* N149X wurde am *ENO1* Genlocus in den Stämmen mit vier *EcTyrtrRNA_{CUA}* unter *SNR52* Regulation und jeweils einer der fünf AzF-RS Varianten am *ACT1* Locus integriert. Die Stämme wurden in An- und Abwesenheit der synthetischen Aminosäure AzF kultiviert und nach Angleichung der optischen Zelldichten (OD_{600}) wurde die Fluoreszenzintensität gemessen (Abb. 10B).

Bezogen auf *yeGFP* ohne Amber Codon liegt die Fluoreszenzintensität des supprimierten *yeGFPs* zwischen 2,8 % und 11,8 % (Abb. 10B). Von den überprüften AzF-RS Varianten zeigen die meisten eine zu AzF-RS 3 vergleichbare Suppressionsrate des *yeGFPs* von etwa 4 - 5 % (Abb. 10B). Deutlich abweichend davon konnte korrespondierend zu den Ergebnissen aus der AUP eine stärkere Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von AzF von 11,8 % für AzF-RS 1 detektiert werden (Abb. 10B). AzF-RS 4 zeigte mit geringen Fluoreszenzintensitäten von 2,8 % bis 4 % bezogen auf *yeGFP* WT keine spezifische Aktivität. Die insgesamt relativ niedrigen Anteile in Prozent sind auf die Normierung auf *yeGFP* ohne Amber Codon zurückzuführen. Bei der Translation eines Stop Codons mit der aminoacylierten Suppressor-tRNA findet eine Konkurrenz mit den translationalen Release Faktoren statt [Drugeon, G *et al.* 1997].

In Abwesenheit von AzF wäre zu erwarten, dass bei vollständiger Orthogonalität der *EcTyrtrRNA_{CUA}* und der AzF-RS in *C. albicans* keine Beladung der *EcTyrtrRNA_{CUA}* und dadurch keine Suppression des Amber Codons während der Translation stattfinden kann. Bei Messung der Fluoreszenzintensitäten zeigte sich jedoch, dass auch in Abwesenheit von AzF bei allen Stämmen Fluoreszenzwerte detektiert wurden, die über der verwendeten Negativkontrolle lagen. Als Negativkontrolle diente dabei ein *C. albicans* Stamm ohne das orthogonale Pärchen, in den das *yeGFP* N149X Konstrukt am *ENO1* Locus integriert wurde (FKC10). Die erhöhte Fluoreszenz in Abwesenheit von AzF wird bedingt durch die unspezifische Aminoacylierung der *EcTyrtrRNA_{CUA}* durch eine oder endogene aaRS mit natürlichen Aminosäuren, wie bereits in den Experimenten zur tRNA-Beladung gezeigt werden konnte.

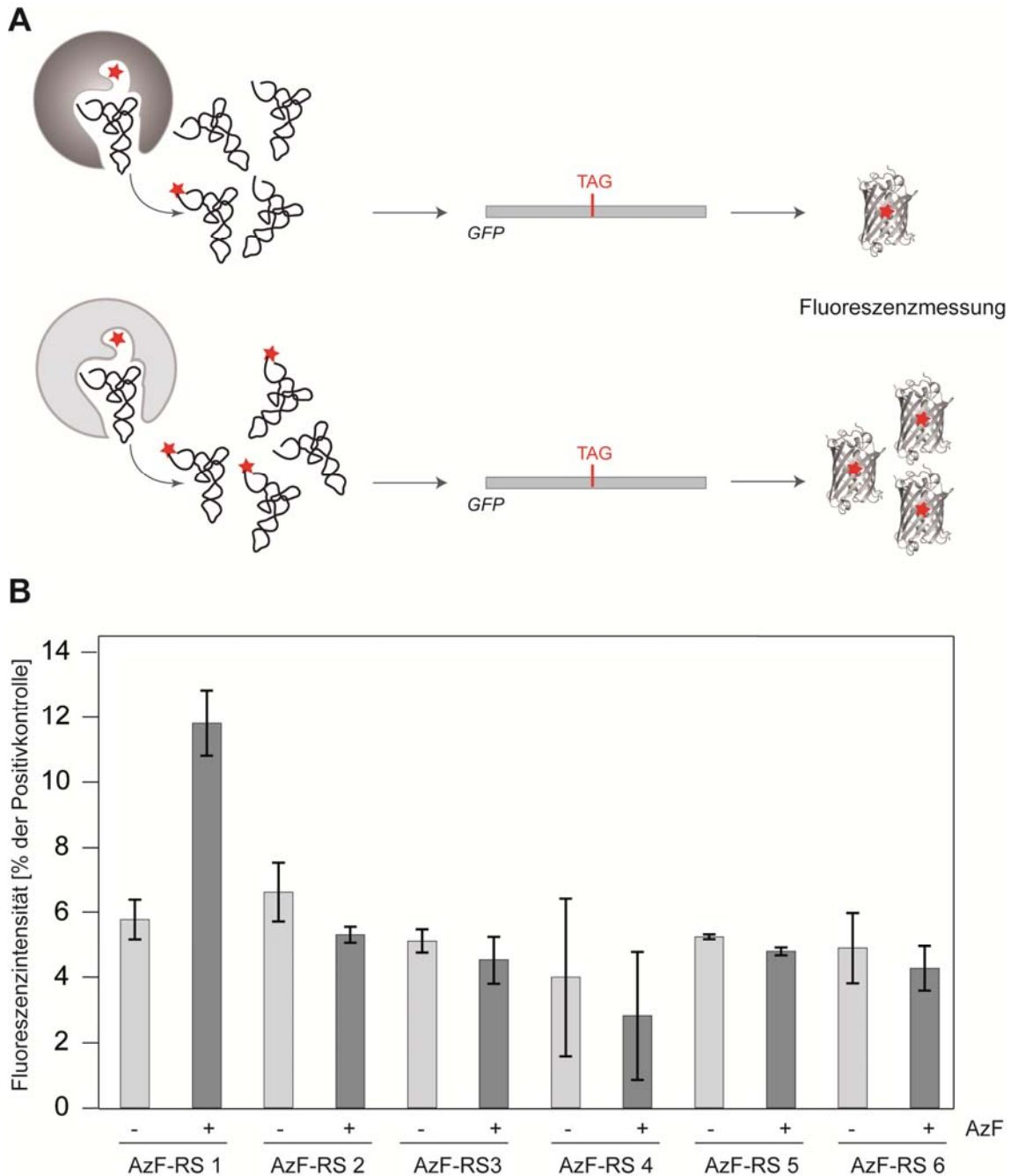


Abb. 10 Schematische Darstellung des GFP Assays und der ermittelten Fluoreszenzintensitäten. (A) Quantifizierung der Amber Suppression durch beladene tRNAs während der Translation. Da während der Translation durch eine effizientere AzF-RS (grauer Kreis) mehr mit AzF (roter Stern) beladene tRNA für die Suppression des Amber Codons zur Verfügung steht, kann mehr funktionelles GFP gebildet werden, was sich in einer erhöhten Fluoreszenz äußert. (B) Fluoreszenzintensitäten von yeGFP N149X in Abhängigkeit der AzF-RS Varianten (n=2). Die Inkubation der Stämme FKC22-FKC27 erfolgte in Anwesenheit von AzF (+) oder in Abwesenheit von AzF (-). Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität wurde bezogen auf die Fluoreszenzintensität, die im gleichen Stammhintergrund für GFP ohne ein Stop Codon (Stamm FKC4) gemessen wurde.

Mit dem yeGFP Reporter-Assay konnte die Inkorporation von AzF während der Translation detektiert und annähernd quantifiziert werden. Da sich für Variante 1 im

Vergleich zu allen anderen Varianten eine deutlich erhöhte Beladungseffizienz der tRNA und damit verbunden auch eine stärkere Suppression des Amber Codons in GFP N149X (Abb. 10) gezeigt hat, sollte für weitere Versuche die AzF-RS 1 verwendet werden. Um für weitere Arbeiten nicht mit der Detektion von Zielproteinen zu interferieren, die ebenfalls mit einem V5-Epitop fusioniert wurden, wurde die codon-optimierte AzF-RS 1 ohne V5-Epitop kloniert. Die so modifizierte AzF-RS 1 wurde in Stamm FKC 3, der die *EcTyrtrRNA_{CUA}* in 4 Kopien unter *SNR52* Regulation enthält, am *ACT1* Locus integriert, um als Ausgangsstamm für weitere Arbeiten mit mutanten Proteinen Stamm SPC43 herzustellen. SPC43 ist der aus dem klinischen Isolat SC5314 [Gillum, AM *et al.* 1984] hergestellte *C. albicans* Stamm, der das orthogonale Pärchen für die Integration von AzF in Proteine mit Amber Codon enthält. Ein zu analysierendes, mutantes Protein kann somit direkt durch Integration eines Amber Codons und Transformation in Stamm SPC43 erhalten werden.

3.4 Analyse toxischer Effekte des erweiterten genetischen Codes

Da für die Überexpression von heterologen Amber Suppressor-tRNAs bereits toxische Effekte auf das Zellwachstum durch artifizielle Verlängerung der C-Termini zellulärer Proteine beschrieben wurden [Chen, S *et al.* 2007, Young, TS *et al.* 2010a], wurden Wachstum und Morphologie von Stamm SPC43 analysiert, der das orthogonale Pärchen enthält. Auch die Zugabe von AzF könnte möglicherweise Effekte auf *C. albicans* zeigen, daher wurden die Experimente jeweils in An- und Abwesenheit von AzF durchgeführt und als Referenz wurde das klinische Isolat SC5314 verwendet (Abb. 11). Für das Wachstum der *C. albicans* Stämme in den Standardmedien YPD und SC (Abb. 11A) ließen sich bei Zugabe von AzF keine Effekte auf das Wachstum beobachten. Auch die Morphologie unter Blastosporen-induzierenden (YPD, SC, 30 °C) und Hyphen-induzierenden Bedingungen (YPD + 10 % FCS, 37 °C) war für Stamm SPC43 identisch wie für den Wildtyp-Stamm SC5314 (Abb. 11B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Überexpression der Suppressor *EcTyrtrRNA_{CUA}* sowie der AzF-RS in *C. albicans* keine negativen Effekte auf Zellwachstum und Morphogenese haben. Zudem konnten keine Effekte der synthetischen Aminosäure AzF auf *C. albicans* beobachtet werden.

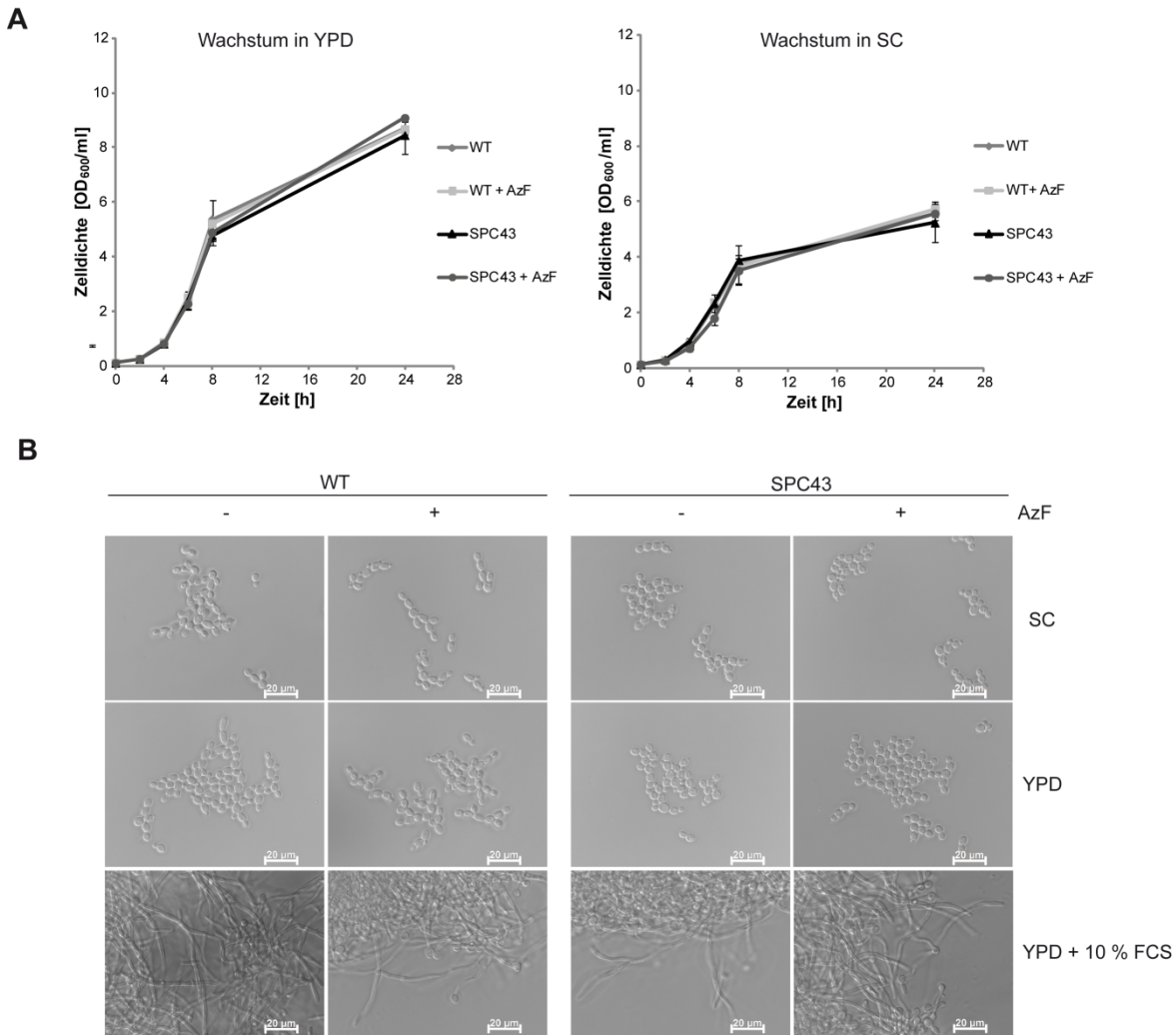


Abb. 11 Die Expression des orthogonalen Pärchens zeigt keine negativen Effekte auf Wachstum und Morphologie in *C. albicans*. (A) Wachstumskurven von *C. albicans* Wildtyp Stamm SC5314 (WT) und dem *C. albicans* Stamm mit orthogonalen Pärchen (SPC43) in YPD-Medium und SC-Medium mit und ohne Zugabe von AzF (AzF + und -). (B) Morphologie des *C. albicans* Wildtyp Stammes SC5314 und des *C. albicans* Stammes mit orthogonalen Pärchen (SPC43) unter Blastosporenwachstum (SC-Medium YPD-Medium, 30 °C) oder Hyphenwachstum (YPD + 10 % FCS, 37 °C) induzierenden Bedingungen. Die Stämme wurde ohne (-) oder mit (+) Supplementation des Mediums mit AzF kultiviert. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

4. Einbau der synthetischen Aminosäure AzF in Zielproteine

Für den Einbau von AzF in Proteine in *C. albicans* zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden das hoch abundante, differenziell lokalisierte Protein Tsa1p und der Virulenzfaktor Tup1p gewählt.

4.1 Einbau von AzF in Tsa1p

Das *C. albicans* Tsa1 Protein ist involviert im Schutz vor oxidativem Stress [Urban, C *et al.* 2003, Urban, C *et al.* 2005]. Verschiedene multimere Formen von Tsa1p sind für Homologe in anderen Spezies beschrieben worden [Kristensen, P *et al.* 1999, Schroder, E *et al.* 2000, Wood, ZA *et al.* 2002]. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Di- und Oligomerisierung wurde Tsa1p als Modell für mögliche AzF-vermittelte Crosslinks ausgewählt. Auch die hohe Abundanz des Proteins in Cytosol und Nucleus von Blastosporen und die Verfügbarkeit von Strukturdaten spricht für seine Anwendung als Modellprotein. Für die Auswahl der Positionen, die mit AzF substituiert werden sollten, wurde die Proteinstruktur von humaner Thioredoxin Peroxidase B aus Erythrocyten verwendet [Schroder, E *et al.* 2000]. Die Proteinstruktur ist in der Protein Data Bank (PDB) unter der Nummer 1QMV hinterlegt. Zwischen den Sequenzen der humanen Thioredoxin Peroxidase B und CaTsa1p besteht eine Sequenzidentität von 57,6 % (Anhang, Abb. 27). Eine höhere Sequenzidentität von 73,5 % besteht zu ScTsa1p (Anhang, Abb. 29), für das seit 2012 ebenfalls eine Proteinstruktur unter der Zugangsnummer 3SBC in der PDB zugänglich ist [de Oliveira, MA *et al.* 2007]. Als die Arbeiten mit CaTsa1p begonnen wurden, war jedoch lediglich die Proteinstruktur von humaner Thioredoxin Peroxidase B verfügbar, daher wurden die Aminosäuren zur Substitution mit AzF ausgehend von dieser Struktur ausgewählt. Die basierend auf Struktur 1QMV ausgewählten Positionen sind zwischen CaTsa1p und humaner Thioredoxin Peroxidase B bis auf das Isoleucin an Position 140 (I140) identisch (Abb. 12). In dem Struktur-Viewer Cn3D wurden zwei Ketten der Thioredoxin Peroxidase B ausgewählt, um die dimere Konfiguration zweier Monomere zu veranschaulichen (Abb. 12A). Die Aminosäuren wurden anschließend danach ausgewählt, dass der Abstand zu einer Aminosäure in der benachbarten Kette maximal 4 Ångström (Å) betrug (Tabelle 25). Die Vorgabe von 4 Å basiert auf Daten, die mit der strukturell ähnlichen synthetischen Photocrosslinker-Aminosäure *p*-Benzoylphenylalanin gewonnen wurden [Dorman, G *et al.* 2000, Wittelsberger, A *et al.* 2008, Grunbeck, A *et al.* 2011].

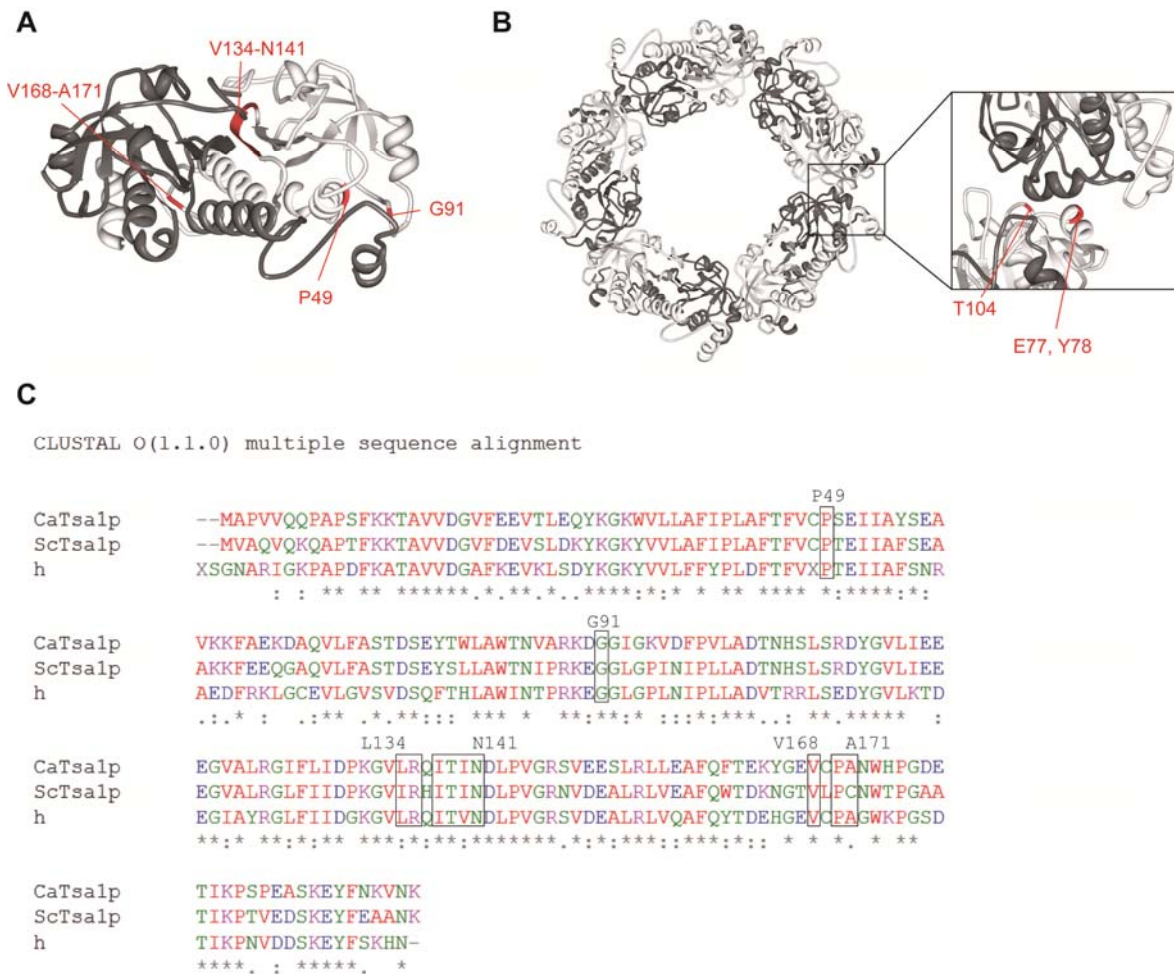


Abb. 12. Strukturen der Di- und Oligomere von Tsap1p und Sequenzvergleich zwischen Thioredoxin-Peroxidasen aus *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens* (A) Struktur zweier Ketten des Tsap1p Homologs humaner Thioredoxin Peroxidase B (1QMV, Kette A: grau, Kette B: weiß). Die für die Mutagenese ausgewählten Positionen sind rot markiert und mit den korrespondierenden Aminosäuren von CaTsa1p beschriftet. (B) Struktur der homodecameren Form des Tsap1p Homologs humaner Thioredoxin Peroxidase B (1QMV). Die für die Mutagenese ausgewählten Positionen sind rot markiert und mit den korrespondierenden Aminosäuren von CaTsa1p beschriftet. (C) Die Proteinsequenz der Thioredoxin Peroxidase aus *C. albicans* (CaTsa1p), *S. cerevisiae* (ScTsa1p) und aus Erythrocyten des Menschen (h) wurden mittels Clustal Omega verglichen. Rot markiert sind kleine und hydrophobe Aminosäuren, blau markiert sind saure Aminosäuren, pink markiert sind basische Aminosäure und grün markiert sind Aminosäuren, die Hydroxyl-, Sulfhydryl- oder Aminogruppen enthalten. Sterne markieren identische Aminosäuren, Doppelpunkte markieren konservierte Austausche der gleichen Farbkategorie und Punkte markieren halb-konservierte Austausche. Die für die Mutagenese ausgewählten Positionen wurden umrahmt und nummeriert.

Neben Positionen G91, R136, I138, T139, A171 wurden die flankierenden Positionen zu den zwei Cysteinen an Positionen 48 und 169 gewählt. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass diese Cysteine bei der Dimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken eine Rolle spielen [Chae, HZ *et al.* 1994]. Da die Cysteine darüber

hinaus auch katalytische Funktion haben [Chae, HZ *et al.* 1994, Brachhold, M 2011], wurden nicht die Cysteine direkt ersetzt, sondern die unmittelbar angrenzenden Aminosäuren P49, sowie V168 und P170. Im Bereich von R136 bis T139 liegen mehrere Aminosäuren in räumlicher Nähe zu der Kette des anderen Monomers, daher wurde der gesamte Bereich von Position L134 bis N141 für die Mutagenese ausgewählt. In Abb. 12A sind die Positionen und ihre Lokalisation in der Proteinstruktur 1QMV dargestellt.

Aminosäureposition Kette A	Aminosäureposition Kette B	Distanz [Å]
P49	F191	4,0
G91	F191	3,5
R136	D142; N141; P144	3,0; 4,0; 4,0
I138	I140; T139; I138	3,0; 3,5; 4,0
T139	Q137, I138	4,0
I140	I138; Q137	3,0; 3,5
N141	Q137; R136; L155	3,0; 3,5; 3,5
V168	P143	3,5
P170	S50	3,5
A171	S50; R147; E51	3,0; 3,5; 4,0

Tabelle 25 Abstände ausgewählter Aminosäurepositionen in zwei Ketten von humaner Thioredoxin Peroxidase B. Durch Markierung einzelner Aminosäuren in der Struktur 1QMV im Programm Cn3D und Auswahl einer maximalen Distanz von 4 Ångstrom zwischen den Monomeren wurden die innerhalb dieser Distanz liegenden Aminosäuren angezeigt.

Um zu überprüfen, ob in *C. albicans* höhere Tsa1p Oligomere auch *in vivo* gebildet werden, wurden drei Positionen (E77, Y78, T104) ausgewählt, die bei einer Oligomerisierung von Tsa1p Dimeren in räumlicher Nähe zu dem zweiten Dimer orientiert wären [de Oliveira, MA *et al.* 2007]. Diese Positionen sind in Abb. 12B dargestellt.

Um mutantes Tsa1p von endogenem Tsa1p unterscheiden zu können, wurde der ORF mit einem C-terminalen V5/His₆-Tag fusioniert. Zur chromosomalen Integration am endogenen *TSA1A* Locus wurden die flankierenden Regionen upstream und

downstream des ORFs (FR1 und FR2) ebenfalls in den Vektor kloniert. An dem daraus resultierenden Vektor pSFS2A CT Tsa FR1 ORF FR2 wurden die nachfolgenden Mutagenesen durchgeführt und mittels Sequenzierung überprüft. Die mit Amber Codon mutagenisierten, mit Peptid-Epitop versehenen Konstrukte wurden am *TSA1A* Locus von Stamm SPC43 integriert, in dem das *C. albicans* optimierte orthogonale Pärchen exprimiert wurde.

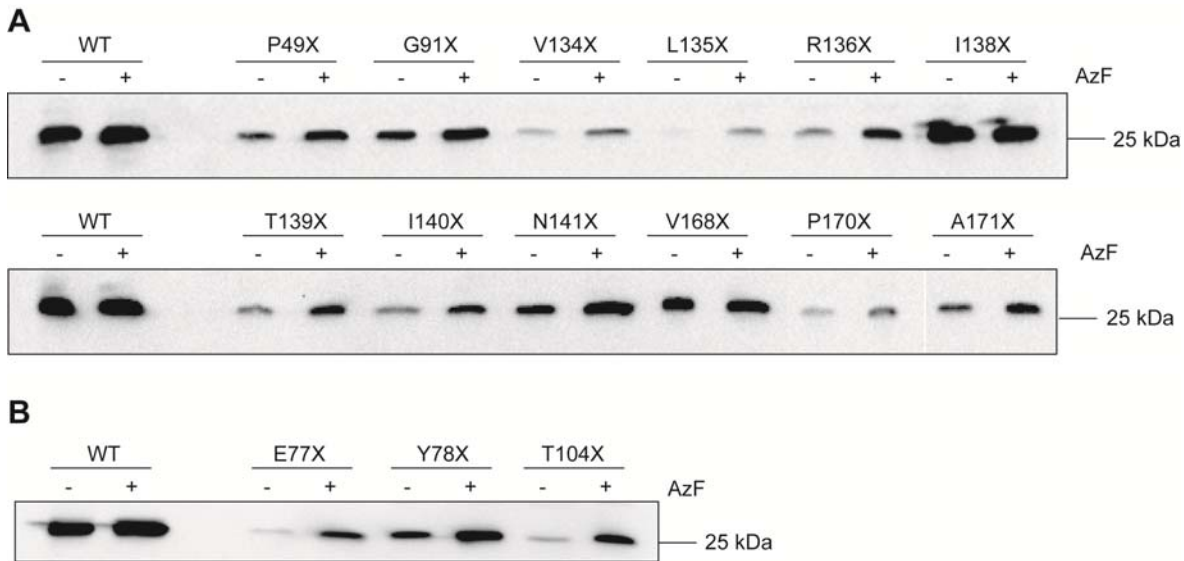


Abb. 13 *In vivo* Einbau von AzF in CaTsa1p. (A) Suppression des Amber Codons an den potentiell für die Dimerisierung relevanten Positionen von CaTsa1p. Die Inkubation der Stämme SPC46 (Tsa1p WT) und der Stämme mit mutanten Tsa1p Varianten SPC47 - SPC58 erfolgte in Medium mit (+) oder ohne (-) Supplementation von AzF. (B) Suppression des Amber Codons an den potentiell für die Oligomerisierung relevanten Positionen von CaTsa1p. Die Stämme mit orthogonalem Pärchen und den Tsa1p Varianten mit Amber Codon (SPC61, SPC62, SPC64) sowie zur Kontrolle mit orthogonalem Pärchen und Tsa1p WT (SPC46) wurden jeweils in An- und Abwesenheit von AzF (+ und -) kultiviert.

Mutantes, supprimiertes Tsa1p war anschließend über die C-terminal fusionierten V5/His₆-Epitope in Proteinlysaten aller Stämme detektierbar (Abb. 13A und B). Je nach Position, die mit AzF substituiert wurde, war die Suppressionsrate allerdings variabel. Für jede substituierte Position war die Suppression in Abhängigkeit von AzF stärker. Dennoch war je nach Position eine unterschiedlich starke unspezifische Suppression ohne die Zugabe von AzF detektierbar. Diese unspezifische Suppression ist möglicherweise auf die nicht ganz stringente Orthogonalität der heterologen *EcTyr*tRNA_{CUA} und AzF-RS durch Beladung der *EcTyr*tRNA_{CUA} mit natürlichen Aminosäuren in *C. albicans* zurückzuführen, die auch schon in den Ergebnissen der tRNA-Aminoacylierungsversuche deutlich wurde (Abb. 8). Die stärkere Suppression

des Amber Codons in Anwesenheit von AzF deutet jedoch auf einen bevorzugten Einbau der synthetischen Aminosäure hin.

4.2 Einbau von AzF in Tup1p

Als zweites Beispiel für Protein-Protein Interaktionen in *C. albicans* wurde ein im Vergleich zu *TSA1* nicht so abundant exprimierter Transkriptionsfaktor gewählt, um den dynamischen Bereich der Methode bezüglich AzF Einbau und Crosslink-Induktion zu analysieren. Tup1p ist der zentrale Repressor von hyphalem Wachstum in *C. albicans* [Braun, BR *et al.* 1997]. *S. cerevisiae* Tup1p (ScTup1p) bildet über seine N-terminale Domäne Homotetramere (Abb. 14A) [Jabet, C *et al.* 2000] und interagiert mit dem transkriptionellen Co-Faktor Ssn6p [Williams, FE *et al.* 1991, Tzamarias, D *et al.* 1995]. Die C-terminale Domäne bildet einen sieben-blättrigen Propeller, der aus WD40 Wiederholungen (*WD40 repeats*) besteht. Zu der Zeit, als mit den Experimenten an Tup1p begonnen wurden, waren Strukturdaten für die C-terminale Domäne von ScTup1p verfügbar [Sprague, ER *et al.* 2000], nicht aber für die N-terminale Domäne von ScTup1p. Um zu zeigen, dass Interaktionen auch ohne die Hilfe von Strukturdaten zur Auswahl der zu substituierenden Positionen detektiert werden können, wurde die N-terminale Domäne für die Interaktionsanalysen ausgewählt und geeignete Aminosäuren wurden definiert. Ein Austausch von L62R in ScTup1p führt zu einer Tup1p-Variante, die Defekte in der Bindung von ScSsn6p und der Repression von Reportergenen aufweist, während die Homotetramerisierung unbeeinträchtigt bleibt [Carrico, PM *et al.* 1998]. Daher wurden die entsprechende Position L63 und fünf weitere, flankierende Positionen (Y61, D62, E64, L65, A66) in CaTup1p für die Mutagenese ausgewählt (Abb. 14B). Die Proteinstruktur der N-terminalen Domäne von ScTup1p wurde 2012 aufgeklärt [Matsumura, H *et al.* 2012]. Die Strukturdaten wurden verwendet, um die Ausrichtung der ausgewählten, mutagenisierten Aminosäurepositionen zu veranschaulichen (Abb. 14A).

Analog zu dem Vorgehen für *Tsa1p* wurde von *TUP1* der ORF ohne Stop Codon *in frame* mit dem C-terminalen V5/His₆-Tag fusioniert. Für die chromosomale Integration wurden Regionen direkt upstream und downstream des ORFs (FR1 und FR2) ebenfalls in den Vektor kloniert, so dass als Ausgangsvektor für die Klonierungen pSFS2A CT Tup FR1 ORF FR2 hergestellt wurde. Die Mutagenesen wurden über ein PCR-basiertes *Site-directed Mutagenesis* Protokoll eingefügt und mittels

Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden die mutanten, mit Peptid-Epitop versehenen Konstrukte in den endogenen *TUP1* Locus von Stamm SPC43 integriert und die Integration wurde mit PCR sowie Southern Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Vergleichbar mit Tsa1p führte die Inkubation der Stämme mit orthogonalem Pärchen und mutantern Tup1p in AzF-supplementiertem Medium generell zu effizienter Suppression des Amber Codons, so dass das vollständige 60,6 kDa C-terminal getagte Tup1p im Western Blot detektierbar war (Abb. 14C). Für die Stop Codons an Positionen D62 und E64 konnte keine Suppression detektiert werden (Abb. 14C Spuren 5,6,9,10). Für die anderen Positionen war, wie schon für Tsa1p beobachtet, eine positionsabhängig unterschiedlich starke Suppression des Amber Codons zu sehen. Im Vergleich zu Tsa1p (Abb. 13) zeigte sich bei Tup1p kaum eine unspezifische Suppression der Amber Codons in Abwesenheit der synthetischen Aminosäure AzF (Abb. 14C, Spuren 3, 7, 11 und 13).

4.3 Nachweis von AzF in Tsa1p und Tup1p

Für einen massenspektrometrischen Nachweis der positionsspezifischen Integration von AzF in Proteine in *C. albicans* wurden jeweils Tsa1p N141X und Tup1p L63X über den fusionierten V5/His₆-Tag aufgereinigt. Tsa1p N141X konnte in ausreichender Menge und Reinheit über den His₆-Tag aufgereinigt werden (Anhang Abb. 28). Als Kontrolle wurde außerdem C-terminal getagtes Tsa1p ohne Amber Codon (CT Tsa1p WT) aufgereinigt (Anhang Abb. 28). Für Tup1p L63X wurde in einem zweistufigen Protokoll eine Ni-NTA-Aufreinigung mit einer immunologischen Aufreinigung über das V5-Epitop kombiniert (Abb. 20C). Die entsprechenden Banden wurden nach Auftrennung im SDS-Gel und Coomassiefärbung ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

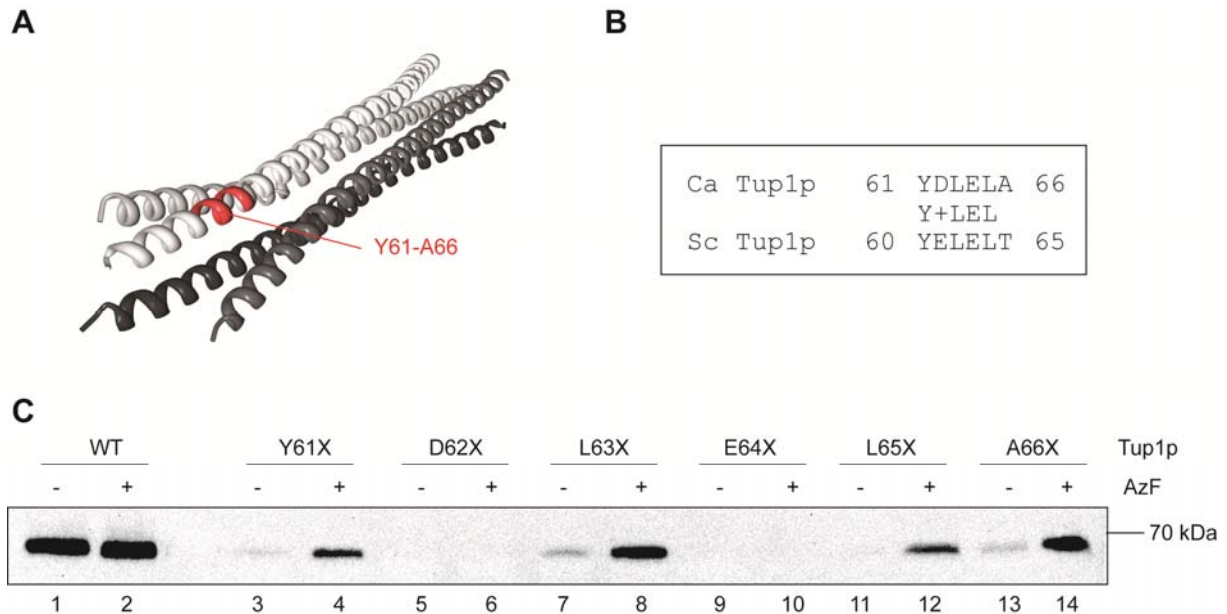


Abb. 14 Struktur der N-terminalen Domäne von Tup1p und zur Substitution mit AzF ausgewählte Positionen. (A) Struktur der N-terminalen Domäne von ScTup1p (3VP8), die als Homotetramer vorliegt. Die für die Mutagenese ausgewählten Positionen sind rot markiert und mit den korrespondierenden Aminosäuren von CaTup1p beschriftet. (B) Sequenzvergleich der für die Mutagenese ausgewählten Bereiche zwischen CaTup1p und ScTup1p. (C) Suppression der Amber Codons an den ausgewählten Positionen. Die Stämme YBC4 - YBC9, die das orthogonale Pärchen sowie die unterschiedlichen mutanten Tup1p Varianten enthalten, wurden in SC-Medium mit (+) oder ohne Supplementation von AzF (-) kultiviert. Stamm YBC2, welcher nicht das orthogonale Pärchen enthält, sondern Tup1p WT mit C-terminalem Tag, wurde als Referenz aufgetragen.

Aufgrund der hohen Reaktivität der Azido-Gruppe ist bekannt, dass *p*-Azidophenylalanin zum Teil *in vivo* oder auch während der Probenvorbereitung zu *p*-Aminophenylalanin reduziert werden kann [Chin, JW *et al.* 2003a, Chen, S *et al.* 2007, Chatterjee, A *et al.* 2013a]. Für Tsa1p N141X konnte der erwartete Peak (QITIN*DLPVGR; berechnet: m/z 1273,77; gemessen: m/z 1273,66) bei positionsspezifischer Integration von *p*-Aminophenylalanin an Position N141 im Vergleich zum Spektrum von CT Tsa1p WT detektiert werden (Abb. 15A). Nach tryptischem Verdau und Substitution von Leucin 63 mit *p*-Aminophenylalanin ist für Tup1p L63X ein Peptid der Sequenz QTVYDL*ELAHR und der Masse 1393,686 zu erwarten. Dieser Peak (m/z 1393,727) konnte in der MALDI-TOF Messung detektiert werden und die erwartete Aminosäuresequenz wurde über MALDI-TOF/TOF verifiziert (Abb. 15B). Weitere Daten aus einer Nano-LC-ESI-MS/MS konnten die Anwesenheit von *p*-Aminophenylalanin an dieser Position bestätigen (Anhang Tabelle 26, Abb. 30 und Abb. 31). Obwohl überwiegend Peptide mit *p*-Aminophenylalanin an Position 63 detektiert wurden, konnten auch Peptide mit den misinkorporierten Aminosäuren

Tryptophan, Glutaminsäure und Phenylalanin gefunden werden. Peptide, die Leucin an Position 63 enthielten, wurden in der Probe nicht detektiert (Anhang Tabelle 26, Abb. 30 und Abb. 31). Interessanterweise wurden für das Tup1p L63X Monomer zwei unmittelbar übereinander laufende Banden aufgereinigt, die sich beide als mutantes Tup1p herausstellten. Für die untere Bande wurde Tup1p L63X gefunden, das drei Phosphorylierungen aufwies (Anhang Abb. 30).

Um zu verifizieren, dass in mutanten Proteinen *in vivo* überwiegend die für Crosslink-Induktion benötigte intakte Azido-Gruppe vorliegt, ist ein biochemischer Nachweis der Azido-Gruppe möglich. In einer Staudinger-Ligation [Saxon, E *et al.* 2000, Kiick, KL *et al.* 2002] kann eine im Protein enthaltene Azido-Gruppe kovalent mit einem Triarylphosphin-Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Zu diesem Zweck wurden Zelllysate von Stämmen SPC46 (CT Tsa WT) und SPC55 (CT Tsa N141X) nach Wachstum in Medium mit und ohne AzF hergestellt und für eine Staudinger-Ligation mit einem fluoreszenzmarkierten Phosphin (DyLight 550 Phosphine, Thermo Scientific) eingesetzt. Anschließend wurden die markierten Proteine über das V5-Epitop immunpräzipitiert. Die Lysate und präzipitierten Proben wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Fluoreszenz-Scanner ausgewertet. Danach wurden die Gele mit Coomassie gefärbt, zusätzlich wurden die gleichen Proben per Western Blot ausgewertet.

Für die Proteinlysate zeigt sich in der Fluoreszenzaufnahme des SDS-Gels in Abhängigkeit von Supplementierung des Mediums mit AzF, dass mehrere Proteine des Lysats kovalent mit dem fluoreszenzmarkiertem Phosphin markiert wurden (Abb. 16A, Spuren 2 und 6). Nach Immunpräzipitation der gleichen Lysate über das V5-Epitop wurde spezifisch für Stamm SPC55, der CT Tsa N141X enthält, nur noch ein Fluoreszenzsignal auf Höhe von 25 kDa detektiert, was der Bande für mutantes, getagtes Tsa1p entspricht (Abb. 16, Spur 9).

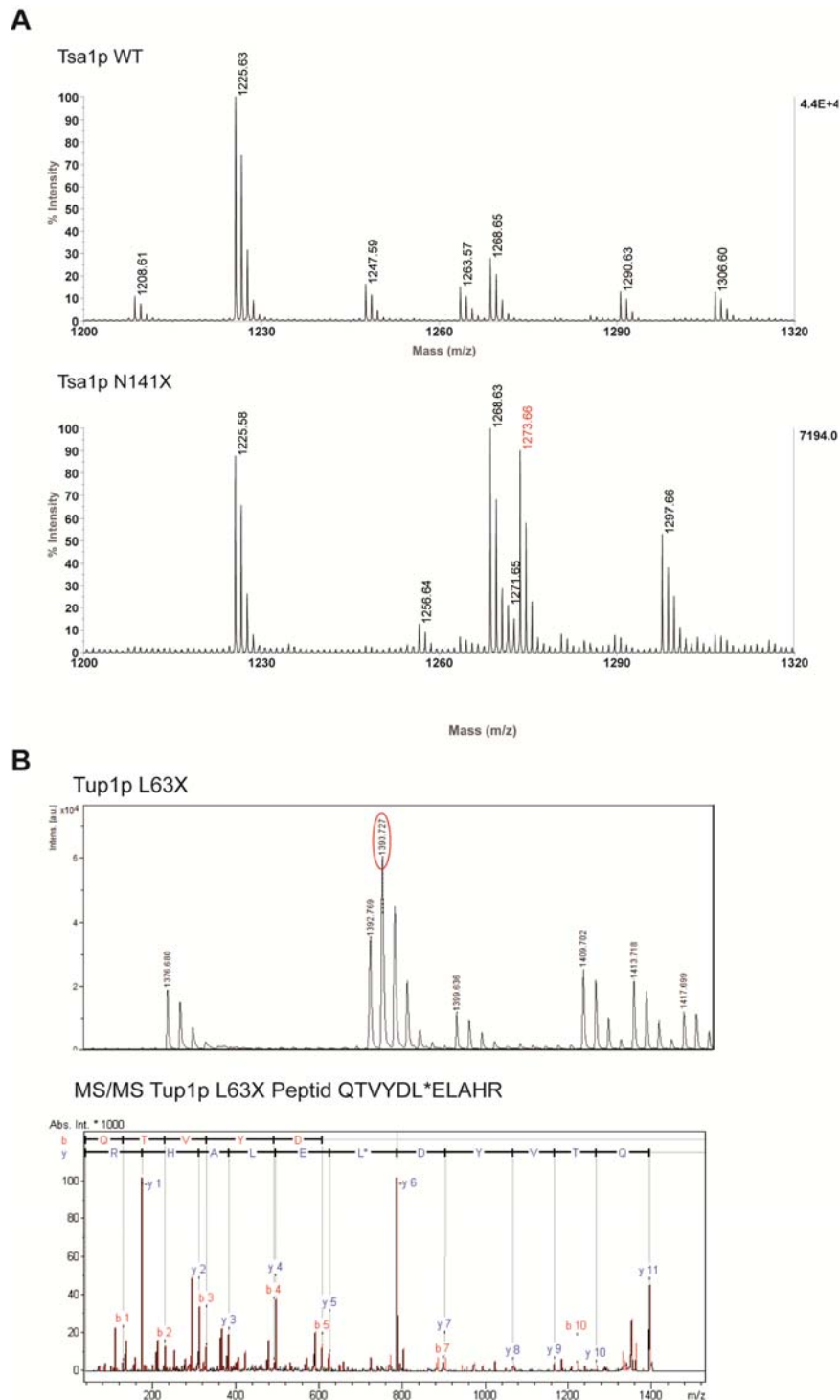


Abb. 15 Massenspektrometrischer Nachweis von AzF und dessen Abbauprodukten in Tsa1p und Tup1p. (A) Ausschnitt aus dem Massenspektrum der tryptischen Peptide von Tsa1p WT (oberes Spektrum) und Tsa1p N141X (unteres Spektrum) im Massenbereich m/z 1200 - 1320. Der im unteren Spektrum detektierte Peak für Peptid QITIN*DLPVGR bei Integration von *p*-Aminophenylalanin anstelle von Asparagin 141 (N141) (Masse erwartet: m/z 1273,77; Masse detektiert: m/z 1273,66) ist rot markiert. (B) Ausschnitt aus dem Massenspektrum der tryptischen Peptide von Tup1p L63X im Bereich von m/z 1370 - 1420 (oberes Spektrum). Der Peak für Peptid QTVYDL*ELAHR (Masse erwartet: m/z 1393,686; Masse detektiert: m/z 1393,727) wurde gefunden (mit einem roten Kreis markiert) und per Tandem MS fragmentiert (unteres Spektrum). In rot ist die b-Ionenserie angegeben und in blau die y-

Ionenserie. Das Sternchen markiert die Detektion des *p*-Azidophenylalanin Abbauproduktes *p*-Aminophenylalanin anstelle von Leucin 63.

Stamm SPC46 mit CT Tsa WT zeigte keine fluoreszierende Bande, obwohl wie im Western Blot und Coomassie-gefärbten Gel erkennbar ist, mehr CT Tsa WT in der Probe enthalten ist (Abb. 16, Spur 8). Somit konnte gezeigt werden, dass (1) AzF positionsspezifisch in Proteine mit einem Amber Codon integriert wird, (2) auch in anderen Proteinen vorkommende Amber Codons am Ende des ORF durch die mit AzF aminoacylierte *Ec*TyrtRNA_{CUA} supprimiert werden, (3) AzF *in vivo* weder vor noch nach dem Einbau in Proteine degradiert wird und (4) AzF daher für die Induktion von Crosslinks zwischen interagierenden Proteinen in *C. albicans* zur Verfügung steht.

5. Induktion von Quervernetzungen

Mit den mutanten, AzF enthaltenden Varianten von Tsa1p und Tup1p sollten als nächstes Aminosäuren identifiziert werden, die in Protein-Protein Interaktionen involviert sind. Stämme, die das orthogonale Pärchen und jeweils ein mutantes Tsa1p oder Tup1p enthielten, wurden in Medium mit oder ohne AzF kultiviert und anschließend für 30 min mit UV-Licht bei 365 nm bestrahlt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht bei 312 nm oder 365 nm wird eine Photolyse der Azido-Gruppe induziert, so dass eine reaktive Nitren-Gruppe entsteht, durch die eine kovalente Bindung an benachbarte Methyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen entstehen kann [Dorman, G *et al.* 2000] (Anhang Abb. 22). Interagierende Proteine in räumlicher Nähe zueinander können somit durch UV-Bestrahlung über ein enthaltenes AzF in einem der Proteine kovalent verbunden werden und sind stabil für nachfolgende Detektions- und Aufreinigungsschritte. Nach Bestrahlung der *C. albicans* Kulturen wurden die Zellen lysiert und die Proteinextrakte für Western Blot Analysen mit anti-V5 Antikörper eingesetzt.

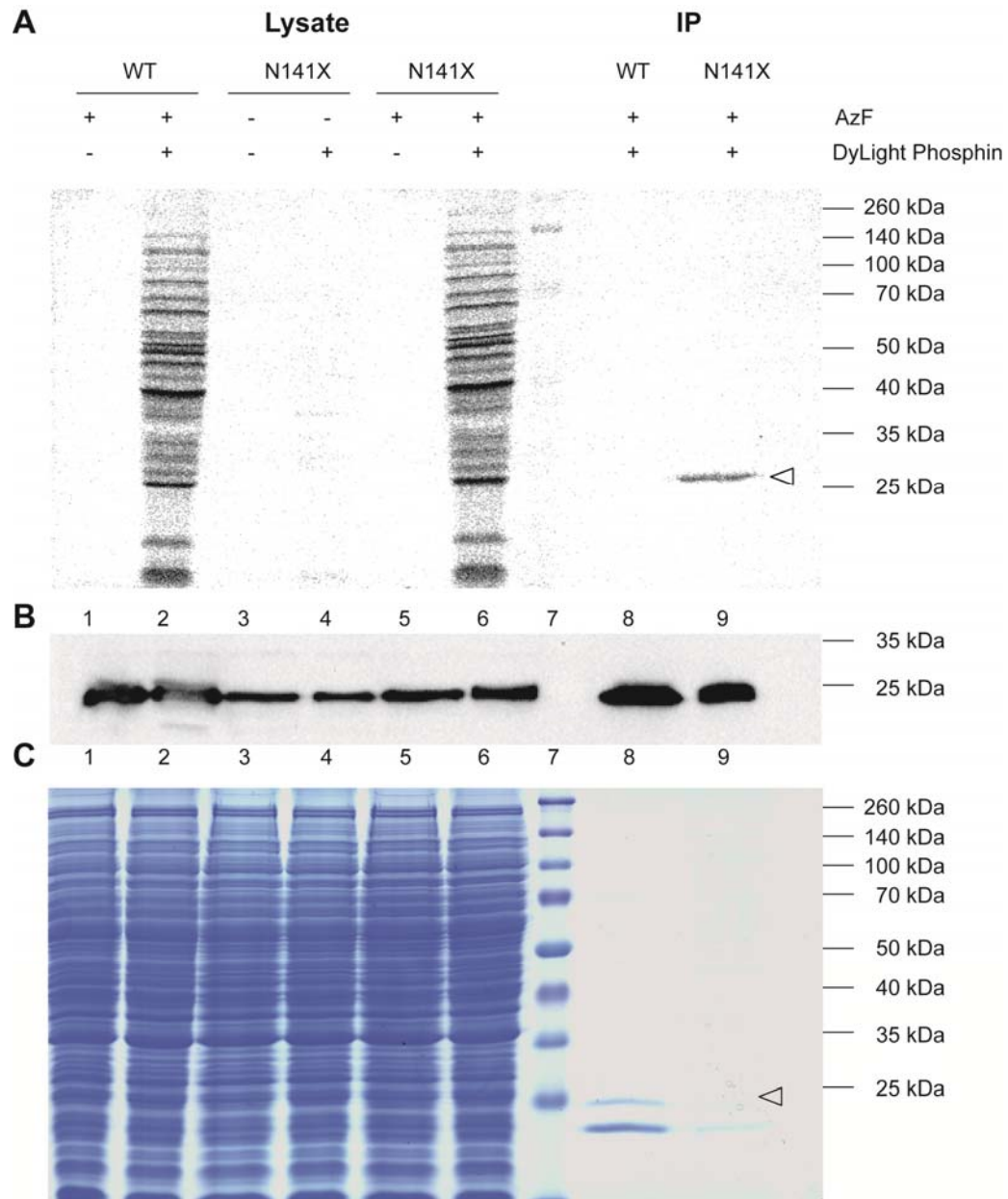


Abb. 16 Markierung der Azidogruppe in Proteinen mit einem fluoreszenzmarkierten Phosphin. Lysate der Stämme SPC46 (Tsa1p WT) und SPC55 (Tsa1p N141X) (Spuren 1 - 6) wurden nach Inkubation in Medium mit oder ohne AzF (AzF + oder -) einer Staudinger-Ligation mit einem fluoreszenzmarkiertem Phosphin unterzogen (DyLight Phosphin + oder -). Proben Tsa1p WT und N141X wurden nach Inkubation in Medium mit AzF und anschließender Staudinger-Ligation außerdem über das V5-Epitop immunpräzipitiert und die Eluate wurden ebenfalls aufgetragen (Spuren 8 und 9). Das weiße Dreieck markiert das C-terminal getagte Tsa1p. **(A)** Die Fluoreszenz der markierten Proben im oberen SDS-Polyacrylamidgel wurde im Laserscanner visualisiert. **(B)** Aliquots der Proben wurden in einem Western Blot mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. **(C)** Das in A gezeigte SDS-Gel wurde anschließend Coomassie-gefärbt.

5.1 Crosslink-Induktion mit mutanten Tsa1p Varianten

Für wildtypisches, mit V5/His₆-Tag exprimiertes Tsa1p konnte zunächst gezeigt werden, dass unabhängig von der AzF Supplementierung des Mediums oder UV-Belichtung nur die Bande von monomeren Tsa1p von etwa 24 kDa im Western Blot detektiert werden konnte (Abb. 17A, Spur 1 - 4). Für Tsa1p N141X war hingegen bei Supplementierung des Mediums mit AzF und nachfolgender UV-Belichtung eine Bande mit höherem Molekulargewicht von etwa 48 kDa im Western Blot nachweisbar (Abb. 17A, Spur 8). Die Ausbildung der Quervernetzung war strikt von Zugabe von AzF zum Medium sowie der anschließenden UV-Belichtung abhängig. Fehlen beide oder einer der beiden Faktoren, konnte kein höhermolekularer Komplex des Monomers mit einem anderen Protein gebildet werden. Dies ist ein Zeichen für die Spezifität der Methode, dass nur bei Integration von AzF in das Protein und der induzierbaren UV-Belichtung eine kovalente Bindung zu Proteinen in der Nähe ausgebildet werden kann, so dass falsch positive Interaktionen auszuschließen sind.

In Abb. 17B sind alle Proteinlysate der für Tsa1p analysierten Positionen nach Kultivierung der Stämme in Medium mit AzF und anschließender UV-Belichtung im Western Blot aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Tsa1p WT, das bei Supplementation mit AzF und UV-Belichtung keinen höhermolekularen Komplex bildete. Höhermolekulare Komplexe wurden für Positionen P49X, T139X, N141X, V168X, P170X und A171X detektiert. Interessanterweise unterschieden sich die detektierten Crosslinks je nach Position in ihrem Laufverhalten im SDS-Gel. Für Positionen P49X, V168X, P170X und A171X lief die Crosslink-Bande etwas unterhalb der für Positionen T139X und N141X detektierten Crosslink-Bande. Aufgrund der Größe von etwa 48 kDa, die dem doppelten Molekulargewicht von CT Tsa1p entspricht, schien zumindest für einen der beiden beobachteten Crosslinks eine Homodimerisierung wahrscheinlich.

Auffällig war auch, dass nicht jede Position geeignet ist, eine Quervernetzung zu induzieren. Für Positionen V134 und L135 war beispielsweise die im Strukturmodell ermittelte Distanz zum interagierenden Monomer größer als 4 Ångstrom (Tabelle 25), daher war bei diesen Positionen nicht von einer Crosslink-Induktion auszugehen. Es kommt jedoch nicht nur auf die Distanz zwischen den interagierenden Molekülen an, sondern auch auf die Orientierung der Aminosäuren. Im Proteinstrukturmotiv der Alpha-Helix beispielsweise hängt die Orientierung der Aminosäuren von der Drehung

der Helix ab. Da für die Ausbildung eines Crosslinks eine räumliche Nähe von 3 - 4 Å nötig ist, können sich sogar unmittelbar benachbarte Aminosäuren stark hinsichtlich ihrer Crosslink Effizienz unterscheiden, abhängig von ihrer Orientierung zu dem interagierenden Molekül. Für Tsa1p wurden beispielsweise Interaktionen für die mutanten Tsa1p Varianten T139X und N141X beobachtet, jedoch nicht für Tsa1p Variante I140X. Beim Vergleich der entsprechenden Aminosäuren in der Kristallstruktur der humanen Thioredoxin Peroxidase wird deutlich, dass die Aminosäuren entsprechend der Positionen T139 und N141 in Richtung des interagierenden Tsa1p Monomers gerichtet sind, während die Position I140 entsprechende Aminosäure intramolekular orientiert ist (Abb. 17C). Obwohl in der Kristallstruktur eine räumliche Nähe zwischen Isoleucin an Position 140 und anderen Aminosäuren des interagierenden Monomers vorhergesagt wurde (Tabelle 25), ist daher aufgrund der Orientierung der Aminosäure an Position 140 eine kovalente Bindung zu einem interagierenden Molekül bei einer Crosslink-Induktion über AzF unwahrscheinlich. Ebenso lassen sich die Ergebnisse für Positionen R136 und I138 mit den Strukturmodellen vereinbaren. Hier wurde ebenfalls für beide Positionen eine räumliche Nähe zu Aminosäuren des interagierenden Monomers vorhergesagt (Tabelle 25). Die räumliche Orientierung der Aminosäuren schließt jedoch eine Quervernetzung über an diesen Positionen inkorporiertes AzF mit einem interagierenden Monomer aus (Daten nicht gezeigt). Somit konnte für Tsa1p eine gute Übereinstimmung zwischen Strukturdaten und experimentell induzierten Crosslinks gezeigt werden.

Für die in Bezug auf eine höhere Oligomerisierung von Tsa1p analysierten Positionen konnten ebenfalls Quervernetzungen detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde Proteinlysate des CT Tsa N141X enthaltenden Stammes SPC55 verwendet. Alle Stämme wurden in AzF supplementiertem Medium kultiviert und vor der Zellyse einer UV-Bestrahlung von 30 min bei 365 nm ausgesetzt. Für Position E77X konnte kein spezifisches, höhermolekulares Signal mit dem anti-V5 Antikörper im Western Blot detektiert werden (Abb. 17D, Spur 2). Für Position Y78X konnte ein schwaches Signal bei etwa 48 kDa detektiert werden und für Position T104X wurde eine etwas unterhalb laufende Crosslink-Bande gefunden (Abb. 17D, Spuren 3 und 4). Entsprechend der Kristallstruktur der humanen Thioredoxin Peroxidase ist hier zu erwarten, dass eine Dimerisierung über die Oligomer-Interaktionsfläche stattfindet [de Oliveira, MA *et al.*

2007]. Die Oligomerisierung von Tsa1p in *C. albicans* konnte somit erstmalig *in vivo* gezeigt werden.

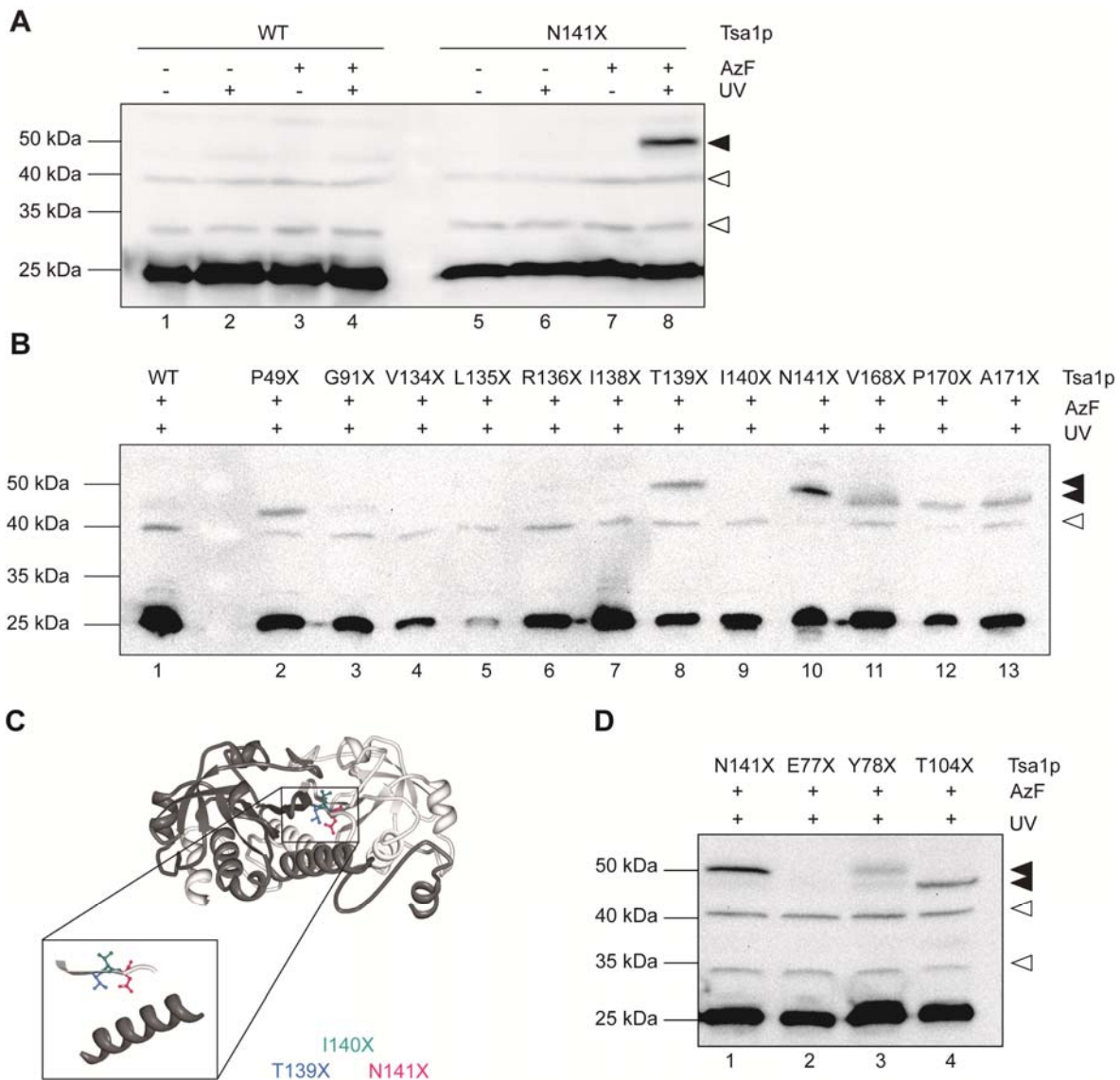


Abb. 17 Induktion von Crosslinks mit Tsa1p Varianten. (A) Expression von Tsa1p WT (SPC46) und Tsa1p N141X in Medium mit und ohne Supplementation von AzF (AzF + und -). Zur Induktion von Crosslinks wurden einige Proben vor der Lyse mit UV-Licht bestrahlt (UV +, Spuren 2,4,6 und 8). Die spezifische Crosslink-Bande von ~48 kDa (Spur 8) ist mit einem schwarzen Dreieck markiert, unspezifische Kreuzreaktionen des anti-V5 Antikörpers mit Proteinen des Lysats sind mit einem weißen Dreieck markiert. (B) Stämme SPC46 (Tsa1p WT) und SPC47 - SPC58 (Tsa1p mutante Varianten) wurden in Medium mit AzF inkubiert (AzF +) und mit UV-Licht bestrahlt (UV +). Die dadurch detektierten, höhermolekularen Crosslink-Banden sind mit schwarzen Dreiecken markiert. Es wurden ein etwas höher migrierender Proteinkomplex (Spuren 8 und 10) und ein etwas niedriger migrierender Proteinkomplex (Spuren 2, 11, 12 und 13) detektiert. Die unspezifische Kreuzreaktion des anti-V5 Antikörpers mit Proteinen des Lysats ist mit einem weißen Dreieck dargestellt. (C) Die CaTsa1p entsprechenden Aminosäurepositionen in der humanen Thioredoxin Peroxidase B (1QMV) sind in blau (T139), grün (I140) und rot (N141) dargestellt. (D) Induktion von Crosslinks über potentiell an der Oligomerisierung von CaTsa1p beteiligte Positionen. Stämme SPC61 (Tsa1p E77X), SPC62 (Tsa1p

Y78X) und SPC64 (Tsa1p T104X), und als Referenz SPC55 (Tsa1p N141X) wurden in Anwesenheit von AzF (AzF +) inkubiert und mit UV-Strahlung behandelt (UV +). Die detektierten spezifischen oberen und unteren Crosslinks sind mit einem schwarzen Dreieck markiert. Unspezifische Kreuzreaktionen des anti-V5 Antikörpers sind mit weißen Dreiecken markiert.

5.2 Crosslink-Induktion mit mutanten Tup1p Varianten

Für die analysierten Tup1p Varianten wurden Crosslinks über AzF bei Einbau an Positionen L63X und A66X gebildet. Die Crosslink-Induktion war wieder strikt abhängig von einer Supplementierung des Mediums mit AzF und anschließender UV-Belichtung (Abb. 18A). Erstaunlicherweise wurden unterschiedliche Crosslink-Produkte an beiden Positionen gefunden. Mutantes Tup1p L63X zeigte zwei höhermolekulare Banden nach AzF Zugabe und UV-Belichtung von etwa 125 kDa und 165 kDa (Abb. 18A, Spur 7). UV-Belichtung von mutantem Tup1p A66X führte zur Detektion einer einzelnen 165 kDa Bande im Western Blot (Abb. 18A, Spur 13). Für die Tup1p Varianten Y61X und L65X wurden unter den experimentellen Bedingungen keine Crosslinks gefunden. In Bezug auf das molekulare Gewicht und die beschriebene Tetramerisierung der N-terminalen Domäne war zumindest für den unteren Crosslink von etwa 125 kDa eine Homodimerisierung wahrscheinlich. Dies wäre wiederum konsistent mit der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von ScTup1p (Abb. 18B). Die L63 entsprechende Aminosäure in ScTup1p zeigt eine Orientierung in Richtung einer anderen Tup1p Kette. Die A66 entsprechende Aminosäure ist mehr nach außen orientiert, während L65 nur eine Position weiter in die gegenüberliegende Richtung zu L63 orientiert ist, also entgegengesetzt zu dem tetrameren Komplex aus Tup1p Monomeren.

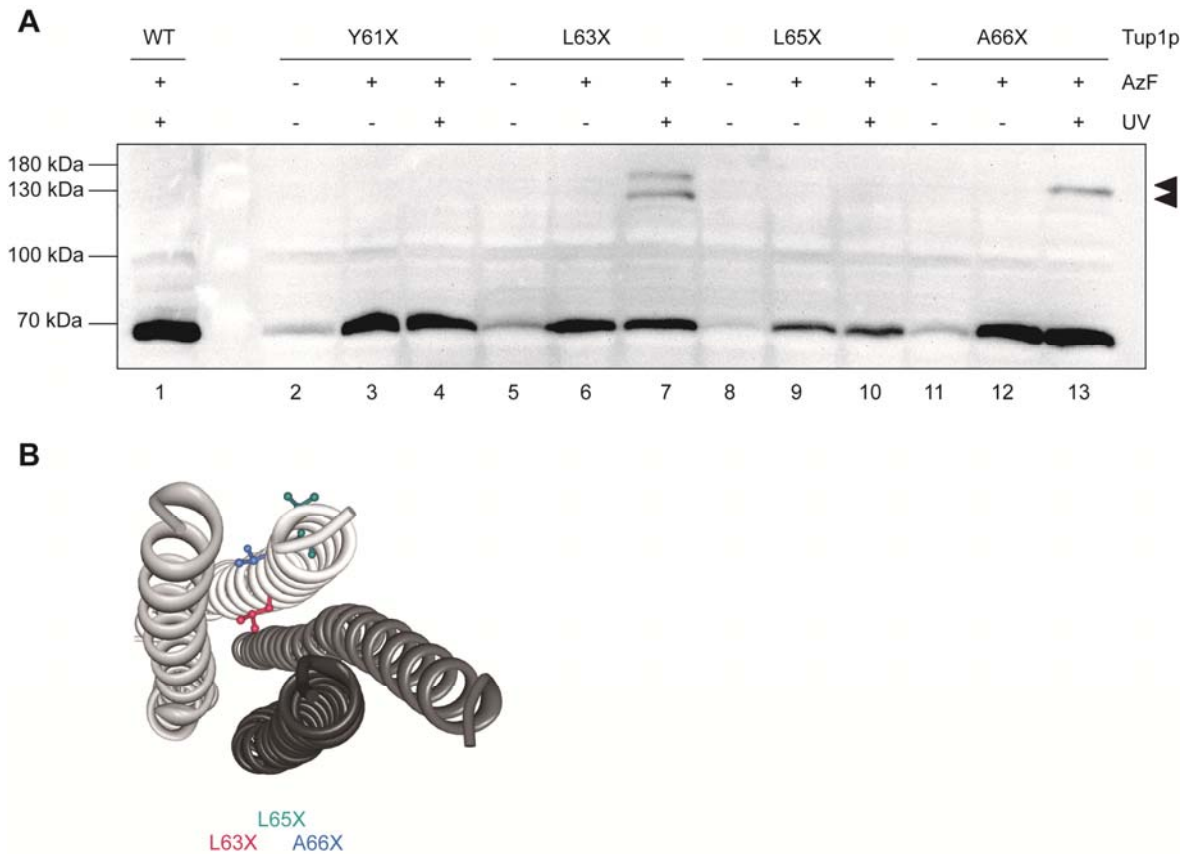


Abb. 18 Crosslink-Induktion mit mutanten Tup1p Varianten. (A) Die Stämme YBC4 (Y61X), YBC6 (L63X), YBC8 (L65X) und YBC9 (A66X) wurden in An- und Abwesenheit von AzF (AzF + und -) inkubiert und teilweise einer UV-Bestrahlung unterzogen (UV + und -). Als Referenz wurde Stamm YBC2 (Tup1p WT) verwendet. Die zwei detektierten höhermolekularen Crosslink-Banden sind mit schwarzen Dreiecken markiert. (B) Struktur der N-terminalen Domäne von ScTup1p (3VP8). Die zu CaTup1p korrespondierenden Aminosäuren sind in rot (L63), grün (L65) und blau (A66) dargestellt.

6. Identifizierung der Interaktionspartner

In einem nächsten Schritt sollten die mit den mutanten Tsa1p und Tup1p Varianten interagierenden Proteine identifiziert werden. Da in beiden Fällen eine Homodimerisierung wahrscheinlich erschien, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt.

Im ersten Ansatz sollte das Homodimer immunologisch detektiert werden durch ein zweites wildtypisches, mit einem HA-Epitop versehenes Molekül Tsa1p oder Tup1p. Dieses zweite Protein wäre im Proteinlysat oder nach Immunpräzipitation nach Crosslink-Induktion über einen HA-Antikörper eindeutig nachweisbar. Dazu wurde das zweite Allel jeweils mit einem wildtypischen Tsa1p oder Tup1p mit HA-Tag ersetzt, so

dass die Stämme SPC55 (CT Tsa N141X), SPC59 (CT Tsa A171X) sowie YBC6 (CT Tup L63X) und YBC9 (CT Tup A66X) hergestellt wurden (Abb. 19A). Wird bei Crosslink-Induktion ein Homodimer aus mutantern, V5-getagten Tsa1p oder Tup1p über AzF mit dem wildtypischen, HA-getagten Tsa1p oder Tup1p quervernetzt, ist dieser höhermolekulare Komplex im Western Blot sowohl mit einem anti-V5 Antikörper als auch mit einem anti-HA Antikörper nachweisbar. Für Tsa1p ist die von AzF und UV-Belichtung abhängige Detektion der zwei höhermolekularen Banden im Proteinlysate mit anti-V5 Antikörper gezeigt (Abb. 19B, linker Western Blot). Außerdem wurde eine Immunpräzipitation über den V5-Tag durchgeführt mit einer anschließenden Detektion der Proteine im Western Blot über den anti-HA Antikörper (Abb. 19B, rechter Western Blot). Hier wurde eindeutig die jeweils zu erwartende höhere Bande bei Position N141X detektiert und die etwas darunter migrierende Bande der Position A171X. Bei dem höhermolekularen Komplex handelt es sich somit für beide Positionen um das erwartete Homodimer aus mutantern Tsa1p und wildtypischem Tsa1p. In der Immunpräzipitation mit anti-V5 Antikörper ist zudem das wildtypische, HA-getagte Monomer angereichert worden (Abb. 19B, rechter Western Blot, Banden bei etwa 25 kDa). Die Ergebnisse, die mit mutantern Tup1p erzielt wurden, sind vergleichbar. Für Position L63X konnten beide höhermolekularen Komplexe nach Immunpräzipitation jeweils mit anti-V5 und anti-HA Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 19C). Position A66X zeigte nach Immunpräzipitation über den anti-HA Antikörper und Detektion mit anti-V5 Antikörper interessanterweise neben der auch im Lysat detektierbaren höher laufenden Bande von etwa 165 kDa (Abb. 19A) auch eine schwache Bande von etwa 125 kDa. Auch bei Tup1p handelt es sich somit bei den quervernetzten Interaktionen um Homodimere aus mutantern Tup1p und wildtypischem Tup1p. Ebenfalls wurde durch Immunpräzipitation mit einem Antikörper jeweils das anders markierte Monomer angereichert (Abb. 19C, Banden bei etwa 65 kDa)

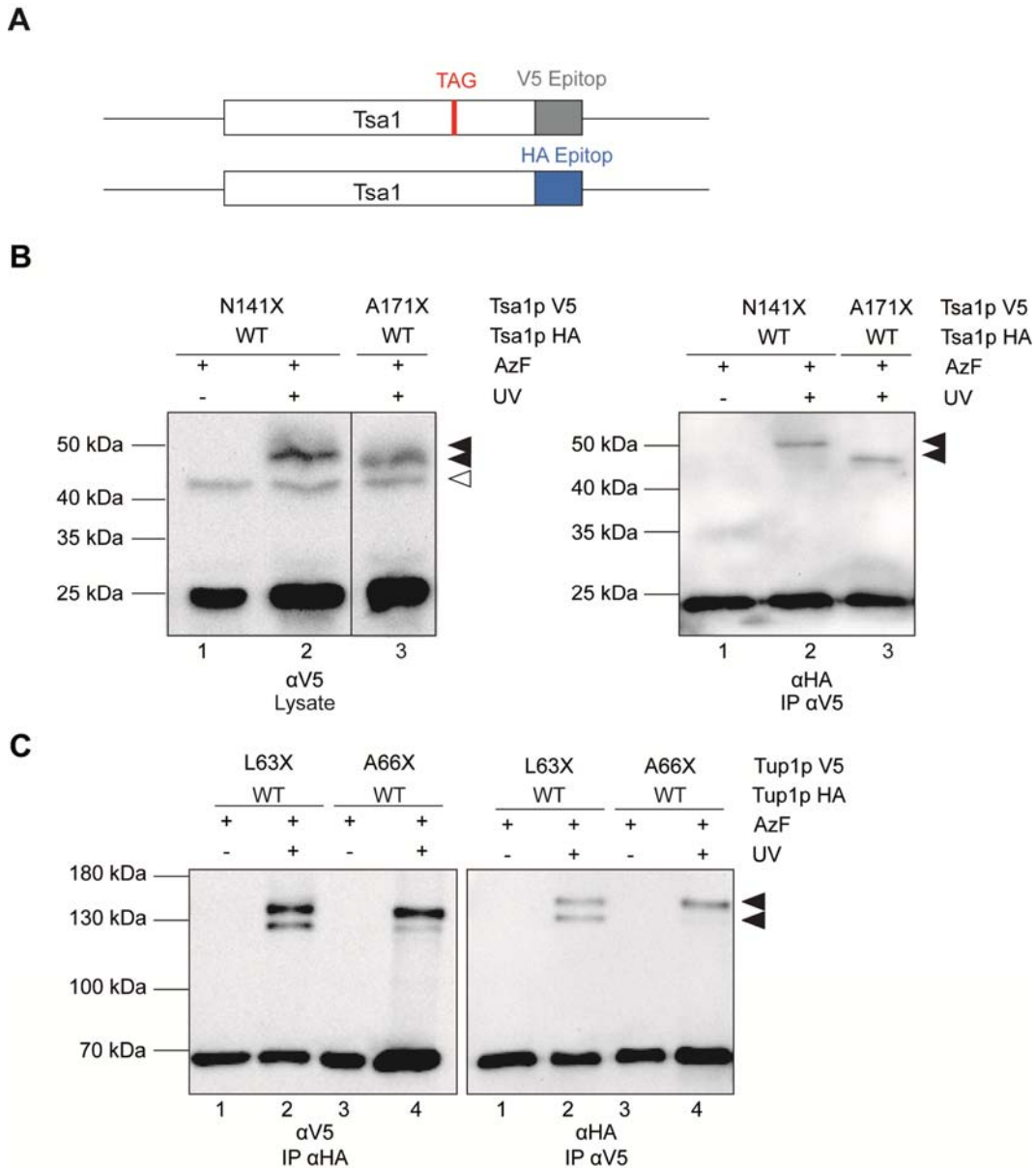


Abb. 19 Immunologische Identifikation der Interaktionspartner. (A) Schematische Darstellung der chromosomalen Integration einer mutanten *TSA1* Variante mit Amber Codon und C-terminalem V5-Epitop auf dem einen Allel und einer wildtypischen *TSA1*-Variante mit einem C-terminalen HA-Epitop auf dem zweiten Allel. Analog wurde auch mit *TUP1*-Varianten verfahren. (B) Detektion des mutanten Tsa1p N141X mit V5-Epitop und des wildtypischen Tsa1p mit HA-Epitop in Stamm SPC59 bzw. Detektion des mutanten Tsa1p A171X mit V5-Epitop und des wildtypischen Tsa1p mit HA-Epitop in Stamm SPC60. Die Inkubation der Stämme erfolgte in An- oder Abwesenheit von AzF (AzF + oder -) und anschließender UV-Bestrahlung (UV +). Für den linken Western Blot wurden Lysate eingesetzt und mit dem anti-V5 Antikörper detektiert. Der rechte Western Blot wurde mit anti-V5 Antikörper immunpräzipitierten Eluaten durchgeführt (IP α V5) und mit dem anti-HA Antikörper ausgewertet. Die schwarzen Dreiecke markieren die spezifischen Crosslink-Banden, das weiße Dreieck markiert die Bande, die durch Kreuzreaktion des anti-V5 Antikörpers mit Proteinen des Lysats hervorgerufen wird. (C) Detektion der mutanten Tup1p Varianten L63X (YBC18) und A66X (YBC19) im Stammhintergrund mit orthogonalem Pärchen und wildtypischem, HA-getagtem Tup1p. Die Inkubation der Stämme erfolgte in An- oder Abwesenheit von AzF (AzF + oder -) und anschließender UV-Bestrahlung (UV +). Für den

linken Western Blot wurden die Proben über das HA-Epitop immunpräzipitiert (IP α Ha) und mit anti-V5 Antikörper detektiert. Im rechten Blot wurden die Proben über das V5-Epitop immunpräzipitiert (IP α V5) und mit anti-HA Antikörper detektiert. Die zu erwartenden Crosslink-Produkte von etwa 125 kDa und 165 kDa sind mit schwarzen Dreiecken markiert.

Als komplementärer Ansatz zur Identifizierung von interagierenden Proteinen sollte eine offene Methode angewandt werden, um zu zeigen, dass auch unbekannte Interaktionspartner zuverlässig detektiert werden können. Zu diesem Zweck sollten die höhermolekularen Crosslinks von Tup1p L63X aufgereinigt werden und massenspektrometrisch analysiert werden. Eine einstufige Aufreinigung über den His₆-Tag mittels Affinitätschromatographie oder immunologisch über den V5-Tag führte jeweils zwar zu guter Anreicherung des Monomers und der Dimere, allerdings entweder nicht in ausreichender Reinheit (His₆-Tag, Abb. 20A) oder ausreichender Menge (V5-Tag, Abb. 20B). Die Aufreinigung über die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie hat den Vorteil, dass die Mengen leicht hochskaliert werden können, während die immunologische Anreicherung sehr saubere Produkte ergibt. Um beide Vorteile optimal nutzen zu können, wurde ein zweistufiges Protokoll entwickelt, in dem nach der Affinitätschromatographie über den His₆-Tag das Eluat für eine Immunpräzipitation mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* (MBL International) eingesetzt wurde. Die zweistufige Aufreinigung resultierte in ausreichenden Mengen aufgereinigter, quervernetzter Proteine (Abb. 20C).

Nach Separierung mittels SDS-PAGE und Ausschneiden aus dem Gel wurden die Proteinbanden tryptisch verdaut und per MALDI-TOF und Nano-LC-ESI-MS/MS analysiert. Da die erhaltenen Abdeckungen mit Nano-LC-ESI-MS/MS deutlich besser waren, werden im Folgenden nur diese Ergebnisse näher erläutert. Die Resultate der MALDI-TOF Analyse sind im Anhang zu finden (Anhang Tabelle und Abb. 32). In der Bande des oberen Crosslinks konnte Tup1p mit einer Abdeckung von 70 % detektiert werden (Abb. 20D oben). Die untere Crosslink-Bande enthielt ebenfalls Tup1p mit einer Abdeckung von 66 % (Abb. 20D unten). In beiden Proben wurden Peptide des V5-Tags identifiziert, die eindeutig mutantern Tup1p zugeordnet werden konnten, ebenso Peptide, die von wildtypischem Tup1p stammten und an Position 63 das ursprüngliche Leucin enthielten (QTVYDLELAHR) (Anhang Tabelle 26). Ein Peptid, das Position 63 in mutantern Tup1p abdeckte und *p*-Azidophenylalanin oder *p*-Aminophenylalanin enthielt, konnte erwartungsgemäß nicht in den quervernetzten

ERGEBNISSE

Proben detektiert werden, da alle enthaltenen mutanten Tup1p über diese Position kovalent gebunden waren.

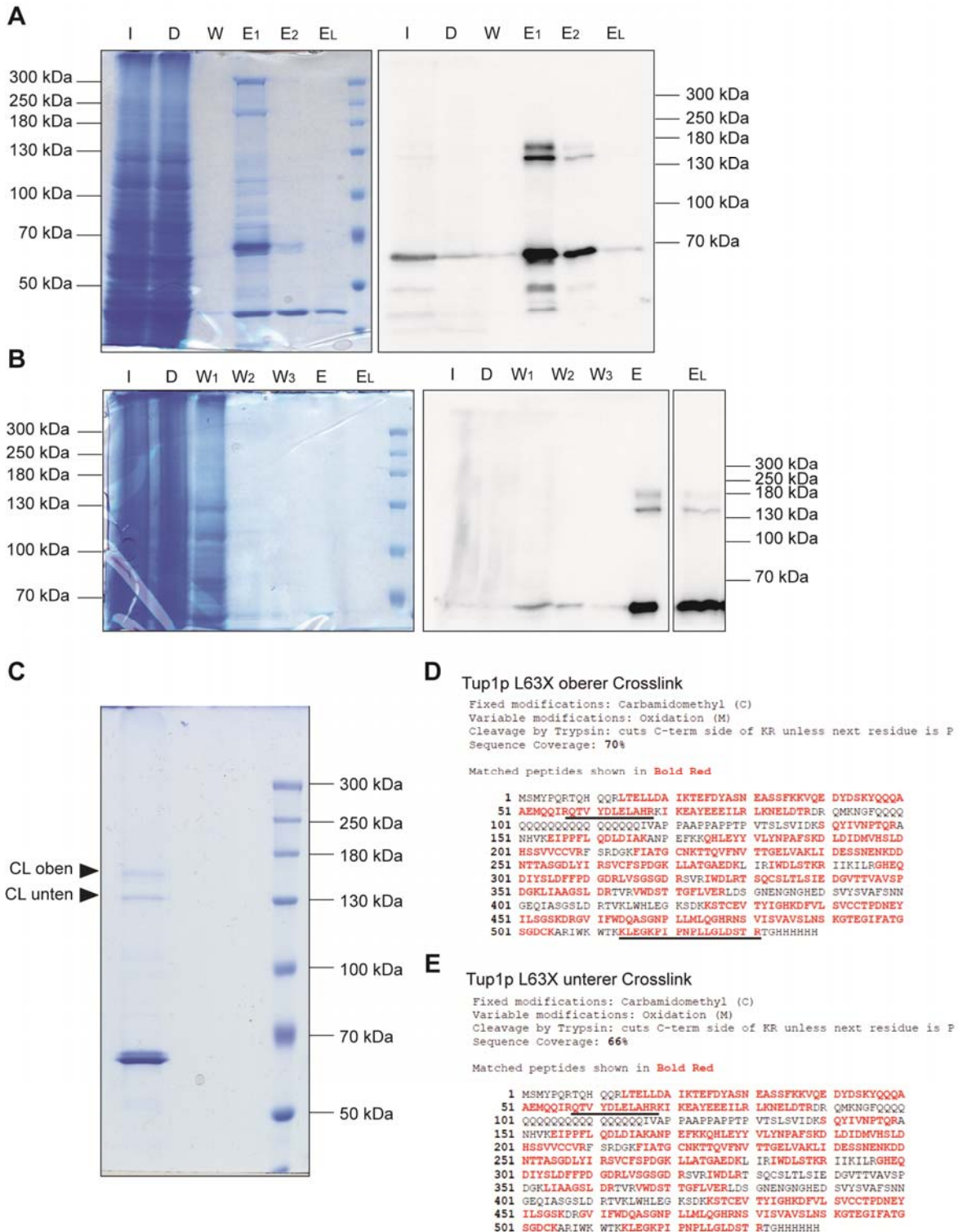


Abb. 20 Aufreinigung von Tup1p L63X und dessen Crosslink-Produkten sowie Identifikation per Nano-LC-ESI-MS/MS. (A) Aufreinigung von monomeren Tup1p L63X und Crosslink-Produkten über den His₆-Tag via Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Proben wurden über Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgels sowie Western Blot mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. Es wurden jeweils

Proben der Fraktionen aus Input (I), Durchfluss (D), Waschschrift (W), erster Elution (E₁), zweiter Elution (E₂) und Elution mit 4-fach Laemmli-Puffer (E_L) aufgetragen. **(B)** Aufreinigung von Tup1p L63X und der Crosslink-Produkte durch Immunpräzipitation über das V5-Epitop. Die Proben wurden über Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele sowie Western Blot mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. Es wurden jeweils Aliquots des Inputs (I), Durchflusses (D), der Waschfraktionen 1-3 (W₁₋₃) und der Elution mit V5-Peptid (E_P) und mit 4-fach Laemmli-Puffer (E_L) aufgetragen. **(C)** Coomassiegefärbte SDS-PAGE von Tup1p L63X und Crosslink-Produkten (CL unten und CL oben, mit schwarzen Dreiecken markiert) nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender Immunpräzipitation über das V5-Epitop. **(D)** Die tryptischen Peptide aus der mittels Nano-LC-ESI-MS/MS analysierten oberen Crosslink-Bande ergaben eine Abdeckung der Tup1 Proteinsequenz mit V5/His₆-Epitopen von 70 %. Die tryptischen Peptide, die aus der unteren Crosslink-Bande erhalten wurden, konnten Tup1p mit V5/His₆-Tag mit einer Sequenzabdeckung von 66 % zugeordnet werden. In beiden Proben wurde ein Peptid gefunden, das Leucin 63 abdeckt (Peptid QTVYDLELAHR) und Peptide, die Teile des V5-Epitops (KLEGKPIPPLLGLDSTR) zugeordnet werden konnten (unterstrichen).

7. Universelle Anwendbarkeit der Methodik

Für eine Anwendung des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* zur Analyse von Protein-Protein Interaktionen sind insbesondere die Interaktionen von wichtigen Virulenzfaktoren von Interesse. Da bei *C. albicans* eine bekannte Verbindung zwischen Virulenz und Morphogenese besteht, wäre ein besonderer Vorteil der Methode, wenn sie unabhängig von der Morphologie in anderen, z.B. hypheninduzierenden Medien anwendbar wäre. Um dies zu prüfen, wurde Stamm SPC55 verwendet, der das orthogonale Pärchen sowie CT Tsa N141X enthält. Stamm SPC55 wurde in den Standardmedien für Blastosporenwachstum SC und YPD bei 30 °C kultiviert, sowie in den hypheninduzierenden Medien αMEM und YPD + 10% FCS bei 37 °C, jeweils mit und ohne Supplementation des Mediums mit AzF. Anschließend wurden die Kulturen mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für 30 min bestrahlt, die Zellen lysiert und die Proteine im Western Blot mit anti-V5 Antikörper analysiert.

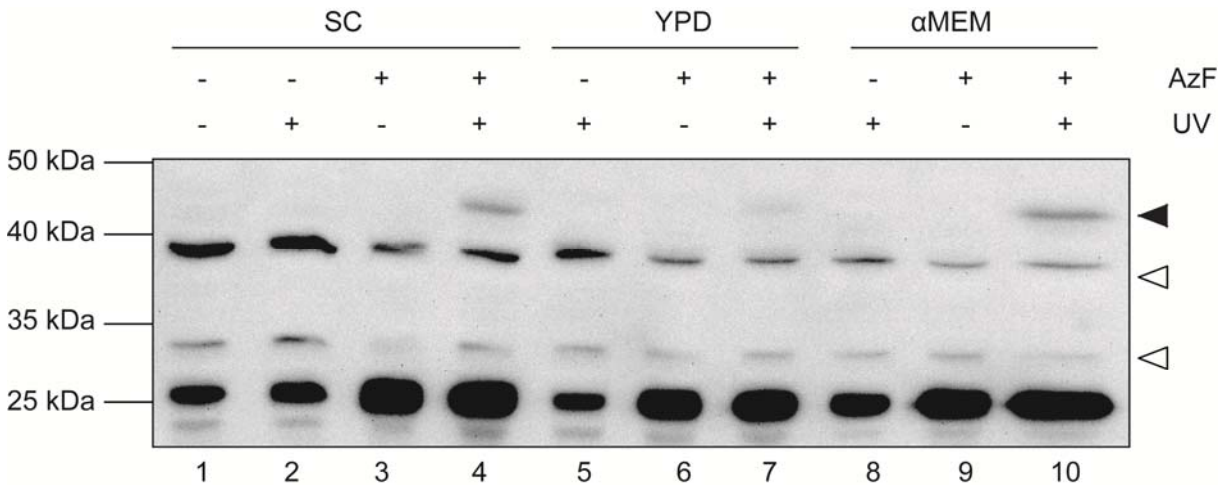


Abb. 21 Crosslink-Induktion in verschiedenen Medien. Stamm SPC55 (Tsa1p N141X) wurde verwendet, um die Crosslink-Induktion in verschiedenen Medien zu prüfen. Es wurden die Blastosporen-induzierenden Medien SC und YPD verwendet (Wachstum bei 30 °C), außerdem das Filamentierung-induzierende Medium αMEM (Wachstum bei 37 °C), jeweils mit und ohne Supplementation von AzF (AzF + und -). Vor der Lyse wurden einzelne Proben mit UV-Licht behandelt (UV + und -). Der spezifische Crosslink ist mit einem schwarzen Dreieck markiert, unspezifische Kreuzreaktionen des anti-V5 Antikörpers sind mit weißen Dreiecken gekennzeichnet.

Im Vergleich zu dem bisher für alle Experimente verwendeten synthetischen Vollmedium SC, findet die spezifische Crosslink-Induktion auch in YPD-Medium sowie in den hypheninduzierenden Medien αMEM (Abb. 21) und YPD + 10 % FCS statt (Daten nicht gezeigt). In Bezug auf die Effizienz der Crosslink-Induktion ist jedoch nur das ebenfalls definierte, hypheninduzierende αMEM-Medium vergleichbar (Abb. 21, Spur 10). Der Crosslink in YPD-Medium sowie YPD + 10 % FCS (Daten nicht gezeigt) ist in der Effizienz deutlich schwächer (Abb. 21, Spur 7). Möglicherweise ist hier eine im Vergleich zu den definierten Aminosäurezusammensetzungen von SC-Medium und αMEM ungünstigere Zusammensetzung an Aminosäuren oder ein Überschuss an natürlichen Aminosäuren gegeben, die beispielsweise den effizienten Transport von AzF aus dem Medium in die Zelle hemmen könnten. Trotz Unterschiede in den einzelnen Medien konnte die Unabhängigkeit zur Morphologie gezeigt werden, so dass die Methode auch unter hyphalen Wachstumsbedingungen stabil anwendbar ist.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Erweiterung des genetischen Codes zur Integration synthetischer Aminosäuren in den humanpathogenen Pilz *C. albicans* nach Anpassungen an dessen molekulare Besonderheiten möglich ist. Es konnte an zwei Modellproteinen gezeigt werden, dass eine *in vivo* Quervernetzung interagierender Proteine durchführbar ist und dadurch

eine offene Identifikation unbekannter Interaktionspartner möglich wird. Gerade auch durch die universelle Anwendbarkeit der Methodik konnte eine wichtige Basis für die Analysen von Protein-Protein Interaktionen und weiterführenden Arbeiten mit dem erweiterten genetischen Code in *C. albicans* gelegt werden, um zu einem besseren Verständnis der molekularen Virulenzmechanismen beizutragen.

DISKUSSION

1. Etablierung und Optimierung von *EcTyr*tRNA_{CUA} und AzF-RS

Für die Etablierung des orthogonalen Pärchens zur Inkorporation von *p*-Azidophenylalanin in Proteine war ein direkter Transfer von *S. cerevisiae* in *C. albicans* nicht möglich. Ein Transfer mit den für *S. cerevisiae* verwendeten regulatorischen Sequenzen des *SUP4* Gens führte in *C. albicans* nicht zu einer Transkription der *EcTyr*tRNA_{CUA}. Dies zeigt, dass die vollständig konservierte B-Box und die partiell konservierte A-Box [Edwards, H *et al.* 1990] für eine Transkription der *EcTyr*tRNA_{CUA} in *S. cerevisiae* zwar ausreichend waren, nicht jedoch in *C. albicans*. Die Abweichungen, die im Vergleich der *EcTyr*tRNA_{CUA} Sequenz mit Konsenselementen von tRNA Genen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* gefunden wurden [Marck, C *et al.* 2006], betreffen zwar die gleichen Positionen der A-Box, nämlich Position 9, 10 und 20b, die bevorzugten Nukleotide an diesen Positionen unterscheiden sich jedoch zumindest für Position 10 und 20b zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae* (s. Anhang Abb. 24). Offenbar hat dieser Grad der Abweichung schon einen Einfluss auf die Transkriptionsinitiation. Während für *S. cerevisiae* bereits die heterologe Expression verschiedener *E. coli* tRNAs gezeigt wurde [Edwards, H *et al.* 1990, Chen, S *et al.* 2007], sind für *C. albicans* keine Daten verfügbar. Der zweite Rückschluss, der durch dieses Ergebnis möglich ist, ist, dass auch die upstream regulierende Sequenz aus *S. cerevisiae* nicht geeignet ist, die Transkription der *EcTyr*tRNA_{CUA} in *C. albicans* zu initiieren. Für upstream regulierende Sequenzen wird in Bezug auf die Transkriptionsinitiation Pol III-regulierter Gene eine mögliche Rolle für eine TFIIIC-unabhängige Rekrutierung des Initiationsfaktors TFIIIB vorgeschlagen [Giuliodori, S *et al.* 2003]. Die Sequenzkonservierung der upstream Regionen ist nur schwach, dennoch wurden für *S. cerevisiae* TATA-ähnliche Elemente sowie weitere konservierte Elemente in Bereichen der 5' flankierenden Regionen von tDNAs gefunden, so dass für unterschiedliche 5' flankierende Regionen ein Einfluss auf die Transkriptabundanz *in vitro* detektiert wurde [Giuliodori, S *et al.* 2003]. Da diese upstream Elemente sich sowohl in Sequenz wie auch in Lokalisation zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* unterscheiden

[Giuliodori, S *et al.* 2003], ist anzunehmen, dass es solche Unterschiede auch für *C. albicans* gibt. Eine heterologe Transkription mit regulierenden *S. cerevisiae* Sequenzen ist dementsprechend offenbar in *C. albicans* nicht möglich. Von den *C. albicans*-spezifischen upstream Sequenzen Pol III-regulierter Gene zeigte die *SNR52* flankierende Region eine zehnfach höhere Transkription der *EcTyrtrRNA_{CUA}*, verglichen mit der *tE_{CUC}* upstream Sequenz. Für die stärkere Transkription ist entweder ein Effekt durch die in der 5' flankierenden Region des *SNR52* Gens enthaltenen A- und B-Boxen auf die Transkriptionsinitiation (vermittelt durch TFIIC) denkbar und/oder durch upstream regulierende Elemente. Im Vergleich zwischen *C. albicans* und *S. cerevisiae* ist die 2000-fach höhere Transkriptmenge der *EcTyrtrRNA_{CUA}* auffällig, die in *S. cerevisiae* durch Expression mit *SUP4* regulatorischen Sequenzen auf einem 2µ Plasmid erzielt wurde. Hier gilt zu bedenken, dass Transkriptquantität und -qualität voneinander abweichen können. Wang *et al.* zeigten, dass eine Expression der *EcTyrtrRNA_{CUA}* in *S. cerevisiae* zu 100-fach höheren Transkriptmengen unter *SUP4* Regulation führte, dass *SNR52* regulierte Transkripte jedoch in der Suppression eines Amber Codons in GFP zu 9-fach höheren Fluoreszenzintensitäten führten [Wang, Q *et al.* 2008]. Die flankierenden Regionen scheinen daher auch wichtig für eine korrekte Prozessierung der pre-tRNA zu sein.

Für die heterologe Expression der AzF-RS war eine vollständige Codon-Anpassung nötig. Die durchgeführte Codon-Anpassung ist in Übereinstimmung mit der Literatur. Für heterolog in *C. albicans* exprimierte Gene wird eine CUG Codon-Optimierung als obligatorisch beschrieben, je nach Zielgen sind weiterführende Anpassungen nötig [Papon, N *et al.* 2012]. Die Optimierung der aberrant translatierten CUG Codons führte zwar zur Transkription, jedoch nicht zur Translation der AzF-RS. Erst nach vollständiger Anpassung an die Codon Usage von *C. albicans* war eine Translation der AzF-RS detektierbar. In diesem Punkt ist eine Abweichung zur Etablierung des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* zu verzeichnen, für die keine Codon-Optimierung zur Translation des *E. coli* Gens nötig war.

Neben der bislang in *S. cerevisiae* verwendeten AzF-RS Variante 3 sind fünf weitere AzF-RS Varianten hinsichtlich ihrer Effizienz in *C. albicans* überprüft worden. Die Quantifizierung erfolgte durch Suppression eines Amber Codons in yeGFP und anschließender Messung der Fluoreszenzintensität, sowie durch direkte Detektion der Anteile beladener und unbeladener *EcTyrtrRNA_{CUA}* in einer AUP mit anschließendem

Northern Blot. Aus diesen Experimenten lassen sich in Bezug auf die Beladungseffizienzen der AzF-RS Varianten die wichtigsten Ergebnisse festhalten: Sowohl im GFP Fluoreszenzassay, wie im Northern Blot wurde eine verbesserte Effizienz von AzF-RS Variante 1 gegenüber AzF-RS Variante 3 deutlich. AzF-RS Variante 4 zeigte keine spezifische Aminoacylierung der *EcTyr*tRNA_{CUA}. AzF-RS Variante 3 zeigte in *S. cerevisiae* und *C. albicans* vergleichbare Aminoacylierungsraten. Für die erreichten Aminoacylierungsraten lässt sich zunächst festhalten, dass diese für die mutante AzF-RS deutlich geringer waren, als für natürliche aaRS. Die mutante, codon-optimierte AzF-RS wurde im Rahmen dieser Arbeit entsprechend der Aminosäuren des aktiven Zentrums zu einer codon-optimierten, in *C. albicans* exprimierbaren TyrRS mutagenisiert. Für diese TyrRS, die die natürliche Aminosäure Tyrosin transferiert, war eine Aminoacylierung der *EcTyr*tRNA_{CUA} von annähernd 100% zu verzeichnen (s. Anhang Abb. 25). Für *S. cerevisiae* sind in publizierter Literatur bislang nur AzF-RS Varianten 1 und 3 beschrieben worden [Chin, JW *et al.* 2003a, Chen, S *et al.* 2007], ein Vergleich zwischen beiden wurde nicht durchgeführt. Nehring *et al.* haben in ihrer Studie darüber hinaus AzF-RS Variante 6 eingeschlossen [Nehring, S *et al.* 2012]. Da jedoch in dieser Studie keine erfolgreiche Expression der Gene möglich war, soll sie hier nicht berücksichtigt werden. Überraschenderweise ist AzF-RS 4 nach dem Screen für funktionelle Varianten der TyrRS für AzF in der Liste mit aufgeführt worden [Chin, JW *et al.* 2003a]. Dies lässt sich mit den hier gefundenen Ergebnissen nicht in Übereinstimmung bringen. Ursache dafür könnte möglicherweise das Selektionsverfahren sein, das auf ein Überleben der *S. cerevisiae* Zellen ausgerichtet war. Zudem wurde die Effizienz der Amber Suppression nicht direkt quantifiziert, sondern als Ergebnis der Proteinfunktion von Gal4p. Interessanterweise weicht die als effizienter quantifizierte AzF-RS Variante 1 in nur einer Aminosäure der substratspezifität-vermittelnden Aminosäuren von Variante 3 ab. Alanin an Position 183 ist in AzF-RS Variante 1 durch ein Methionin ersetzt. Bei beiden Aminosäuren handelt es sich um unpolare, hydrophobe Aminosäuren, Methionin ist dabei größer als Alanin und weist eine Methylthioethergruppe auf. Die verbesserte Bindung an AzF könnte somit zum einen sterische Ursachen haben, oder aus stärkeren Van-der-Waals-Wechselwirkungen, bedingt durch die größere Aminosäure, resultieren [Kobayashi, T *et al.* 2005, Young, DD *et al.* 2011].

Für den verwendeten GFP-Fluoreszenzassay hat sich gezeigt, dass der dynamische Bereich der Methode in dem hier analysierten Zusammenhang eingeschränkt war. Zudem erfolgte die Normierung auf GFP, das ohne ein Amber Codon exprimiert wurde. Für eine Vergleichbarkeit der maximal an dieser Position möglichen Suppressionsrate mit einer natürlichen Aminosäure wäre eine Expression des yeGFP N149X in Verbindung mit der *Ec*TyrtRNA_{CUA} und der *E. coli* Tyrosyl-tRNA-Synthetase geeigneter gewesen. Für die verwendeten AzF-RS Varianten war, bis auf den Stamm mit AzF-RS 1, keine Unterscheidung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von AzF möglich. Für die meisten der anderen AzF-RS war die gemessene Fluoreszenz sogar in Abwesenheit von AzF höher. Für AzF-RS 1 wurde im GFP-Fluoreszenzassay eine etwa dreifache Steigerung durch Zugabe von AzF beobachtet, im Northern Blot der AUP lag der Unterschied in der spezifischen Beladung nur etwa bei 20 %. Die Identität einer Aminosäure an einer bestimmten Position im Protein kann unter Umständen Einfluss auf dessen Funktionalität haben. Ein direkter Nachweis der Aminoacylierung der tRNAs ist daher in jedem Fall aussagekräftig und sollte einem indirekten Nachweis vorgezogen werden.

2. Orthogonalität des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans*

Als Orthogonalität wird die Spezifität und funktionelle Unabhängigkeit der Komponenten des erweiterten genetischen Codes in einem heterologen System bezeichnet. Der Begriff wurde im biologischen Kontext erstmalig im Zusammenhang der Vorarbeiten für die Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli* verwendet [Liu, DR *et al.* 1997a, Liu, DR *et al.* 1997b, Liu, DR *et al.* 1999] und bezieht sich in erster Linie auf die heterologe tRNA und die heterologe aaRS, die beide zusammen als orthogonales Pärchen bezeichnet werden. Eine tRNA gilt als ortholog, wenn sie kein Substrat für eine endogene aaRS ist, sondern nur mit der evolvierten aaRS und der Translationsmaschinerie der Wirtszelle interagiert. Zudem darf nur das entsprechende „freie“ Codon spezifisch zum Anticodon decodiert werden, nicht jedoch kanonische Codons. Für die mutante aaRS gilt Orthogonalität, wenn nur die orthogonale tRNA mit der synthetischen Aminosäure beladen wird und Kreuzreaktionen mit endogenen tRNAs und natürlichen Aminosäuren auszuschließen

sind. Nach diesen Kriterien sind die *EcTyrtrRNA_{CUA}* und zugehörige Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* für die Anwendung in *S. cerevisiae* konstruiert und selektiert worden [Chin, JW *et al.* 2003a, Chin, JW *et al.* 2003b]. Neben tRNA und aaRS lässt sich der Orthogonalitätsbegriff zudem auf die synthetische Aminosäure ausweiten, da auch hier keine unerwünschten Kreuzreaktionen stattfinden sollen, um den Wirtsorganismus so minimal wie möglich zu beeinflussen. Im Folgenden soll diskutiert werden, inwiefern die Ansprüche an die Orthogonalität der Komponenten des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* erfüllt sind.

2.1 *EcTyrtrRNA_{CUA}* und AzF-RS

Zunächst lässt sich für die heterologe Expression des orthogonalen Pärchens festhalten, dass für *C. albicans* keine Effekte auf Morphologie und Wachstum zu beobachten waren. Auch globale Transkriptionsdaten des Stammes SPC43 zeigten weder einen Einfluss des orthogonalen Pärchens, noch Effekte durch Supplementation des Mediums mit AzF, verglichen mit dem klinischen Isolat SC5314 (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurden für *S. cerevisiae* wachstumshemmende, toxische Effekte sowohl durch Überexpression der *EcTyrtrRNA_{CUA}* gezeigt [Chen, S *et al.* 2007, Berg, M 2013], wie auch durch Supplementation des Mediums mit AzF [Berg, M 2013]. Da sich die Abundanzen der *EcTyrtrRNA_{CUA}* zwischen beiden Spezies kaum vergleichen lassen, lassen sich hier nur schwerlich Aussagen treffen. Bezogen auf die Inkubation mit AzF scheint *C. albicans* jedoch toleranter zu sein.

Die Interaktion zwischen AzF-RS und *EcTyrtrRNA_{CUA}* wurde in Form von Fluoreszenzmessung einer Amber Codon enthaltenden yeGFP Variante sowie Auftrennung beladener und unbeladener tRNAs in einer AUP mit anschließendem Northern Blot quantifiziert. Für alle verwendeten Stämme wurde im GFP-Fluoreszenzassay und im Northern Blot eine unspezifische Beladung der tRNA bzw. unspezifische Amber Codon Suppression in Abwesenheit von AzF ersichtlich. Diese Hintergrund-Beladung der tRNA konnte auch detektiert werden, wenn keine Co-Expression einer funktionellen AzF-RS stattfand. Es ist daher davon auszugehen, dass die *EcTyrtrRNA_{CUA}* in Abwesenheit einer AzF-RS und/oder AzF von einer oder mehreren endogenen aaRS in *C. albicans* beladen wird.

Über die Identität der fehlbeladenen Aminosäure lassen sich Rückschlüsse durch Analyse der supprimierten Proteine treffen. Aus Arbeiten von Edwards *et al.* ist

bekannt, dass bei starker Überexpression der *EcTyr*tRNA_{CUA} in Verbindung mit Zelllysaten von *S. cerevisiae* eine Aminoacylierung der tRNA mit Leucin stattfinden kann [Edwards, H *et al.* 1991]. Chen *et al.* konnten durch quantitative massenspektrometrische Analysemethoden einen Fehleinbau verschiedener Aminosäuren für das orthogonale Pärchen in *S. cerevisiae* nachweisen [Chen, S *et al.* 2007]. Insgesamt machte die Fehlbeladung in Anwesenheit der synthetischen Aminosäure nur einen geringen Prozentsatz (<6%) aus. Für die AzF-RS 3 wurden jeweils zu ähnlichen Anteilen Misinkorporationen von Tryptophan, Leucin und Glutaminsäure gefunden. Die Integration von Glutaminsäure lässt sich durch *wobble*-Suppression des Amber Codons durch die *S. cerevisiae* Glutaminsäure-tRNA_{GUC} erklären [Weiss, WA *et al.* 1986, Edelman, I *et al.* 1991]. Die Fehlintegration von Tryptophan und Leucin wird von den Autoren auf die Verwendung der Auxotrophie-Marker *TRP1* und *LEU2* im Selektionssystem für die AzF-RS zurückgeführt, die einen Anstieg von Tryptophan und Leucin in der Zelle bewirken können. Aus diesem Grund ist die Selektion der AzF-RS Varianten möglicherweise nicht vollständig gegen Leucin- und Tryptophan-Aktivität erfolgt [Chen, S *et al.* 2007]. Für *C. albicans* wurden in der Nano-LC-ESI-MS/MS für das Tup1p L63X Monomer für Position 63 hauptsächlich Peptide gefunden, die *p*-Aminophenylalanin enthielten. In deutlich weniger Peptiden wurde eine Misinkorporation von Tryptophan und zu noch geringerem Anteil der Fehleinbau von Phenylalanin und Glutaminsäure gefunden. Bezüglich Tryptophan und Glutaminsäure zeigt sich somit eine Übereinstimmung. Da die Analysen nicht auch separat für die *EcTyr*tRNA_{CUA} durchgeführt wurden, lässt sich über den Anteil der Fehlbeladung, verursacht durch endogene aaRS oder AzF-RS nur spekulieren. Da sich die unterschiedlichen AzF-RS Varianten jedoch in der unspezifischen Beladung in Abwesenheit der synthetischen Aminosäure unterscheiden (vgl. Abb. 8), könnte dies auf eine Beteiligung der AzF-RS an der Fehlbeladung hindeuten. Dies wäre mit den Daten von Chen *et al.* vereinbar, da hier für verschiedene aaRS Varianten Unterschiede in der Identität der misinkorporierten Aminosäuren detektiert wurden.

2.2 Das Amber Codon

Das Amber Codon ist in die ursprüngliche Definition der Orthogonalität nicht miteinbezogen worden. Bei dem Amber Codon handelt es sich zwar nicht um ein aminosäurecodierendes Codon, dennoch ist das Amber Codon ein natürlich im

Genom vorkommendes Codon. In *C. albicans* terminiert das Amber Codon 29 % der ORFs. Das Ochre Codon (UAA) kommt mit einer Häufigkeit von 54 % vor und das Opal Codon (UGA) mit einer Häufigkeit von 17 % (*Candida Genome Database, Codon Usage Table*). Im Vergleich dazu terminiert das Amber Codon in *S. cerevisiae* als seltenstes der drei Stop Codons nur 23 % der ORFs (*Saccharomyces Genome Database, Codon Usage Table*). Für *C. albicans* werden somit etwa ein Drittel aller proteincodierender Gene mit einem Amber Codon terminiert. In *C. albicans* kommen keine natürlichen Suppressor-tRNAs vor, möglicherweise gibt es, wie für *S. cerevisiae* beschrieben [Weiss, WA *et al.* 1986, Edelman, I *et al.* 1991], einen sehr geringen Anteil an Amber Suppression durch die Glutaminsäure-tRNA_{CAG}. Wenn überhaupt, ist diese jedoch sehr gering. Im Western Blot wurde keine Suppression des Amber Codons in der Translation der in dieser Arbeit verwendeten Proteine (Tsa1p, Tup1p, yeGFPp) in Abwesenheit der *EcTyr*tRNA_{CUA} detektiert (Daten nicht gezeigt). Durch Expression einer Suppressor-tRNA in Kombination mit einer aaRS, welche diese aminoacylieren kann, wie mit dem orthogonalen Pärchen für AzF geschehen, können theoretisch 30 % der Proteine in *C. albicans* während der Translation artifiziell elongiert werden. Dies kann gravierende Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben, wie für das Wachstum von *E. coli* und *S. cerevisiae* gezeigt. In *C. albicans* konnten solche Wachstumsdefekte nicht beobachtet werden. Möglicherweise spielen hierbei die in *E. coli* und *S. cerevisiae*, nicht jedoch für *C. albicans* verwendbaren Plasmidsysteme eine Rolle, die in hohen Kopienzahlen in der Zelle vorliegen können und somit zur stärkeren Expression der Zielgene beitragen. Auf molekularer Ebene waren die Auswirkungen des *stop codon readthrough* jedoch nachweisbar. In der Staudinger-Ligation wurde die Inkorporation von AzF in Proteinlysaten von Stämmen, welche das orthogonale Pärchen exprimierten, in An- und Abwesenheit von AzF durch kovalente Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an AzF detektiert (vgl. Abb. 16). Dabei zeigte sich, dass in Proteinlysaten von Zellen, die zuvor mit AzF inkubiert wurden, etliche Proteine aller molekularen Massen fluoreszenzmarkiert wurden. Das bedeutet, dass es tatsächlich vermittelt durch die *EcTyr*tRNA_{CUA} zu einem unspezifischen Überlesen terminaler Amber Codons kommt. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* scheinen für *C. albicans* jedoch keine negativen Effekte daraus zu folgern.

Vermeidbar wäre eine solche unspezifische Fehlinkorporation von AzF nur durch Verwendung eines einzigartigen Codons. Vor allem in dem Bestreben, mehr als eine synthetische Aminosäure in ein Protein integrieren zu können, sind bereits verschiedene Ansätze für die alternative Codierung durch Quadruplet Codons oder Codons mit synthetischen Basen entwickelt worden [Bain, JD *et al.* 1992, Anderson, JC *et al.* 2004, Hirao, I *et al.* 2004]. Die Verwendung von Quadruplet Codons wurde für *E. coli* im Zusammenhang mit dem erweiterten genetischen Code entwickelt. Quadruplet Codons bringen jedoch grundsätzlich die gleichen Nachteile mit sich, wie das Amber Codon. Auch Quadruplet Codons können in endogenen Transkripten unspezifisch decodiert werden. Um diesen Faktor zu minimieren und gleichzeitig die Ausbeute an mutanten Proteinen zu steigern, wurden für *E. coli* orthogonale Ribosomen entwickelt, die eine verbesserte Affinität zur mRNA des Zielproteins sowie zur orthogonalen tRNA zeigen [Wang, K *et al.* 2007, Neumann, H *et al.* 2010]. Eine solche Entwicklung ist für Eukaryoten jedoch aufgrund der höheren Komplexität der eukaryotischen Translation schwer realisierbar. Die Anwendung von unnatürlichen Basenpaarungen neben den A-T und C-G Paaren in mRNA und tRNA ist zwar ein vielversprechender Ansatz bezüglich der Selektivität, derzeit sind jedoch nur *in vitro* Experimente möglich [Bain, JD *et al.* 1992, Hirao, I *et al.* 2004]. Darüber hinaus muss die Synthese von mRNA und tRNA mit unnatürlichen Basen sehr aufwändig chemisch durchgeführt werden, was die effiziente Anwendung *in vivo* derzeit verhindert. Eine weitere Möglichkeit, einzigartige Codons zu erhalten, ist die Neuordnung degenerierter Codons oder Stop Codons zu Sinn-Codons. Die Neuordnung von Codons ist generell möglich und auch schon für natürliche und synthetische Aminosäuren gezeigt worden [Mukai, T *et al.* 2010]. Soll die Inkorporation jedoch nur an einer Position stattfinden, müssten alle weiteren, in anderen ORFs verwendete Codons ausgetauscht werden. Dieses Problem ist umgehbar durch Synthese ganzer Genome, während der gezielt ein oder sogar mehrere Codons mit synonymen Codons ersetzt werden, so dass sie für eine Neuordnung zu synthetischen Aminosäuren frei sind [Liu, CC *et al.* 2010]. Das erste synthetische Genom ist für *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0 generiert worden [Gibson, DG *et al.* 2008], laut Liu und Schultz wird derzeit auch an einem *S. cerevisiae* synthetischen Genom gearbeitet [Liu, CC *et al.* 2010].

2.3 Bedeutung der Orthogonalität für die Anwendung des erweiterten genetischen Codes

Für die Orthogonalität der Komponenten des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* lässt sich zusammenfassen, dass die *EcTyrRNA_{CUA}* als nicht vollständig orthogonal betrachtet werden kann. Weiterhin kommt es vermutlich zu einer Beteiligung der evolvierten Synthetasen an der Fehlbeladung der *EcTyrRNA_{CUA}* sowie zu einer möglichen Fehlsuppression des Amber Codons durch Glutaminsäure-tRNA_{CAG}. Für die synthetische Aminosäure AzF lassen sich aus der Staudinger-Ligation keine Rückschlüsse hinsichtlich eines möglichen Fehleinbaus durch endogene Synthetasen in Abwesenheit von *EcTyrRNA_{CUA}* und AzF-RS ziehen, es findet jedoch durch die *EcTyrRNA_{CUA}* ein unspezifischer Fehleinbau an terminierenden Amber Codons anderer proteincodierender Transkripte statt. Die Tatsache, dass eine Supplementation des Mediums von *C. albicans* mit AzF nicht zu Defekten in Wachstum, Morphologie oder Transkription führt, deutet auf die Kompatibilität der synthetischen Aminosäure mit *C. albicans* hin.

Bezogen auf die Anwendung des erweiterten genetischen Codes in *C. albicans* bedeutet dies, dass bedingt durch die verringerte Orthogonalität der *EcTyrRNA_{CUA}* etwas geringere Proteinmengen zu erwarten sind, welche die synthetische Aminosäure enthalten. Dies beeinträchtigt jedoch nicht die Nutzung von AzF zur Induktion von Quervernetzungen zwischen interagierenden Proteinen, da eine Quervernetzung nur in Abhängigkeit von AzF möglich ist. Für eine Korrektur der unspezifischen Integration von AzF besteht kein dringender Bedarf, da in den hier analysierten Bedingungen keine globalen Auswirkungen auf *C. albicans* detektierbar sind. Die Kreuzreaktivität der *EcTyrRNA_{CUA}* mit endogenen aaRS könnte durch gezielte Mutagenese der Identitätselemente der tRNA verbessert werden [Hughes, RA *et al.* 2010]. Auch eine weitere Evolvierung der AzF-RS wäre denkbar. Für die Anwendung im Säugersystem konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Mutagenese einer mit der tRNA interagierenden Aminosäure der AzF-RS zu einer signifikant verbesserten Affinität der AzF-RS zur tRNA und dadurch zu verbesserten Ausbeuten mutanter Proteine führte [Takimoto, JK *et al.* 2009].

3. Einbau der synthetischen Aminosäure AzF in Zielproteine

Wird während der Translation am Ribosom ein Stop Codon erreicht, erkennt normalerweise der eukaryotische Release Faktor (eRF1) dieses Stop Codon und bindet im Komplex mit eRF3 an die A-Stelle des Ribosoms. Durch GTP-Hydrolyse, vermittelt durch eRF3, wird die Polypeptidkette von der noch in der P-Stelle gebundene tRNA abgelöst, anschließend wird das Ribosom dissoziiert und entweder für die Translation des gleichen Transkriptes oder eines anderen Transkriptes „recycled“ [Jackson, RJ *et al.* 2012]. Für den Einbau synthetischer Aminosäuren durch Nonsense-Suppression bedeutet dies konkret eine Konkurrenzsituation zwischen aminoacylierter Suppressor-tRNA und eRF1 am Ribosom [Stansfield, I *et al.* 1995, Drugeon, G *et al.* 1997]. Demzufolge ist für Transkripte, die ein internes Amber Codon enthalten, nur mit einem Teil der Proteinausbeute im Vergleich zu Transkripten ohne internes Stop-Codon zu rechnen (ca. 20 - 50 %) [Chin, JW *et al.* 2003a, Young, TS *et al.* 2009]. Erschwerend kommt hinzu, dass in Eukaryoten Transkripte mit internem Stop Codon durch *nonsense mediated decay* (NMD) vorzeitig abgebaut werden können [Culbertson, MR *et al.* 2005]. Für *S. cerevisiae* Stämme, in denen Komponenten des NMD entfernt wurden, konnten deutlich höhere Syntheseraten von Proteinen mit Amber Codon erreicht werden [Wang, Q *et al.* 2008]. Für die Expression von mutanten Tsa1p und Tup1p Varianten in *C. albicans* konnte eine gegenüber wildtypischen Konstrukten deutlich reduzierte Proteinmenge detektiert werden. Generell scheint es jedoch nicht nötig zu sein, Komponenten des NMD in den Stämmen auszuschalten, um für Analysen ausreichende Proteinmengen zu erhalten. Weiterhin konnte ein Effekt der Position des Stop Codons auf die Transkriptmenge beobachtet werden, der für Tsa1p deutlicher sichtbar war. Vermutlich ist die Menge an supprimiertem Protein daher nicht nur abhängig von der Identität des Zielproteins, sondern auch von der substituierten Aminosäure. Dies ist wahrscheinlich auf Codon-Kontext Effekte der benachbarten Codons zurückzuführen, die vor allem in Kombination mit einem Stop Codon stärker ausgeprägt sein können [Murgola, EJ *et al.* 1984, Phillips-Jones, MK *et al.* 1995]. Für manche Positionen (Tup1p D62X und E64X) war überhaupt kein supprimiertes Protein detektierbar. Da für diese Stämme die korrekte Integration der Konstrukte durch PCR und Southern Blot überprüft wurde, ist wahrscheinlich, dass dieser Effekt ebenfalls auf den Codon-Kontext an diesen Positionen zurückzuführen ist. Auch die unspezifische Misinkorporation natürlicher

Aminosäuren in Abwesenheit der synthetischen Aminosäure war zum einen proteinabhängig (in Tsa1p deutlich stärkere unspezifische Suppression als in Tup1p) und positionsabhängig (vgl. z.B. Tsa1p P49X und G91X). Aus den Daten der Nano-LC-ESI-MS/MS, den Western Blots sowie der Konjugation mit einem fluoreszenzmarkierten Phosphin ist ableitbar, dass trotz eines geringen Anteils Fehlinkorporation natürlicher Aminosäuren überwiegend AzF spezifisch in die Proteine integriert wird.

4. Induktion von Quervernetzungen

Wie gezeigt werden konnte, ist die Induktion von Quervernetzungen sehr spezifisch nur für Proteine mit AzF-Inkorporation und nach UV-Belichtung detektierbar. Crosslinks können zudem nur von einzelnen Positionen induziert werden, bedingt durch die räumliche Nähe, die zwischen AzF und einem interagierenden Molekül bestehen muss. Zum einen verhindert diese Voraussetzung die Detektion von falsch-positiven Interaktionen, zum anderen lässt sie sich nutzen, um die Interaktion auf die Aminosäure genau zu charakterisieren [Grunbeck, A *et al.* 2011, Grunbeck, A *et al.* 2012]. Für Tsa1p konnten von 12 Positionen der Dimerisierungsdomäne sechs Quervernetzungen zu dem interagierenden Monomer detektiert werden. Von drei Aminosäuren, die möglicherweise relevant für die Oligomerisierung in Tsa1p sind, konnten für zwei davon höhermolekulare Komplexe gezeigt werden. Substitutionen der Aminosäuren T139, I140 und N141 ergaben gute Übereinstimmungen zwischen experimentell induzierten Quervernetzungen und den Strukturdaten, wobei dies nicht notwendigerweise in allen Fällen zutreffen muss, da zum einen Strukturdaten meist auf rekombinant exprimierten Proteinen beruhen und zum anderen der Austausch einer Aminosäure eines Proteins mitunter starke Auswirkungen auf Tertiär- und Quartärstruktur haben kann. Für heterologe Interaktionen sind grundsätzlich selten Strukturdaten verfügbar, insofern war die Etablierung der Methode auch unabhängig von verfügbaren 3D Strukturen ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Interessanterweise waren zwei unterschiedlich migrierende Proteinkomplexe für verschiedene Positionen von Tsa1p detektierbar. Bei diesen Proteinkomplexen handelte es sich in beiden Fällen um Homodimere, wie durch immunologischen Nachweis gezeigt werden konnte. Von Tsa1p bzw. dem *S. cerevisiae* Homolog ist bekannt, dass durch

unterschiedliche Konfigurationen der Dimere zueinander und die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken unterschiedlich migrierende Komplexe in nicht-reduzierenden Proteingelen detektiert werden können [Chae, HZ *et al.* 1994, Urban, C *et al.* 2005, Brachhold, M 2011]. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei den für mutante Tsa1p Varianten beobachteten unterschiedlich migrierenden Dimeren um durch kovalente Quervernetzung stabilisierte Komplexe handelt. Die Position des induzierten Crosslinks scheint dabei einen Einfluss darauf zu haben, welches Dimer quervernetzt wird. Möglicherweise hat auch schon der Einbau der synthetischen Aminosäure an dieser Position einen Einfluss darauf, welche Art von Dimer überhaupt gebildet werden kann. Dass diese Dimere allerdings auch für Oligomerisierungspositionen beobachtet wurden, könnte dafür sprechen, dass durch die kovalente Quervernetzung zweier Tsa1p Moleküle eine vollständige Entfaltung und gleichmäßige SDS-Bindung während der Gelelektrophorese verhindert wird, so dass die elektrophoretische Mobilität analog zu Disulfidbindungen positiv oder negativ beeinflusst werden kann [Pitt-Rivers, R *et al.* 1968, Griffith, IP 1972, Steele, JC, Jr. *et al.* 1978]. Je nach Position der Quervernetzung können sich die Effekte somit unterscheiden.

Für Tup1p führte nur die Substitution der Positionen 63 und 66 zur Induktion von Quervernetzungen. Da jedoch Positionen 62 und 64 überhaupt kein mutantes Protein generierten, konnte somit für zwei aus vier Positionen der N-terminalen Domäne eine Quervernetzung gezeigt werden. Auch für Tup1p sind zwei unterschiedlich migrierende Proteinkomplexe nach Crosslink-Induktion beobachtet worden, hier allerdings sogar für die gleiche Position. Am deutlichsten waren beide Crosslink-Banden für die Quervernetzung von Position L63 nachweisbar. Nach Immunpräzipitation konnte die zusätzliche untere Bande jedoch auch für Tup1p A66X detektiert werden. Da auch hier für beide Proteinkomplexe eine Dimerisierung von Tup1p nachgewiesen werden konnte, ist das Migrationsverhalten der oberen Crosslink-Bande etwas überraschend. Das apparente Molekulargewicht der oberen Crosslink-Bande liegt etwa bei 165 kDa, das der unteren Bande bei etwa 125 kDa. Mit 165 kDa liegt das apparente Molekulargewicht der oberen Crosslink-Bande deutlich über dem zu erwartenden Molekulargewicht von zwei interagierende Tup1p Monomeren (*in silico* Kalkulation Tup1p wt 57,8 kDa; Tup1p mit C-terminalem V5/His₆-Tag 60,6 kDa). Vermutlich ist dieses ungewöhnliche Laufverhalten in der

reduzierenden SDS-PAGE auf die gleichen Effekte der Position der kovalenten Bindung auf die Entfaltung und SDS-Bindung der Proteine zurückzuführen, die für Tsa1p bereits diskutiert wurden. Dass für Tup1p L63X und etwas weniger deutlich auch für Tup1p A66X zwei Crosslink Banden an einer Position detektiert wurden, lässt möglicherweise auf eine gewisse sterische Flexibilität der Aminosäure an dieser Position schließen. Möglicherweise kann durch Einbau von AzF an dieser Position somit ein Crosslink zu unterschiedlichen Aminosäuren eines interagierenden, wildtypischen Tup1p Monomers ausgebildet werden, oder sogar zu unterschiedlichen Tup1p Monomeren. Durch genaue Bestimmung der Massen der höhermolekularen Crosslinks könnte geprüft werden, ob es sich hier tatsächlich um zwei unterschiedlich migrierende Homodimere handelt, oder ob möglicherweise auch Modifikationen eine Rolle spielen könnten.

5. Biologische Relevanz der detektierten Interaktionen

Bei der Identifizierung der Interaktionspartner konnten erfolgreich zwei verschiedene methodische Ansätze realisiert werden. Beide Ansätze führten zu einer eindeutigen Identifizierung der höhermolekularen Komplexe als Homodimere, bestehend aus einem mutanten Protein und einem wildtypischen Protein. Für Tsa1p war durch Substitution der Aminosäuren der Monomer-Monomer-Interaktionsdomäne und der Dimer-Dimer-Interaktionsdomäne von Oligomeren zu erwarten, dass die Quervernetzung von mutanten Tsa1p Varianten zu einer Detektion von interagierendem Tsa1p führen würde.

Für Tup1p war die Detektion einer homologen Interaktion ebenfalls naheliegend, da die N-terminale Domäne bereits als Homotetramerisierungsdomäne beschrieben wurde. Die N-terminale Domäne von ScTup1p ist ebenfalls als Interaktionsdomäne mit ScSsn6p beschrieben worden [Tzamarias, D *et al.* 1994, Jabet, C *et al.* 2000]. Durch Mutation von L62 in ScTup1p wird die Interaktion mit Ssn6p aufgehoben, daher war es nicht überraschend, für die korrespondierende Aminosäure in CaTup1p L63X keine Interaktion zu CaSsn6p zu finden. Jedoch wäre für die flankierenden Regionen potentiell ein Crosslink zu Ssn6p möglich gewesen. Kaneko *et al.* konnten für CaTup1p durch *Tandem Affinity Purification* die Interaktion zu CaSsn6p zeigen, und konnten als weiteres interagierendes Protein CaTcc1p identifizieren [Kaneko, A *et al.*

2006]. Da die Wachstumsbedingungen vergleichbar waren (Blastosporen-Morphologie) ist die fehlende Interaktion möglicherweise auf die Identität der substituierten Aminosäure zurückzuführen. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung über AzF hängt von der genauen Lokalisierung und Orientierung im Verhältnis zum integrierenden Protein ab, insofern könnte ein Grund auch sein, dass nur 4 Positionen tatsächlich bezüglich einer Crosslink-Induktion analysiert wurden. Die für die Interaktion mit ScSsn6p charakterisierte N-terminale Domäne ist 72 bp groß, daher könnte die Substitution weiterer Aminosäuren möglicherweise erfolgreicher sein.

Ein weiterer Grund, dass keine Interaktion zu CaSsn6p detektiert wurde, könnte eine Strukturveränderung von CaTup1p durch Inkorporation der synthetischen Aminosäure sein. Von Matsumura *et al.* wurde nicht nur die Struktur der N-terminalen Domäne von ScTup1p aufgeklärt (NTD Tup1p), sondern auch die Struktur der mutanten L62R N-terminalen Domänen (NTD Tup1p-L62R) [Matsumura, H *et al.* 2012]. Beachtlicherweise zeigte NTD Tup1p-L62R eine veränderte Struktur, in der nicht mehr zwei Dimere aus antiparallelen Helices miteinander assoziiert sind, sondern zwei Dimere aus parallel angeordneten Helices. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Substitution von L63 mit AzF zu einer strukturellen Veränderung führt, die möglicherweise die Bindung zu CaSsn6p beeinflusst. Aus den folgenden Gründen trifft dies jedoch wahrscheinlich nicht zu: (1) Die beobachtete Interaktion von mutantern Tup1p L63X findet nicht mit einem zweiten, mutantern Tup1p L63X statt, sondern mit wildtypischem Tup1p. Daher ist davon auszugehen, dass die Konformation eines Komplexes aus drei wildtypischen Tup1p mit einem mutantern Tup1p, verglichen mit einem Homotetramer aus vier mutanten ScTup1p L62R, nicht so stark beeinträchtigt sein sollte. (2) Die Substitution von L63 wurde in CaTup1p mit der ebenfalls hydrophoben Aminosäure AzF durchgeführt, im Gegensatz zu dem positiv geladenen Arginin, das in *S. cerevisiae* NTD Tup1p-L62R ausgetauscht wurde. Interessanterweise zeigte die Substitution von L62 in ScTup1p mit einem ebenfalls hydrophoben Valin einen deutlich gemäßigteren Effekt auf die Repression von Zielgenen und davon abgeleitet auf die Interaktion mit ScSsn6p [Matsumura, H *et al.* 2012]. Die Analyse der Zielgenrepression in den mutanten Tup1p L63X *C. albicans* Stämmen nach Deletion des wildtypischen *TUP1*-Allels könnte Aufschluss über die

Struktur und Funktionalität von mutantern Tup1p im Repressorkomplex mit CaSsn6p geben.

Bezüglich der physiologischen Effekte des Einbaus synthetischer Aminosäuren in Proteine sind nur begrenzt Daten verfügbar. Die meisten Proteine, die bisher für die Inkorporation von synthetischen Aminosäuren verwendet wurden, waren heterolog (z. B. Superoxid-Dismutase (SOD) [Chen, S *et al.* 2007], Glutathion-S-Transferase (GST) [Chin, JW *et al.* 2002a], GFP [Wang, Q *et al.* 2008] und Myoglobin [Young, TS *et al.* 2010a]), da sie lediglich als *proof of concept* oder zur Methodenoptimierung verwendet wurden. Es gibt jedoch auch einige Beispiele, in der die Funktion der Proteine nach Einbau der synthetischen Aminosäure evaluiert wurde. So wurde durch die Integration synthetischer Aminosäuren weder die Dimerisierung der GST verhindert [Chin, JW *et al.* 2002c], die Bindung von Liganden an ihren Rezeptor [Chin, JW *et al.* 2002c, Grunbeck, A *et al.* 2011, Grunbeck, A *et al.* 2012] noch die Proteinstruktur und damit Lumineszenz von GFP beeinträchtigt [Wang, Q *et al.* 2008, Young, TS *et al.* 2010a]. Die Selektion der evolvierten Synthetasen war von der Funktion von mutantern Gal4p abhängig [Chin, JW *et al.* 2003a, Chin, JW *et al.* 2003b, Wang, Q *et al.* 2008, Young, TS *et al.* 2010a]. Auch die Funktion des *Shigella flexneri* Säurestress-Chaperons shHdeA blieb erhalten. In der gleichen Studie wurde jedoch für das sekretierte Toxin OspF eine positionsabhängige Hemmung der Dephosphorylierungs-Aktivität gefunden [Lin, S *et al.* 2011]. Die nicht funktionellen Mutationen betrafen direkt das aktive Zentrum der Phosphatase OspF. Für die *E. coli* Uricase wurde ebenfalls eine positionsspezifische Hemmung der Enzymaktivität beobachtet [Chen, M *et al.* 2008], die Varianten des menschlichen Wachstumshormon (hGH) zeigten hingegen fast alle eine gute Aktivität [Cho, H *et al.* 2011]. Bezogen auf *C. albicans* ist anzunehmen, dass die Dimerisierung mit den wildtypischen Varianten von Tsa1p bzw. Tup1p als Indiz für eine physiologische Proteinfunktion der mutanten Varianten zu werten ist. Unterstützend für diese Hypothese ist zudem die Co-Präzipitation von jeweils wildtypischen, HA-getagten Monomeren von Tsa1p oder Tup1p zu werten. Zu beachten ist jedoch, dass obwohl die Gene von ihrem endogenen Promotor reguliert werden, bedingt durch das Stop Codon je nach Position eine stark reduzierte Ausbeute mutanter Proteins resultieren kann. Während somit die Regulationsmechanismen grundsätzlich erhalten bleiben sollten, kann es möglicherweise zu Gendosis-Effekten kommen. Für die Anwendung in *C. albicans*

sollte daher beachtet werden, ob eine Reduktion der Proteinmengen in der Zelle zu derartigen Effekten führen könnte und dass für katalytische Aktivität benötigte Aminosäuren von der Substitution ausgenommen werden.

6. Universelle Anwendbarkeit der Methodik

Die Induktion von Crosslinks war auch nach Inkubation von *C. albicans* in anderen Medien möglich. Nach Kultivierung in YPD oder YPD + 10 % FCS war die Ausbeute an quervernetzten Dimeren jedoch deutlich geringer. Dies ist vermutlich weniger auf die Morphologie zurückzuführen, da in α MEM eine Crosslink-Induktion trotz filamentösen Wachstums möglich war. Der Effekt scheint eher aus der Zusammensetzung des Mediums zu resultieren. Bei dem für bisherige Crosslink-Versuche verwendeten SC-Medium handelt es sich um ein genau definiertes Medium, ebenso wie bei α MEM. Für YPD-Medium wird hingegen Hefeextrakt verwendet, der eine undefinierbare Zusammensetzung hat. Möglicherweise kommt es durch höhere intrazelluläre Konzentrationen natürlicher Aminosäuren zu einer stärkeren unspezifischen Suppression, vermittelt durch die AzF-RS oder endogene aaRS. Als weitere Möglichkeit wäre denkbar, dass durch den starken Überschuss an natürlichen Aminosäuren diese auch gegenüber AzF bevorzugt ins Cytosol transportiert werden und dadurch die intrazelluläre Konzentration von AzF reduziert sein könnte, was ebenfalls zu einer verstärkten unspezifischen Suppression führen könnte. Falls diese Hypothese zutreffen sollte, könnte eine spezifische Integration von AzF auch in Vollmedium möglicherweise durch Erhöhung der AzF-Konzentration im Medium erreicht werden. Für *E. coli* ist beispielsweise bekannt, dass in Vollmedium eine höhere Fehlsuppression des Amber Codons in Abwesenheit der synthetischen Aminosäure stattfindet, bedingt durch verstärkte Misacylierung der tRNA durch die evolvierte aaRS [Young, TS *et al.* 2010a]. Für *S. cerevisiae* wurde ein Einfluss der Löslichkeit der synthetischen Aminosäure auf die Reinheit des mutanten Proteins gezeigt, da für *p*-Benzoylphenylalanin ein Zusammenhang zwischen schlechter Löslichkeit und hohen Fehlinkorporationsraten natürlicher Aminosäuren besteht [Chen, S *et al.* 2007].

7. Mögliche Weiterentwicklungen und Anwendungsfelder

Zunächst lässt sich zusammenfassen, dass der erweiterte genetische Code in *C. albicans* für die Detektion unbekannter, schwacher und transienter binärer Interaktionen *in vivo* sehr gut geeignet ist. Besonders die hohe Spezifität, durch die falsch-positive Interaktionen ausgeschlossen werden, macht die Methode zu einem wertvollen Instrument zur Studie von Protein-Protein Interaktionen. Die Möglichkeit zur Hochskalierung, zur Aufreinigung und zur offenen Detektion der kovalent verbundenen Wechselwirkungen zeigt großes Potential für die Charakterisierung von wichtigen Interaktionen in *C. albicans*. Verbesserungspotential besteht in der Orthogonalität des verwendeten Pärchens aus tRNA und aaRS, wodurch eine selektivere und effizientere Einbaurate in Proteine zu erwarten wäre. Ein möglicher Nachteil der Methodik ist, dass nicht jede Aminosäureposition eines Proteins für die Crosslink-Induktion geeignet ist. Dadurch, dass bereits benachbarte Aminosäuren sich hinsichtlich ihrer Eignung zur Crosslink-Induktion unterscheiden können, ist es sehr wichtig, genau die richtige Position zu „treffen“. Je nach Proteingröße und verfügbaren Informationen über Proteinstruktur oder Daten aus Literatur oder *in silico*-Analysen bezüglich funktioneller Domänen, kann sich eine Auswahl geeigneter Positionen als schwierig gestalten. Eine erfolgreiche Anwendung des erweiterten genetischen Codes ist in diesem Fall mit dem größeren Aufwand verbunden, entsprechend mehr Positionen des Proteins zu überprüfen. Verbunden mit unspezifischeren Methoden zur Vorselektion wäre dieses Problem jedoch eingrenzbar. Denkbar wären Deletionskonstrukte des Zielproteins in phänotypischen Studien, *Yeast-Two-Hybrid* Experimenten oder Affinitätsaufreinigungsmethoden zur Eingrenzung von Interaktionsdomänen. Eine andere Möglichkeit wäre der Einsatz von ungerichteten Crosslinker-Chemikalien oder -Aminosäuren, um mögliche Interaktionspartner bereits im Vorfeld einzugrenzen und dann gezielt zu charakterisieren. Im Bezug auf die Studie von *in vivo* Protein-Interaktionen wäre eine weitere Charakterisierung der Methode bezüglich ihrer Kompatibilität mit verschiedenen Kultivierungsmöglichkeiten ebenfalls vorteilhaft, um den Anwendungsbereich weiter ausdehnen zu können.

Möglichkeiten für die weitere Anwendung des genetischen Codes in *C. albicans* bezüglich der Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen sind nach der

generellen Funktionalität der Methode naheliegend. In diesem Zusammenhang bietet sich an, weitere Positionen von Tup1p bezüglich ihrer Interaktion zu Ssn6p oder anderen Interaktionspartnern zu charakterisieren. Auch die Arbeit an anderen Virulenzfaktoren, wie weiteren Transkriptionsfaktoren, sekretierten oder zellwandgebundenen Virulenzfaktoren, wäre vielversprechend im Hinblick auf das Verständnis der molekularen Pathogenitätsmechanismen von *C. albicans*. Insbesondere auch die Analyse in Modellen der Wirt-Pathogen Interaktion wäre ein vielversprechender Anwendungsbereich für den erweiterten genetischen Code in *C. albicans*. Da die Methodik des erweiterten genetischen Codes nicht nur für die Analyse von Protein-Protein Interaktionen geeignet ist, bietet sich auch an, z.B. DNA-Bindestudien mit Virulenzfaktoren durchzuführen, oder die Bindung von antifungalen Wirkstoffen an ihre Effektoren zu charakterisieren.

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Optimierungen des orthogonalen Pärchens wäre darüber hinaus die schnelle Erweiterung des genetischen Codes von *C. albicans* um weitere synthetische Aminosäuren möglich. So wäre beispielsweise die Addition von fluoreszierenden Aminosäuren zum genetischen Code von *C. albicans* hilfreich für Lokalisationsstudien, bei denen die Proteine im Gegensatz zu bislang verwendeten Fusionskonstrukten nur minimalst verändert würden. Nicht zuletzt wird das Spektrum an synthetischen Aminosäuren stetig erweitert, wodurch neue Anwendungsmöglichkeiten für die Proteinbiochemie zu erwarten sind.

LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, JC, Wu, N, Santoro, SW, Lakshman, V, King, DS and Schultz, PG (2004) An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7566-7571.

Argimon, S, Fanning, S, Blankenship, JR and Mitchell, AP (2011) Interaction between the *Candida albicans* high-osmolarity glycerol (HOG) pathway and the response to human beta-defensins 2 and 3. *Eukaryot Cell* **10**(2): 272-275.

Ashley, ESD, Lewis, R, Lewis, JS, Martin, C and Andes, D (2006) Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clinical Infectious Diseases* **43**(Supplement 1): S28-S39.

Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA and Struhl, K (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons.

Baginski, M, Czub, J and Sternal, K (2006) Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. *Chem Rec* **6**(6): 320-332.

Bain, JD, Switzer, C, Chamberlin, AR and Benner, SA (1992) Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code. *Nature* **356**(6369): 537-539.

Baker, RE, Gabrielsen, O and Hall, BD (1986) Effects of tRNA^{Tyr} point mutations on the binding of yeast RNA polymerase III transcription factor C. *J Biol Chem* **261**(12): 5275-5282.

Banerjee, M, Thompson, DS, Lazzell, A, Carlisle, PL, Pierce, C, Monteagudo, C, Lopez-Ribot, JL and Kadosh, D (2008) UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* **19**(4): 1354-1365.

Bayer, E (1991) Towards the Chemical Synthesis of Proteins *Angewandte Chemie International Edition in English* **30**(2): 113-216.

Bennett, RJ and Johnson, AD (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* **22**(10): 2505-2515.

Berg, M (2013). Anwendung des erweiterten genetischen Codes zur Studie von molekularen Wechselwirkungen in *S. cerevisiae*. Universität Stuttgart: 170.

Berggard, T, Linse, S and James, P (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**(16): 2833-2842.

Berlinguet, L, Begin, N, Babineau, LM and Laferte, RO (1962a) Biochemical studies of an unnatural and antitumor amino acid: 1-aminocyclopentanecarboxylic acid. II. Effects on cellular respiration and amino acid metabolism. *Can J Biochem Physiol* **40**: 433-436.

Berlinguet, L, Begin, N, Babineau, LM, Martel, F, Vallee, R and Laferte, RO (1962b) Biochemical studies of an unnatural and antitumor amino acid: 1-aminocyclopentanecarboxylic acid. I. Toxicity and tissue distribution. *Can J Biochem Physiol* **40**: 425-432.

- Biswas, S, Van Dijck, P and Datta, A (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(2): 348-376.
- Blackwell, C and Brown, JD (2009) The application of tandem-affinity purification to *Candida albicans*. *Methods Mol Biol* **499**: 133-148.
- Boysen, JH, Fanning, S, Newberg, J, Murphy, RF and Mitchell, AP (2009) Detection of protein-protein interactions through vesicle targeting. *Genetics* **182**(1): 33-39.
- Brachhold, M (2011). Lokalisation von Tsa1p, einem thiol-spezifischen Antioxidant-ähnlichen Protein aus *Candida albicans* und dessen Einfluss auf die Wirt-Pathogen-Interaktion. Universität Stuttgart, Fraunhofer Verlag: 154.
- Braglia, P, Percudani, R and Dieci, G (2005) Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J Biol Chem* **280**(20): 19551-19562.
- Brajtburg, J, Powderly, WG, Kobayashi, GS and Medoff, G (1990) Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(2): 183-188.
- Brand, A, MacCallum, DM, Brown, AJ, Gow, NA and Odds, FC (2004) Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell* **3**(4): 900-909.
- Braun, BR and Johnson, AD (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**(5322): 105-109.
- Braun, BR and Johnson, AD (2000) TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**(1): 57-67.
- Braun, BR, Kadosh, D and Johnson, AD (2001) NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *EMBO J* **20**(17): 4753-4761.
- Brown, AJ and Gow, NA (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**(8): 333-338.
- Brown, DH, Jr., Slobodkin, IV and Kumamoto, CA (1996) Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol Gen Genet* **251**(1): 75-80.
- Brown, T, Mackey, K and Du, T (2004) Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 4**: Unit 4 9.
- Bruno, VM, Wang, Z, Marjani, SL, Euskirchen, GM, Martin, J, Sherlock, G and Snyder, M (2010) Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res* **20**(10): 1451-1458.
- Buffo, J, Herman, MA and Soll, DR (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**(1-2): 21-30.
- Cabrera, H, Skoczupole, L, Marini, M, Della Giovanna, P, Saponaro, A and Echeverria, C (2002) Necrotizing gangrene of the genitalia and perineum. *Int J Dermatol* **41**(12): 847-851.

- Calderone, RA (2002). *Candida and candidiasis*, Amer Society for Microbiology.
- Calderone, RA and Fonzi, WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**(7): 327-335.
- Cannon, RD, Jenkinson, HF and Shepherd, MG (1992) Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **235**(2-3): 453-457.
- Cappelletty, D and Eiselstein-McKittrick, K (2007) The echinocandins. *Pharmacotherapy* **27**(3): 369-388.
- Care, RS, Trevethick, J, Binley, KM and Sudbery, PE (1999) The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**(4): 792-798.
- Carrico, PM and Zitomer, RS (1998) Mutational analysis of the Tup1 general repressor of yeast. *Genetics* **148**(2): 637-644.
- Chae, HZ, Uhm, TB and Rhee, SG (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 7022-7026.
- Chandrasekar, P (2011) Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *J Antimicrob Chemother* **66**(3): 457-465.
- Chatterjee, A, Sun, SB, Furman, JL, Xiao, H and Schultz, PG (2013a) A Versatile Platform for Single- and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*.
- Chatterjee, A, Xiao, H, Yang, PY, Soundararajan, G and Schultz, PG (2013b) A Tryptophanyl-tRNA Synthetase/tRNA Pair for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *E. coli*. *Angew Chem Int Ed Engl*.
- Chen, M, Cai, L, Fang, Z, Tian, H, Gao, X and Yao, W (2008) Site-specific incorporation of unnatural amino acids into urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **17**(10): 1827-1833.
- Chen, PR, Groff, D, Guo, J, Ou, W, Cellitti, S, Geierstanger, BH and Schultz, PG (2009) A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(22): 4052-4055.
- Chen, S, Schultz, PG and Brock, A (2007) An improved system for the generation and analysis of mutant proteins containing unnatural amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **371**(1): 112-122.
- Cheng, S, Nguyen, MH, Zhang, Z, Jia, H, Handfield, M and Clancy, CJ (2003) Evaluation of the roles of four *Candida albicans* genes in virulence by using gene disruption strains that express URA3 from the native locus. *Infect Immun* **71**(10): 6101-6103.
- Chin, JW, Cropp, TA, Anderson, JC, Mukherji, M, Zhang, Z and Schultz, PG (2003a) An expanded eukaryotic genetic code. *Science* **301**(5635): 964-967.
- Chin, JW, Cropp, TA, Chu, S, Meggers, E and Schultz, PG (2003b) Progress toward an expanded eukaryotic genetic code. *Chem Biol* **10**(6): 511-519.

- Chin, JW, Martin, AB, King, DS, Wang, L and Schultz, PG (2002a) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichiacoli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11020-11024.
- Chin, JW, Santoro, SW, Martin, AB, King, DS, Wang, L and Schultz, PG (2002b) Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. *J Am Chem Soc* **124**(31): 9026-9027.
- Chin, JW and Schultz, PG (2002c) In vivo photocrosslinking with unnatural amino Acid mutagenesis. *Chembiochem* **3**(11): 1135-1137.
- Cho, H, Daniel, T, Buechler, YJ, Litzinger, DC, Maio, Z, Putnam, AM, Kraynov, VS, Sim, BC, Bussell, S, Javahishvili, T, Kaphle, S, Viramontes, G, Ong, M, Chu, S, Becky, GC, Lieu, R, Knudsen, N, Castiglioni, P, Norman, TC, Axelrod, DW, Hoffman, AR, Schultz, PG, DiMarchi, RD and Kimmel, BE (2011) Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9060-9065.
- Choi, HJ, Kang, SW, Yang, CH, Rhee, SG and Ryu, SE (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**(5): 400-406.
- Choi, MH, Sajed, D, Poole, L, Hirata, K, Herdman, S, Torian, BE and Reed, SL (2005) An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol Biochem Parasitol* **143**(1): 80-89.
- Ciliberto, G, Raugei, G, Costanzo, F, Dente, L and Cortese, R (1983) Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase iii. *Cell* **32**(3): 725-733.
- Cohen, SN, Chang, AC and Hsu, L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-2114.
- Coin, I, Perrin, MH, Vale, WW and Wang, L (2011) Photo-cross-linkers incorporated into G-protein-coupled receptors in mammalian cells: a ligand comparison. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**(35): 8077-8081.
- Cormack, BP, Bertram, G, Egerton, M, Gow, NA, Falkow, S and Brown, AJ (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2): 303-311.
- Corvey, C, Koetter, P, Beckhaus, T, Hack, J, Hofmann, S, Hampel, M, Stein, T, Karas, M and Entian, KD (2005) Carbon Source-dependent assembly of the Snf1p kinase complex in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **280**(27): 25323-25330.
- Cox, DM, Du, M, Guo, X, Siu, KW and McDermott, JC (2002) Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells. *Biotechniques* **33**(2): 267-268, 270.
- Crick, FH (1966) The genetic code--yesterday, today, and tomorrow. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **31**: 1-9.
- Culbertson, MR and Neeno-Eckwall, E (2005) Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **11**(9): 1333-1339.

d'Enfert, C (2009) Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* **12**(4): 358-364.

De Backer, MD, Magee, PT and Pla, J (2000) Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **54**: 463-498.

de Oliveira, MA, Genu, V, Discola, KF, Alves, SV, Netto, LE and Guimaraes, BG (2007) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a decameric form of cytosolic thioredoxin peroxidase 1 (Tsa1), C47S mutant, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**(Pt 8): 665-668.

Deane, CM, Salwinski, L, Xenarios, I and Eisenberg, D (2002) Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 349-356.

Deiters, A, Cropp, TA, Mukherji, M, Chin, JW, Anderson, JC and Schultz, PG (2003) Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Chem Soc* **125**(39): 11782-11783.

Deiters, A, Cropp, TA, Summerer, D, Mukherji, M and Schultz, PG (2004) Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg Med Chem Lett* **14**(23): 5743-5745.

DeRisi, JL, Iyer, VR and Brown, PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**(5338): 680-686.

Dieci, G, Percudani, R, Giuliodori, S, Bottarelli, L and Ottonello, S (2000) TFIIC-independent in vitro transcription of yeast tRNA genes. *J Mol Biol* **299**(3): 601-613.

Dorman, G and Prestwich, GD (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* **18**(2): 64-77.

Dugeon, G, Jean-Jean, O, Frolova, L, Le Goff, X, Philippe, M, Kisselev, L and Haenni, AL (1997) Eukaryotic release factor 1 (eRF1) abolishes readthrough and competes with suppressor tRNAs at all three termination codons in messenger RNA. *Nucleic Acids Res* **25**(12): 2254-2258.

Dunn, TF and Leach, FR (1967) Incorporation of p-fluorophenylalanine into protein by a cell-free system. *J Biol Chem* **242**(11): 2693-2699.

Edelman, I and Culbertson, MR (1991) Exceptional codon recognition by the glutamine tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **10**(6): 1481-1491.

Edmondson, DG, Smith, MM and Roth, SY (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* **10**(10): 1247-1259.

Edwards, H and Schimmel, P (1990) A bacterial amber suppressor in *Saccharomyces cerevisiae* is selectively recognized by a bacterial aminoacyl-tRNA synthetase. *Mol Cell Biol* **10**(4): 1633-1641.

Edwards, H, Trezeguet, V and Schimmel, P (1991) An *Escherichia coli* tyrosine transfer RNA is a leucine-specific transfer RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(4): 1153-1156.

- Ellman, JA (1992) Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins. *Methods in Enzymology*(202): 301-336.
- Ernst, JF (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146** (Pt 8): 1763-1774.
- Escher, E and Schwyzer, R (1974) p-Nitrophenylalanine, p-azidophenylalanine, m-azidophenylalanine, and o-nitro-p-azido-phenylalanine as photoaffinity labels. *FEBS Lett* **46**(1): 347-350.
- Fields, S and Song, O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230): 245-246.
- Fonzi, WA and Irwin, MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**(3): 717-728.
- Forler, D, Kocher, T, Rode, M, Gentzel, M, Izaurralde, E and Wilm, M (2003) An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat Biotechnol* **21**(1): 89-92.
- Furter, R (1998) Expansion of the genetic code: site-directed p-fluoro-phenylalanine incorporation in *Escherichia coli*. *Protein Sci* **7**(2): 419-426.
- Galli, G, Hofstetter, H and Birnstiel, ML (1981) Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* **294**(5842): 626-631.
- Garcia-Sanchez, S, Mavor, AL, Russell, CL, Argimon, S, Dennison, P, Enjalbert, B and Brown, AJ (2005) Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**(6): 2913-2925.
- Gavin, AC, Aloy, P, Grandi, P, Krause, R, Boesche, M, Marzioch, M, Rau, C, Jensen, LJ, Bastuck, S, Dumpelfeld, B, Edelmann, A, Heurtier, MA, Hoffman, V, Hoefert, C, Klein, K, Hudak, M, Michon, AM, Schelder, M, Schirle, M, Remor, M, Rudi, T, Hooper, S, Bauer, A, Bouwmeester, T, Casari, G, Drewes, G, Neubauer, G, Rick, JM, Kuster, B, Bork, P, Russell, RB and Superti-Furga, G (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**(7084): 631-636.
- Gibson, DG, Benders, GA, Andrews-Pfannkoch, C, Denisova, EA, Baden-Tillson, H, Zaveri, J, Stockwell, TB, Brownley, A, Thomas, DW, Algire, MA, Merryman, C, Young, L, Noskov, VN, Glass, JI, Venter, JC, Hutchison, CA, 3rd and Smith, HO (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* **319**(5867): 1215-1220.
- Gillum, AM, Tsay, EY and Kirsch, DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**(1): 179-182.
- Giuliodori, S, Percudani, R, Braglia, P, Ferrari, R, Guffanti, E, Ottonello, S and Dieci, G (2003) A composite upstream sequence motif potentiates tRNA gene transcription in yeast. *J Mol Biol* **333**(1): 1-20.
- Gladfelter, AS and Sudbery, PE (2008). *The Septins*, Wiley.

Grantham, R, Gautier, C, Gouy, M, Jacobzone, M and Mercier, R (1981) Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res* **9**(1): r43-74.

Greiss, S and Chin, JW (2011) Expanding the genetic code of an animal. *J Am Chem Soc* **133**(36): 14196-14199.

Griffith, IP (1972) The effect of cross-links on the mobility of proteins in dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Biochem J* **126**(3): 553-560.

Gromoller, A and Lehming, N (2000) Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *EMBO J* **19**(24): 6845-6852.

Grumaz, C, Lorenz, S, Stevens, P, Lindemann, E, Schock, U, Retey, J, Rupp, S and Sohn, K (2013) Species and condition specific adaptation of the transcriptional landscapes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Genomics* **14**: 212.

Grunbeck, A, Huber, T, Abrol, R, Trzaskowski, B, Goddard, WA, 3rd and Sakmar, TP (2012) Genetically encoded photo-cross-linkers map the binding site of an allosteric drug on a G protein-coupled receptor. *ACS Chem Biol* **7**(6): 967-972.

Grunbeck, A, Huber, T, Sachdev, P and Sakmar, TP (2011) Mapping the ligand-binding site on a G protein-coupled receptor (GPCR) using genetically encoded photocrosslinkers. *Biochemistry* **50**(17): 3411-3413.

Gully, D, Moinier, D, Loiseau, L and Bouveret, E (2003) New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett* **548**(1-3): 90-96.

Guo, J, Melancon, CE, 3rd, Lee, HS, Groff, D and Schultz, PG (2009) Evolution of amber suppressor tRNAs for efficient bacterial production of proteins containing nonnatural amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(48): 9148-9151.

Guthrie, C and Fink, GR (1991). *Methods in Enzymology: v. 194: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Ed. C. Guthrie & G. R. Fink, Academic Press.

Guthrie, C and Fink, GR (2002). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Cell Biology*, Elsevier Science.

Hancock, SM, Uprety, R, Deiters, A and Chin, JW (2010) Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair. *J Am Chem Soc* **132**(42): 14819-14824.

Harding, DR, Hancock, WS and Sparrow, JT (1985) Synthesis of peptide labelled with p-iodophenylalanine which corresponds to the first amphipathic region of apolipoprotein C-I. *Int J Pept Protein Res* **26**(2): 208-213.

Harismendy, O, Gendrel, CG, Soularue, P, Gidrol, X, Sentenac, A, Werner, M and Lefebvre, O (2003) Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *EMBO J* **22**(18): 4738-4747.

Hickman, MA, Zeng, G, Forche, A, Hirakawa, MP, Abbey, D, Harrison, BD, Wang, YM, Su, CH, Bennett, RJ, Wang, Y and Berman, J (2013) The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* **494**(7435): 55-59.

- Higa, A and Mandel, M (1970) Actinomycin sensitive mutants of Escherichia coli K-12. *Mol Gen Genet* **108**(1): 41-46.
- Hino, N, Sakamoto, K and Yokoyama, S (2012) Site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **794**: 215-228.
- Hirao, I, Harada, Y, Kimoto, M, Mitsui, T, Fujiwara, T and Yokoyama, S (2004) A two-unnatural-base-pair system toward the expansion of the genetic code. *J Am Chem Soc* **126**(41): 13298-13305.
- Ho, Y, Gruhler, A, Heilbut, A, Bader, GD, Moore, L, Adams, SL, Millar, A, Taylor, P, Bennett, K, Boutilier, K, Yang, L, Wolting, C, Donaldson, I, Schandorff, S, Shewnarane, J, Vo, M, Taggart, J, Goudreault, M, Muskat, B, Alfarano, C, Dewar, D, Lin, Z, Michalickova, K, Willems, AR, Sassi, H, Nielsen, PA, Rasmussen, KJ, Andersen, JR, Johansen, LE, Hansen, LH, Jespersen, H, Podtelejnikov, A, Nielsen, E, Crawford, J, Poulsen, V, Sorensen, BD, Matthiesen, J, Hendrickson, RC, Gleeson, F, Pawson, T, Moran, MF, Durocher, D, Mann, M, Hogue, CW, Figeys, D and Tyers, M (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**(6868): 180-183.
- Hoffman, CS and Winston, F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* **57**(2-3): 267-272.
- Hofmann, B, Hecht, HJ and Flohe, L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* **383**(3-4): 347-364.
- Hohsaka, T, Ashizuka, Y, Taira, H, Murakami, H and Sisido, M (2001) Incorporation of nonnatural amino acids into proteins by using various four-base codons in an Escherichia coli in vitro translation system. *Biochemistry* **40**(37): 11060-11064.
- Horita, A (1971) Pharmacological aspects of the unnatural amino acids and amines. Introductory remarks. *Fed Proc* **30**(3): 857-858.
- Hsieh, KH, LaHann, TR and Speth, RC (1989) Topographic probes of angiotensin and receptor: potent angiotensin II agonist containing diphenylalanine and long-acting antagonists containing biphenylalanine and 2-indan amino acid in position 8. *J Med Chem* **32**(4): 898-903.
- Hughes, RA and Ellington, AD (2010) Rational design of an orthogonal tryptophanyl nonsense suppressor tRNA. *Nucleic Acids Res* **38**(19): 6813-6830.
- Huisgen, R (1961) Centenary Lectures - 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proceedings of the Chemical Society* **0**(October): 357-396.
- Hurley, R and De Louvois, J (1979) Candida vaginitis. *Postgrad Med J* **55**(647): 645-647.
- Hwang, CS, Oh, JH, Huh, WK, Yim, HS and Kang, SO (2003) Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **47**(4): 1029-1043.
- Ibba, M and Soll, D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**: 617-650.
- Jabet, C, Sprague, ER, VanDemark, AP and Wolberger, C (2000) Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor Tup1. Proposal for an association model of the repressor complex Tup1 x Ssn6. *J Biol Chem* **275**(12): 9011-9018.

Jackson, RJ, Hellen, CU and Pestova, TV (2012) Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv Protein Chem Struct Biol* **86**: 45-93.

Jacobsen, ID, Wilson, D, Wachtler, B, Brunke, S, Naglik, JR and Hube, B (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* **10**(1): 85-93.

Jang, HH, Lee, KO, Chi, YH, Jung, BG, Park, SK, Park, JH, Lee, JR, Lee, SS, Moon, JC, Yun, JW, Choi, YO, Kim, WY, Kang, JS, Cheong, GW, Yun, DJ, Rhee, SG, Cho, MJ and Lee, SY (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**(5): 625-635.

Kadosh, D and Johnson, AD (2001) Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2496-2505.

Kadosh, D and Johnson, AD (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell* **16**(6): 2903-2912.

Kaneko, A, Umeyama, T, Hanaoka, N, Monk, BC, Uehara, Y and Niimi, M (2004) Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast* **21**(12): 1025-1033.

Kaneko, A, Umeyama, T, Utena-Abe, Y, Yamagoe, S, Niimi, M and Uehara, Y (2006) Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**(11): 1894-1905.

Kasperkiewicz, P, Gajda, AD and Drag, M (2012) Current and prospective applications of non-proteinogenic amino acids in profiling of proteases substrate specificity. *Biol Chem* **393**(9): 843-851.

Katzen, F, Chang, G and Kudlicki, W (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* **23**(3): 150-156.

Kauer, JC, Erickson-Viitanen, S, Wolfe, HR, Jr. and DeGrado, WF (1986) p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* **261**(23): 10695-10700.

Keleher, CA, Redd, MJ, Schultz, J, Carlson, M and Johnson, AD (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* **68**(4): 709-719.

Kiga, D, Sakamoto, K, Kodama, K, Kigawa, T, Matsuda, T, Yabuki, T, Shirouzu, M, Harada, Y, Nakayama, H, Takio, K, Hasegawa, Y, Endo, Y, Hirao, I and Yokoyama, S (2002) An engineered *Escherichia coli* tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9715-9720.

Kiick, KL, Saxon, E, Tirrell, DA and Bertozzi, CR (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 19-24.

Kobayashi, T, Sakamoto, K, Takimura, T, Sekine, R, Kelly, VP, Kamata, K, Nishimura, S and Yokoyama, S (2005) Structural basis of nonnatural amino acid recognition by an engineered

- aminoacyl-tRNA synthetase for genetic code expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1366-1371.
- Kohler, JR and Fink, GR (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**(23): 13223-13228.
- Kohrer, C and Rajbhandary, UL (2008) The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**(2): 129-138.
- Komachi, K and Johnson, AD (1997) Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2. *Mol Cell Biol* **17**(10): 6023-6028.
- Kontoyiannis, DP and Lewis, RE (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* **359**(9312): 1135-1144.
- Kristensen, P, Rasmussen, DE and Kristensen, BI (1999) Properties of thiol-specific antioxidant protein or calpromotin in solution. *Biochem Biophys Res Commun* **262**(1): 127-131.
- Kumamoto, CA and Vices, MD (2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* **7**(11): 1546-1554.
- Kurtz, MB, Cortelyou, MW, Miller, SM, Lai, M and Kirsch, DR (1987) Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **7**(1): 209-217.
- Kurtz, MB, Kirsch, DR and Kelly, R (1988) The molecular genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Sci* **5**(2): 58-63.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lay, J, Henry, LK, Clifford, J, Koltin, Y, Bulawa, CE and Becker, JM (1998) Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**(11): 5301-5306.
- Lee, SA, Jones, J, Khalique, Z, Kot, J, Alba, M, Bernardo, S, Seghal, A and Wong, B (2007) A functional analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* VPS4. *FEMS Yeast Res* **7**(6): 973-985.
- Lewis, RE (2011) Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* **86**(8): 805-817.
- Li, Y (2010) Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem* **55**(2): 73-83.
- Lin, S, Zhang, Z, Xu, H, Li, L, Chen, S, Li, J, Hao, Z and Chen, PR (2011) Site-specific incorporation of photo-cross-linker and bioorthogonal amino acids into enteric bacterial pathogens. *J Am Chem Soc* **133**(50): 20581-20587.
- Link, AJ, Robison, K and Church, GM (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**(8): 1259-1313.

- Lionakis, MS, Lim, JK, Lee, CC and Murphy, PM (2011) Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun* **3**(2): 180-199.
- Liu, CC and Schultz, PG (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem* **79**: 413-444.
- Liu, DR, Magliery, TJ, Pastrnak, M and Schultz, PG (1997a) Engineering a tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase for the site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10092-10097.
- Liu, DR, Magliery, TJ and Schultz, PG (1997b) Characterization of an 'orthogonal' suppressor tRNA derived from E. coli tRNA²(Gln). *Chem Biol* **4**(9): 685-691.
- Liu, DR and Schultz, PG (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 4780-4785.
- Liu, H (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**(6): 728-735.
- Liu, W, Brock, A, Chen, S, Chen, S and Schultz, PG (2007) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nat Methods* **4**(3): 239-244.
- Lo, HJ, Kohler, JR, DiDomenico, B, Loebenberg, D, Cacciapuoti, A and Fink, GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**(5): 939-949.
- Lopez-Martinez, R (2010) Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol* **28**(2): 178-184.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL and Randall, RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Magee, PT, Gale, C, Berman, J and Davis, D (2003) Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect Immun* **71**(5): 2299-2309.
- Maguire, SL, Oheigeartaigh, SS, Byrne, KP, Schroder, MS, O'Gaora, P, Wolfe, KH and Butler, G (2013) Comparative Genome Analysis and Gene Finding in *Candida* Species Using CGOB. *Mol Biol Evol* **30**(6): 1281-1291.
- Marck, C and Grosjean, H (2002) tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA* **8**(10): 1189-1232.
- Marck, C, Kachouri-Lafond, R, Lafontaine, I, Westhof, E, Dujon, B and Grosjean, H (2006) The RNA polymerase III-dependent family of genes in hemiascomycetes: comparative RNomics, decoding strategies, transcription and evolutionary implications. *Nucleic Acids Res* **34**(6): 1816-1835.
- Marcoux, D, Jafarian, F, Joncas, V, Buteau, C, Kokta, V and Moghrabi, A (2009) Deep cutaneous fungal infections in immunocompromised children. *J Am Acad Dermatol* **61**(5): 857-864.
- Martel, F and Berlinguet, L (1959) Impairment of tumor growth by unnatural amino acids. *Can J Biochem Physiol* **37**(3): 433-439.

- Matsumura, H, Kusaka, N, Nakamura, T, Tanaka, N, Sagegami, K, Uegaki, K, Inoue, T and Mukai, Y (2012) Crystal structure of the N-terminal domain of the yeast general corepressor Tup1p and its functional implications. *J Biol Chem* **287**(32): 26528-26538.
- Maude, S, Tai, LR, Davies, RP, Liu, B, Harris, SA, Kocienski, PJ and Aggeli, A (2012) Peptide synthesis and self-assembly. *Top Curr Chem* **310**: 27-69.
- Mennella, TA, Klinkenberg, LG and Zitomer, RS (2003) Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell* **2**(6): 1288-1303.
- Merrifield, RB (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*(85): 2149-2152.
- Missall, TA, Pusateri, ME and Lodge, JK (2004) Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **51**(5): 1447-1458.
- Moran, GP, Coleman, DC and Sullivan, DJ (2011) Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* **10**(1): 34-42.
- Morise, H, Shimomura, O, Johnson, FH and Winant, J (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**(12): 2656-2662.
- Morschhauser, J, Michel, S and Hacker, J (1998) Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* **257**(4): 412-420.
- Mukai, T, Hayashi, A, Iraha, F, Sato, A, Ohtake, K, Yokoyama, S and Sakamoto, K (2010) Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Res* **38**(22): 8188-8195.
- Murad, AM, d'Enfert, C, Gaillardin, C, Tournu, H, Tekaia, F, Talibi, D, Marechal, D, Marchais, V, Cottin, J and Brown, AJ (2001a) Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**(4): 981-993.
- Murad, AM, Leng, P, Straffon, M, Wishart, J, Macaskill, S, MacCallum, D, Schnell, N, Talibi, D, Marechal, D, Tekaia, F, d'Enfert, C, Gaillardin, C, Odds, FC and Brown, AJ (2001b) NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* **20**(17): 4742-4752.
- Murgola, EJ, Pagel, FT and Hijazi, KA (1984) Codon context effects in missense suppression. *J Mol Biol* **175**(1): 19-27.
- Nehring, S, Budisa, N and Wiltschi, B (2012) Performance analysis of orthogonal pairs designed for an expanded eukaryotic genetic code. *PLoS One* **7**(4): e31992.
- Neuhoff, V, Arold, N, Taube, D and Ehrhardt, W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**(6): 255-262.

- Neumann, H, Wang, K, Davis, L, Garcia-Alai, M and Chin, JW (2010) Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* **464**(7287): 441-444.
- Nirenberg, MW and Matthaei, JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 1588-1602.
- Noble, SM and Johnson, AD (2005) Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**(2): 298-309.
- Noren, CJ, Anthony-Cahill, SJ, Griffith, MC and Schultz, PG (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244**(4901): 182-188.
- Odds, FC (1988). *Candida and Candidosis*, Baillière Tindall.
- Ortega, M, Marco, F, Soriano, A, Almela, M, Martinez, JA, Lopez, J, Pitart, C and Mensa, J (2011) *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* **77**(2): 157-161.
- Palzer, S (2008). Entwicklung eines Systems zur Analyse molekularer Interaktionen im humanpathogenen Pilz *Candida albicans*. Universität Hohenheim: 110.
- Papon, N, Courdavault, V, Clastre, M, Simkin, AJ, Creche, J and Giglioli-Guivarc'h, N (2012) Deus ex *Candida* genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade. *Microbiology* **158**(Pt 3): 585-600.
- Park, SH, Koh, SS, Chun, JH, Hwang, HJ and Kang, HS (1999) Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(3): 2044-2050.
- Parker, JC, Jr., McCloskey, JJ and Knauer, KA (1976) Pathobiologic features of human candidiasis. A common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. *Am J Clin Pathol* **65**(6): 991-1000.
- Parrish, AR, She, X, Xiang, Z, Coin, I, Shen, Z, Briggs, SP, Dillin, A and Wang, L (2012) Expanding the genetic code of *Caenorhabditis elegans* using bacterial aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA pairs. *ACS Chem Biol* **7**(7): 1292-1302.
- Patton, LL, Phelan, JA, Ramos-Gomez, FJ, Nittayananta, W, Shiboski, CH and Mbuguye, TL (2002) Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. *Oral Dis* **8 Suppl 2**: 98-109.
- Pendrak, ML, Yan, SS and Roberts, DD (2004) Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* **426**(2): 148-156.
- Perlin, DS (2007) Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* **10**(3): 121-130.
- Petraitiene, R, Petraitis, V, Kelaher, AM, Sarafandi, AA, Mickiene, D, Groll, AH, Sein, T, Bacher, J and Walsh, TJ (2005) Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated

candidiasis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(5): 2084-2092.

Pfaller, M, Neofytos, D, Diekema, D, Azie, N, Meier-Kriesche, HU, Quan, SP and Horn, D (2012) Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**(4): 323-331.

Phillips-Jones, MK, Hill, LS, Atkinson, J and Martin, R (1995) Context effects on misreading and suppression at UAG codons in human cells. *Mol Cell Biol* **15**(12): 6593-6600.

Piebler, J (2005) New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol* **15**(1): 4-14.

Pitt-Rivers, R and Impiombato, FS (1968) The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J* **109**(5): 825-830.

Pla, J, Perez-Diaz, RM, Navarro-Garcia, F, Sanchez, M and Nombela, C (1995) Cloning of the *Candida albicans* HIS1 gene by direct complementation of a *C. albicans* histidine auxotroph using an improved double-ARS shuttle vector. *Gene* **165**(1): 115-120.

Pluthero, FG (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **21**(20): 4850-4851.

Puig, O, Caspary, F, Rigaut, G, Rutz, B, Bouveret, E, Bragado-Nilsson, E, Wilm, M and Seraphin, B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**(3): 218-229.

Purschke, FG (2012). Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen der Interaktionen in gemischten Biofilmen. Universität Stuttgart: 149.

Reef, SE, Lasker, BA, Butcher, DS, McNeil, MM, Pruitt, R, Keyserling, H and Jarvis, WR (1998) Nonperinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: prospective study. *J Clin Microbiol* **36**(5): 1255-1259.

Reuss, O, Vik, A, Kolter, R and Morschhauser, J (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**: 119-127.

Richardson, MD (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56 Suppl 1**: i5-i11.

Rigaut, G, Shevchenko, A, Rutz, B, Wilm, M, Mann, M and Seraphin, B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-1032.

Roberts, DN, Stewart, AJ, Huff, JT and Cairns, BR (2003) The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14695-14700.

Ross, SJ, Findlay, VJ, Malakasi, P and Morgan, BA (2000) Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol Biol Cell* **11**(8): 2631-2642.

Saag, MS and Dismukes, WE (1988) Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* **32**(1): 1-8.

Saiman, L, Ludington, E, Dawson, JD, Patterson, JE, Rangel-Frausto, S, Wiblin, RT, Blumberg, HM, Pfaller, M, Rinaldi, M, Edwards, JE, Wenzel, RP, Jarvis, W and National Epidemiology of Mycoses Study, G (2001) Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* **20**(12): 1119-1124.

Samaranayake, DP and Hanes, SD (2011) Milestones in *Candida albicans* gene manipulation. *Fungal Genet Biol* **48**(9): 858-865.

Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989a). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989b). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, MA and Tuite, MF (1995) The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **23**(9): 1481-1486.

Saxon, E and Bertozzi, CR (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287**(5460): 2007-2010.

Schramm, L and Hernandez, N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* **16**(20): 2593-2620.

Schroder, E, Littlechild, JA, Lebedev, AA, Errington, N, Vagin, AA and Isupov, MN (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* **8**(6): 605-615.

Schweizer, A, Rupp, S, Taylor, BN, Rollinghoff, M and Schroppel, K (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**(3): 435-445.

Schwyzler, R and Caviezel, M (1971) p-Azido-L-phenylalanine: a photo-affinity 'probe' related to tyrosine. *Helv Chim Acta* **54**(5): 1395-1400.

Sentenac, A (1985) Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit Rev Biochem* **18**(1): 31-90.

Shankar, CS, Ramakrishnan, MS and Umesh-Kumar, S (1996) MIG1 overexpression causes flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142** (Pt 9): 2663-2667.

Sheehan, DJ, Hitchcock, CA and Sibley, CM (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* **12**(1): 40-79.

Shevchenko, A, Tomas, H, Havlis, J, Olsen, JV and Mann, M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**(6): 2856-2860.

Shevchenko, A, Wilm, M, Vorm, O and Mann, M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**(5): 850-858.

Shimizu, Y, Kanamori, T and Ueda, T (2005) Protein synthesis by pure translation systems. *Methods* **36**(3): 299-304.

- Smith, RL and Johnson, AD (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**(7): 325-330.
- Sobel, JD (2007) Vulvovaginal candidosis. *Lancet* **369**(9577): 1961-1971.
- Sprague, ER, Redd, MJ, Johnson, AD and Wolberger, C (2000) Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J* **19**(12): 3016-3027.
- Stansfield, I, Jones, KM, Kushnirov, VV, Dagkesamanskaya, AR, Poznyakovski, AI, Paushkin, SV, Nierras, CR, Cox, BS, Ter-Avanesyan, MD and Tuite, MF (1995) The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**(17): 4365-4373.
- Steele, JC, Jr. and Nielsen, TB (1978) Evaluation of cross-linked polypeptides in SDS gel electrophoresis. *Anal Biochem* **84**(1): 218-224.
- Stellberger, T, Hauser, R, Baiker, A, Pothineni, VR, Haas, J and Uetz, P (2010) Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusion proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome Sci* **8**: 8.
- Stoldt, VR, Sonneborn, A, Leuker, CE and Ernst, JF (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**(8): 1982-1991.
- Stynen, B, Tournu, H, Tavernier, J and Van Dijck, P (2012) Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(2): 331-382.
- Stynen, B, Van Dijck, P and Tournu, H (2010) A CUG codon adapted two-hybrid system for the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **38**(19): e184.
- Sudbery, P, Gow, N and Berman, J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**(7): 317-324.
- Sudbery, PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**(10): 737-748.
- Takimoto, JK, Adams, KL, Xiang, Z and Wang, L (2009) Improving orthogonal tRNA-synthetase recognition for efficient unnatural amino acid incorporation and application in mammalian cells. *Mol Biosyst* **5**(9): 931-934.
- Tang, HM, Siu, KL, Wong, CM and Jin, DY (2009) Loss of yeast peroxiredoxin Tsa1p induces genome instability through activation of the DNA damage checkpoint and elevation of dNTP levels. *PLoS Genet* **5**(10): e1000697.
- Taylor, PP, Pantaleone, DP, Senkpeil, RF and Fotheringham, IG (1998) Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. *Trends Biotechnol* **16**(10): 412-418.
- Thibodeaux, GN, Liang, X, Moncivais, K, Umeda, A, Singer, O, Alfonta, L and Zhang, ZJ (2010) Transforming a pair of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase from Archaea to function in mammalian cells. *PLoS One* **5**(6): e11263.

- Thompson, A, Hall, C, Karunakaran, T and Gunasekaran, M (1998) Properties of adenosine monophosphate deaminase of *Candida albicans*. *Microbios* **96**(385): 133-139.
- Thorson, JS, Cornish, VW, Barrett, JE, Cload, ST, Yano, T and Schultz, PG (1998) A biosynthetic approach for the incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Methods Mol Biol* **77**: 43-73.
- Treitel, MA and Carlson, M (1995) Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3132-3136.
- Tsao, ML, Tian, F and Schultz, PG (2005) Selective Staudinger modification of proteins containing p-azidophenylalanine. *Chembiochem* **6**(12): 2147-2149.
- Tuch, BB, Mitrovich, QM, Homann, OR, Hernday, AD, Monighetti, CK, De La Vega, FM and Johnson, AD (2010) The transcriptomes of two heritable cell types illuminate the circuit governing their differentiation. *PLoS Genet* **6**(8): e1001070.
- Tzamarias, D and Struhl, K (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**(6483): 758-761.
- Tzamarias, D and Struhl, K (1995) Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev* **9**(7): 821-831.
- Uetz, P, Giot, L, Cagney, G, Mansfield, TA, Judson, RS, Knight, JR, Lockshon, D, Narayan, V, Srinivasan, M, Pochart, P, Qureshi-Emili, A, Li, Y, Godwin, B, Conover, D, Kalbfleisch, T, Vijayadamodar, G, Yang, M, Johnston, M, Fields, S and Rothberg, JM (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**(6770): 623-627.
- Urban, C, Sohn, K, Lottspeich, F, Brunner, H and Rupp, S (2003) Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* **544**(1-3): 228-235.
- Urban, C, Xiong, X, Sohn, K, Schroppel, K, Brunner, H and Rupp, S (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **57**(5): 1318-1341.
- van Burik, JA and Magee, PT (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* **55**: 743-772.
- Varanasi, US, Klis, M, Mikesell, PB and Trumbly, RJ (1996) The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6707-6714.
- Wang, F, Niu, W, Guo, J and Schultz, PG (2012) Unnatural amino acid mutagenesis of fluorescent proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**(40): 10132-10135.
- Wang, F, Robbins, S, Guo, J, Shen, W and Schultz, PG (2010) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **5**(2): e9354.
- Wang, K, Neumann, H, Peak-Chew, SY and Chin, JW (2007) Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* **25**(7): 770-777.

- Wang, L, Brock, A, Herberich, B and Schultz, PG (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292**(5516): 498-500.
- Wang, L and Schultz, PG (2002) Expanding the genetic code. *Chem Commun (Camb)*(1): 1-11.
- Wang, Q and Wang, L (2008) New methods enabling efficient incorporation of unnatural amino acids in yeast. *J Am Chem Soc* **130**(19): 6066-6067.
- Watson, AD, Edmondson, DG, Bone, JR, Mukai, Y, Yu, Y, Du, W, Stillman, DJ and Roth, SY (2000) Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev* **14**(21): 2737-2744.
- Weiss, WA and Friedberg, EC (1986) Normal yeast tRNA(CAGGln) can suppress amber codons and is encoded by an essential gene. *J Mol Biol* **192**(4): 725-735.
- Wessel, D and Flugge, UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**(1): 141-143.
- Whiteway, M and Bachewich, C (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**: 529-553.
- Wickner, RB (1974) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that incorporate deoxythymidine-5'-monophosphate into deoxyribonucleic acid in vivo. *J Bacteriol* **117**(1): 252-260.
- Williams, FE and Trumbly, RJ (1990) Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**(12): 6500-6511.
- Williams, FE, Varanasi, U and Trumbly, RJ (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol Cell Biol* **11**(6): 3307-3316.
- Wilson, RB, Davis, D and Mitchell, AP (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**(6): 1868-1874.
- Wisplinghoff, H, Bischoff, T, Tallent, SM, Seifert, H, Wenzel, RP and Edmond, MB (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**(3): 309-317.
- Wittelsberger, A, Mierke, DF and Rosenblatt, M (2008) Mapping ligand-receptor interfaces: approaching the resolution limit of benzophenone-based photoaffinity scanning. *Chem Biol Drug Des* **71**(4): 380-383.
- Wong, CM, Zhou, Y, Ng, RW, Kung Hf, HF and Jin, DY (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* **277**(7): 5385-5394.
- Wong, KH and Struhl, K (2011) The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev* **25**(23): 2525-2539.
- Wood, ZA, Poole, LB, Hantgan, RR and Karplus, PA (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**(17): 5493-5504.

Wood, ZA, Schroder, E, Robin Harris, J and Poole, LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**(1): 32-40.

Yoshida, A (1960) Studies on the mechanism of protein synthesis; incorporation of p-fluorophenylalanine into alpha-amylase of *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* **41**: 98-103.

Young, DD, Young, TS, Jahnz, M, Ahmad, I, Spraggon, G and Schultz, PG (2011) An evolved aminoacyl-tRNA synthetase with atypical polysubstrate specificity. *Biochemistry* **50**(11): 1894-1900.

Young, TS, Ahmad, I, Brock, A and Schultz, PG (2009) Expanding the genetic repertoire of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **48**(12): 2643-2653.

Young, TS, Ahmad, I, Yin, JA and Schultz, PG (2010a) An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J Mol Biol* **395**(2): 361-374.

Young, TS and Schultz, PG (2010b) Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon. *J Biol Chem* **285**(15): 11039-11044.

Zakian, VA, Brewer, BJ and Fangman, WL (1979) Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during the S phase. *Cell* **17**(4): 923-934.

ANHANG

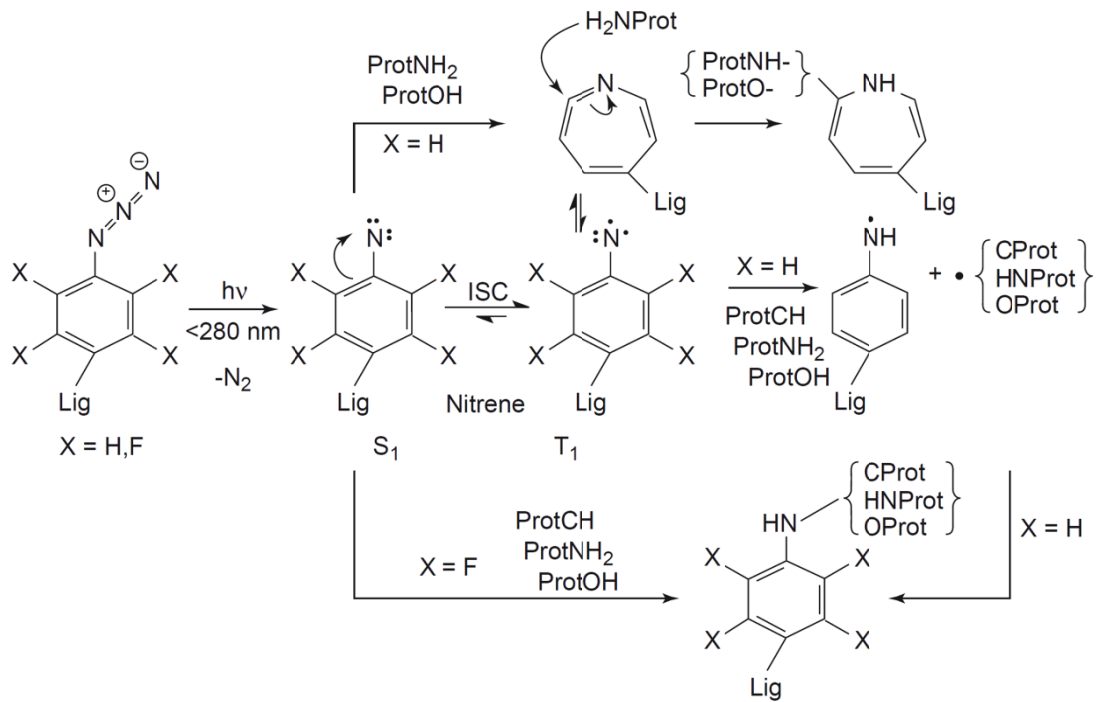


Abb. 22 Reaktionsmechanismus der Azidogruppe nach Photolyse. [Dorman, G *et al.* 2000]

Regulatorische Pol III-Sequenzen

Candida albicans tE(CUC)1 (-250 bis -1): *tE* upstream regulatorische Sequenz

GTTGATGAAAAATTTCGACGAAAAAATTAAGAAAAGCTTGAGTGTTCGGTACTTTGAAAACTGAATTGA
 ATTGTTAGTATTACATGGTTGAATCTCTTAAATATCAAAAATTTTCTCTTATAAAAGCATTAAATTAGTT
 GTTTTTGAATGAAAACAAAGATCAATCATGGATACAACATGAATTTGACATTGAAGAGATTTGCCAATA
 TTGTAAGGTAAGGAAATCACGATTTTTTGTTCCTCGTAAAACG

Candida albicans tE(CUC)1 (+73 bis +173): *tE* downstream regulatorische Sequenz

TCCGATATAGTGTAATGGCTATCACACGACACTCTCCATGTTGTGATCCGGGTTTCGATTCCCGGTATCG
 GAGTAATTTTTTGTTCACTTTTTTACTTACATTGCTAGGATTTTTTTTTTTTCGAATTATTCCAAAAC
 CTATCACATGTCAACAATTCCTCAGAATGTTATT

Candida albicans SNR52 (-221 bis -1): *SNR52* upstream regulatorische Sequenz

GAGTATTGCCTCATCAAAGAAACAATCAAATATTATAGATACTCACTCCATCACGTGATAATTTCACTG
 GTATGGAAAAGTGGAAAATTTTATAAAAAAAAATTTGATGCCTTTGGCATAGCTGAAACTTCGGCCCAA
 TAGGATTGGAGAATATGTTTTCGCAGCGTTCTTACAATTAATTGTGGTGGAAGTTCGAGACTTGCCTA
 AACTATTTTTAATTT

Abb. 23 In dieser Arbeit für die Expression der *EcTyrtrRNA_{CUA}* verwendete Pol III-regulatorische Sequenzen. In Klammern ist die Position bezüglich des ersten Nukleotids des reifen Transkriptes angegeben (upstream/5' flankierend: - ; downstream/3' flankierend: +). Die in der regulatorischen *SNR52* Sequenz enthaltene A- und B-Box sind in hellgrau (A-Box) und dunkelgrau (B-Box) gekennzeichnet [Marck, C *et al.* 2006].

A

EcTyrtrRNA_{CUA}

GGTGGGGTTC^{CCCGAGCGGCCA}AGGGGAGCAGACTCTAAATCTGCCGTCATCGACTTCGAAG^{GTTTCGAATC}CTCCCCCACCA

B

Konsensussequenz A- und B-Box

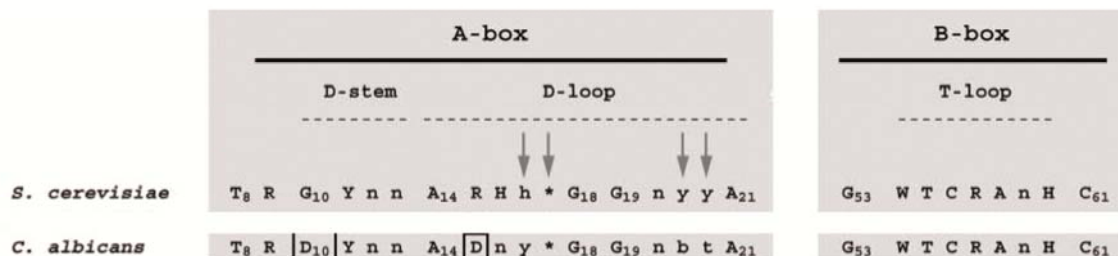


Abb. 24 Vergleich der A- und B-Boxen. (A) Sequenz der *EcTyrtrRNA_{CUA}*. Die A-Box ist in hellgrau markiert, die B-Box in dunkelgrau. Die B-Box der *EcTyrtrRNA_{CUA}* zeigt vollständige Übereinstimmung mit der tDNA Konsensussequenz für *C. albicans*. Die in der A-Box zu den Konsensussequenzen von *C.*


```

Aligned_sequences: 2
# 1: CaTsalp (orf19.7417, Assembly 19 ORF Translation)
# 2: h (human thioredoxin peroxidase b, 1QMV)
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 198
# Identity:    114/198 (57.6%)
# Similarity:  148/198 (74.7%)
# Gaps:        3/198 ( 1.5%)
# Score: 608.0
#
# =====
CaTsalp      1  --MAPVVQQPAPSPFKKTAVDG VFEEVTLEQYK GKWVLLAFIPLAFTFVC      48
             ....:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
h           1  XSGNARIGKPAPDFKATAVDGAFKEVKLSDYKGKYVVVLLFFYPLDFTFVX    50

CaTsalp     49  PSEIIAYSEAVKKFKAEDAQVLFASDSEYTWLAWTNVARKDGGIGKVDF      98
             |:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
h          51  PTEIIAFSNRAEDFRKLGCEVLGVSVD SQFTHLAWINTPRKEGGLGPLNI    100

CaTsalp     99  PVLADTNHSLSRDYGV LIEE EGVALRGIFLIDPKGVLRQITINDLPVGRS    148
             |:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
h          101  PLLADVTRRLSEDYGV LKTDEG IAYRGLFIIDGKGVLRQITVNDLPVGRS    150

CaTsalp    149  VEESLRLEAFQFTEKYGEVC PANWH PGDETIKPSPEASKEYFNKVNK      196
             |:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
h          151  VDEALRLVQAFQYTD EHG EVC PAGW KPGSDTIKPNVDDSK EYFSKHN-    197
    
```

Abb. 27 Sequenzvergleich zwischen CaTsa1p und humaner Thioredoxin Peroxidase B (1QMV). Die Identität zwischen den beiden Proteinen beträgt 57,6 %. Identische Aminosäuren: |, konservierte Substitutionen: :, semi-konservierte Substitutionen: ., keine Konservierung: - .

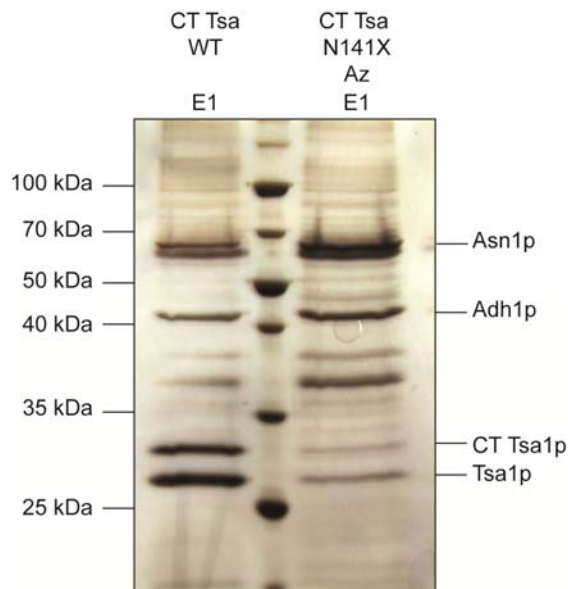


Abb. 28 Aufreinigung von His₆-getagtem Tsa WT und Tsa N141X Az über Ni-NTA Affinitätschromatographie. Silber-gefärbtes SDS-Gel der Eluate E1 aus einer Ni-NTA Affinitätschromatographie der Proteinlysate von Stamm SPC46 (CT Tsa WT) und SPC55 (CT Tsa N141X) nach Inkubation in SC-Medium bzw. AzF-supplementiertem Medium (Az). Die massenspektrometrisch identifizierten Proteine sind rechts beschriftet. Neben dem spezifisch über den

His₆-Tag aufgereinigtem C-terminal getagten Tsap1p werden außerdem wildtypisches Tsap1p, Adh1p, Asn1p und weitere, nicht identifizierte Proteine aufgereinigt.

```

# Aligned_sequences: 2
# 1: CaTup1p (orf 19.6109, Assembly 19 ORF Translation)
# 2: ScTup1p (YCR084C, reference strain S288C)
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 20.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 716
# Identity:      333/716 (46.5%)
# Similarity:   404/716 (56.4%)
# Gaps:        203/716 (28.4%)
# Score: 1506.5
#
#
#=====
CaTup1p      1 MSMPQRTQHQQRI.TELL.DATKTEFDYASNEASSFK-KVQEDYDSKYQQQ      49
  |.....|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p      1 --MTASVSNTQNKLELLDAIRQEFLQVSQEANTYRLQNQKDYDFKMNQQ      48
CaTup1p     50 AAEMQQIRQTVYDLELAHRKIKEAYEEEEILRLKNELDTRDRQMKNQFQQQ      99
  .|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p     49 LAEMQQIRNTVYELLELTHRKMKDAYEEEEIKHLKLGLEQRDHQIASLTVQQ      98
CaTup1p    100 QQQQQQQQQQQ---QQQQQIVAPPAAPPAPPTPVTSLSV-----      136
  |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p     99 QRQQQQQQVQQHLQQQQQLAAASASVPVAQQPPATTSATATPAANTTT      148
CaTup1p    137 -----      136
ScTup1p    149 GSPSAFPVQASRPNLVGSQLPPTTLPVVSSNAQQQLPQQQLQQQLQQQQ      198
CaTup1p    137 -----      136
ScTup1p    199 PPPQVSVAPLSNTAINGSPKSTKTTTLPVSKAPESTLKETEPENNTSKI      248
CaTup1p    137 -----IDKSQYIVNPTQRANHVKEI      156
  :...|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    249 NDTGSATTATTTTATETEIKPKKEEDATPASLHQDHYLVPYNQRANHSKPI      298
CaTup1p    157 PPFLQDLDIAKANPEFKQHLEYVLYNPAFSDKLDDIMVHSLDHSSVVC      206
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
YCR084C    299 PPFLDLDSQSVDPALKKQTNDYYILYNPALPREIDVELHKSLDHTSVVC      348
CaTup1p    207 CVRFSRDGKFIATGCNKTTQVFNVTTGELVAKLIDESSN-----      245
  |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    349 CVKFSNDGEYLATGCNKTTQVYRVSDGSLVARLSDSAANNHRNSITENN      398
CaTup1p    246 -----ENKDDNTTASGDLYIRS      262
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    399 TTTSTDNNTMTTTTTTTTITTTAMTSAELAKDVENLNTSSSPSSDLYIRS      448
CaTup1p    263 VCFSPDGKLLATGAEDKLIRIWDLSTKRRIKILRGHEQDIYSLDFPDGD      312
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    449 VCFSPDGKFLATGAEDRLIRIWDIENRKIVMILQGHEQDIYSLDYFPSGD      498
CaTup1p    313 RLVSGSGDRSVRIWDLRTSQCSLTLSDIEDGVTTTAVVAVSP-DGKLIAAGSLD      361
  :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    499 KLVSGSGDRTVRIWDLRTGQCSLTLSDIEDGVTTTAVVAVSPDGGKYIAAGSLD      548
CaTup1p    362 RTVRVWDSSTGFLVERLDSENGNGHEDSVSVAFSNNGEQIASGSLDR      411
  |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    549 RAVRVWDSSTGFLVERLDSENGSGTGHKDSVSVVFTRDGQSVVSGSLDR      598
CaTup1p    412 TVKLWHLEGKSDK-----KSTCEVTYIGHKDFVLSVCCPTDNEYILSG      454
  |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    599 SVKLWNLQANNKSDSKTPNSGTCEVTYIGHKDFVLSVATTQNDYEILSG      648
CaTup1p    455 SKDRGVIFWDQASGNPLMLQGHRNSVISVAVSLNSK--GTEGIFATGSG      502
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    649 SKDRGVLFWDKSGNPLMLQGHRNSVISVAVANGSPLGPEYNVFATGSG      698
CaTup1p    503 DCKARIWKTKK*---      515
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
ScTup1p    699 DCKARIWKYKKIAPN*      714
  ||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
  
```

Abb. 29 Sequenzvergleich CaTup1p und ScTup1p. Insgesamt ergibt sich eine Identität von 46,5 %. Die in dieser Arbeit substituierten Aminosäuren sind rot hinterlegt. Identische Aminosäuren: |, konservierte Substitutionen: :, semi-konservierte Substitutionen: ., keine Konservierung: - .

Tup1p L63X Monomer unten

A Protein View

Match to: [ref|NP_000000.4|Palzer](#) Score: 42241
 CandidaalbicansTup1mitC-terminalemV5/His6-Tag
 Found in search of SPL.mgf

Nominal mass (M_r): 60567; Calculated pI value: 5.96
 NCBI BLAST search of [ref|NP_000000.4|Palzer](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 84%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MSMPQRTQH QQRLELLDA IKTEFDYASN EASSFKVQE DYDSKYQQQA
51 AEMQIRQTV YDLELAHRKI KEAYEEIILR LKNELDTRDR QMKNGFQQQQ
101 QQQQQQQQQQ QQQQQQIVAP PAAPPAPPTP VTLSVIDKS QYIVNPTQRA
151 NHVKEIPPF QDLDAKANP EFKKQHLEY VLYNPAFSKD LDIDMVHSLD
201 HSSVCCVRF SRDGKFIATG CNKTTQVFNV TTGELVAKLI DESSNENKDD
251 NTTASGDLYI RSVCFSPDGK LLATGAEDKL IRIWDLSTKR IIKILRGHEQ
301 DIYSLDFPD GDRLVSGSGD RSVRIWDLRT SQCSSLTSLIE DGVTTVAVSP
351 DGKLIAGSL DRTVRVWDST TGFLVERLDS GNENGNHED SVYSVAFSNN
401 GEQIASGSLD RTVKLWHLEG KSDKKSTCEV TYIGHKDFVL SVCCTPDNEY
451 ILSGSKDRGV IFWDQASGNP LLMLQGHRNS VISVAVSLNS KGTEGIFATG
501 SGDCKARIWK WTKKLEGKPI PNPLLGLDST RTGHHHHHHH
    
```

B

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
58 - 68	680.3344	1358.6543	1358.6579	-3	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Gln (L) +14
58 - 68	688.8329	1375.6513	1375.6554	-3	0	R.QTVYDLELAHR.K Sulfide (D) +31.
58 - 68	689.8406	1377.6667	1377.6677	-1	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Phe (L) +33
58 - 68	465.2325	1392.6758	1392.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu>Amino (L) +4
58 - 68	697.3452	1392.6759	1392.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu>Amino (L) +4
58 - 68	697.3452	1392.6759	1392.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu>Amino (L) +4
58 - 68	697.3452	1392.6759	1392.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu>Amino (L) +4
58 - 68	465.2341	1392.6804	1392.6786	1	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu>Amino (L) +4
58 - 68	709.3453	1416.6761	1416.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2327	1416.6762	1416.6786	-2	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	709.3458	1416.6771	1416.6786	-1	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2331	1416.6775	1416.6786	-1	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2333	1416.6781	1416.6786	-0	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2334	1416.6784	1416.6786	-0	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2334	1416.6785	1416.6786	-0	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2335	1416.6788	1416.6786	0	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 68	473.2336	1416.6789	1416.6786	0	0	R.QTVYDLELAHR.K Leu->Trp (L) +73
58 - 69	515.9318	1544.7736	1544.7736	0	1	R.QTVYDLELAHRK.I Leu->Trp (L) +73

C

Phosphorylierungen

1. [ref|NP_000000.4|Palzer](#) Mass: 61081 Score: 53323 Matches: 1794(1658) Sequences: 57(55) emPAI: 104.32
 CandidaalbicansTup1mitC-terminalemV5/His6-Tag

Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	iss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1100	548.2877	1094.5609	1094.5624	-1.39	0	(56)	2.3e-006	1	U	R.LTELLDAIK.T + Phospho (ST)
<input checked="" type="checkbox"/> 2684	902.3765	1802.7385	1802.7400	-0.82	1	(26)	0.0025	1	U	K.TEFDYASNEASSFKK.V + Phospho (ST)
<input checked="" type="checkbox"/> 3090	676.7004	2027.0793	2027.0816	-1.13	1	(19)	0.013	1	U	K.KLEGKPIPNPLLGLDSTR.T + Phospho (ST)

Abb. 30 Ergebnisse Nano-LC-ESI-MS/MS für Bande Tup1p Monomer unten. (A) Sequenzabdeckung der detektierten Peptide von Tup1p mit C-terminalem V5/His₆-Epitop. **(B)** Ausschnitt aus der Auswertung mit MASCOT Search und Zuordnung der detektierten Peptide im Protein, sowie Modifikationen (in schwarz). **(C)** Die in der Probe detektierten Phosphorylierungen sind für das jeweilige Peptid und die Aminosäure angegeben.

Tup1p L63X Monomer oben

A Protein View

Match to: **ref|NP_000000.4|Palzer** Score: 13334
CandidaalbicansTup1mitC-terminalemV5/His6-Tag
 Found in search of SP2.mgf

Nominal mass (M_r): **60567**; Calculated pI value: **5.96**
 NCBI BLAST search of [ref|NP_000000.4|Palzer](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: **81%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MSMYPQRTQH QQRLELLDA IKTEFDYASN EASSFKKVQE DYDSKYQQQA
51 AEMQQIRQTV YDLELAHRKI KEAYEEEEILR LKNELDTRDR QMKNGFQQQQ
101 QQQQQQQQQQ QQQQQQIVAP PAAPPAPPTP VTSLSVIDKS QYIVNPTQRA
151 NHVKEIIPFPL QDLDIAKANP EFKKQHLEYY VLYNPAFSKD LDIDMVHSLD
201 HSSVVCCVRF SRDGKFIATG CNKTTQVFNV TTGELVAKLI DESSNENKDD
251 NTTASGDLYI RSVCFSPDCK LLATGAEDKL IRIWDLSTKR IIKILRGHEQ
301 DIYSLDFFPD GDRLVSGSGD RSVRIWDLRT SQCSLTLSIE DGVTTVAVSP
351 DGKLIAGSL DRTVVRWVWST TGFLVERLDS GNENGNHED SVYSVAFSNN
401 GEQIASGSLD RTVKLWHLEG KSDKKSTCEV TYIGHKDFVL SVCCTPDNEY
451 ILSGSKDRGV IFWDQASGNP LLMLQGHRNS VISVAVSLNS KGTEGIFATG
501 SGDCKARIWK WTKKLEGKPI PNPLGLDST RTGHHHHHH

```

B

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss Sequence	
58 - 68	680.3347	1358.6549	1358.6579	-2	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Gln (L) +14.97]
58 - 68	689.8405	1377.6663	1377.6677	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Phe (L) +33.98]
58 - 68	689.8406	1377.6667	1377.6677	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Phe (L) +33.98]
58 - 68	697.3448	1392.6750	1392.6786	-3	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu>Amino (L) +49.00]
58 - 68	465.2324	1392.6754	1392.6786	-2	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu>Amino (L) +49.00]
58 - 68	697.3455	1392.6764	1392.6786	-2	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu>Amino (L) +49.00]
58 - 68	465.2328	1392.6765	1392.6786	-2	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu>Amino (L) +49.00]
58 - 68	465.2329	1392.6768	1392.6786	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu>Amino (L) +49.00]
58 - 68	709.3458	1416.6771	1416.6786	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Trp (L) +73.00]
58 - 68	473.2331	1416.6774	1416.6786	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Trp (L) +73.00]
58 - 68	473.2332	1416.6776	1416.6786	-1	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Trp (L) +73.00]
58 - 68	473.2333	1416.6779	1416.6786	-0	0 R.QTVYDLELAHR.K	Leu->Trp (L) +73.00]
58 - 69	496.5913	1486.7520	1486.7528	-1	1 R.QTVYDLELAHRK.I	Leu->Gln (L) +14.97]

Abb. 31 Ergebnisse Nano-LC- ESI-MS/MS für Bande Tup1p L63X Monomer oben. (A) Sequenzabdeckung der detektierten Peptide von Tup1p mit C-terminalem V5/His₆-Epitop. **(B)** Ausschnitt aus der Auswertung mit MASCOT Search und Zuordnung der detektierten Peptide im Protein, sowie Modifikationen (in schwarz).

	V5- Epitop	His ₆ - Epitop	L63	L63X <i>p</i> -Amino- phenylalanin	L63W	L63F	L63Q
Tup1p L63X Monomer unten	104	0	0	52	10	1	1
Tup1p L63X Monomer oben	26	0	0	26	4	2	2
Crosslink unten	4	0	1	0	0	0	0
Crosslink oben	5	0	2	0	0	0	0

Tabelle 26 Zuordnung der Peptide von Tup1p L63X aus der Nano-LC-ESI-MS/MS. Anzahl aller Peptide, die aus den Proteinbanden von Abb. 20 der entsprechenden Sequenz von Tup1p zugeordnet werden konnten. Mit V5-Epitop sind unterschiedliche Peptide des V5-Tags bezeichnet, L63 bezeichnet Peptide, die an Position 63 Leucin enthalten. L63X bezeichnet Peptide, welche an Position 63 *p*-Aminophenylalanin als Abbauprodukt von *p*-Azidophenylalanin enthalten. L63W, L63F und L63Q bezeichnet Peptide, die für Position 63 gefunden wurden und entweder Tryptophan, Phenylalanin oder Glutaminsäure enthielten.

ANHANG

Scaffold Version: Scaffold_3.6.1
 Peptide Thresholds: 95.0% minimum
 Protein Thresholds: 99.9% minimum and 2 peptides minimum

Z30712_allentries

Displaying: Percentage of Total Spectra

#	Kurzname	Identified Proteins (16)	Accession Number	Molecular Weight	Taxonomy	Monomer unten	Monomer oben	Crosslink unten	Crosslink oben
1	Tup1p	RecName: Full=Transcriptional repressor TUP1	gi 1353558886 (+2)	58 kDa	Candida albicans SC5314	19%	9,20%	7,10%	6,60%
2	Trypsin	Chain A, Trypsin in Complex With Borate conserved hypothetical protein [Candida albicans WO-1]	gi 110590762 (+3) gi 238878424	23 kDa 110 kDa	Sus scrofa Candida albicans WO-1	1,40%	0,80%	6,80%	8,90%
3	Svl3 Ortholog	keratin 1 [Homo sapiens]	gi 11935049 (+6)	66 kDa	Homo sapiens	0,11%	0,49%	0,97%	1,50%
4	Keratin	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like isoform 2 [Macaca mulatta]	gi 109115260 (+12)	62 kDa	Macaca mulatta	0,11%	0,33%	0,61%	0,57%
5	Keratin	cyokeratin 9 [Homo sapiens]	gi 435476 (+2)	62 kDa	Homo sapiens	0	0,33%	0,73%	0,46%
6	Keratin	epidermal cyokeratin 2 [Homo sapiens]	gi 181402 (+3)	66 kDa	Homo sapiens	0	0,27%	0,24%	0
7	Keratin	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the thioredoxin system [Komagataella pastoris GS115]	gi 254573180	11 kDa	unknown	0	0	0	0,23%
8	Trx	Chain A, Hen Egg White Lysozyme Mutant With Alanine Substituted For Glycine	gi 10120553 (+27) gi 229552	14 kDa 66 kDa	Gallus domesticus Bos Taurus	0	0,22%	0	0,23%
9	Lysozym	predicted protein [Candida albicans WO-1]	gi 238878522 (+2)	36 kDa	Candida albicans WO-1	0	0,16%	0	0
10	Albumin	asparagine synthetase 2 [Candida albicans WO-1]	gi 238883775 (+3)	65 kDa	Candida albicans WO-1	0	0,16%	0	0
11	Asr1p	hypothetical protein CaO19.10653 [Candida albicans SC5314]	gi 68481210 (+1)	98 kDa	Candida albicans SC5314	0	0	0,24%	0
12	Asn1p	hypothetical protein [Komagataella pastoris GS115]	gi 254567996	15 kDa	unknown	0	0	0	0,23%
13	Smy2 Ortholog	transcription factor Tcc1p [Candida albicans]	gi 114213475 (+1)	80 kDa	Candida albicans	0	0	0	0,23%
14	Unknown	glycosidase [Candida albicans]	gi 1337255613 (+5)	121 kDa	Candida albicans	0	0	0	0
15	Tcc1p								
16	Png2								

Z30712_allentries

Displaying: Unweighted Spectrum Count

#	Kurzname	Identified Proteins (16)	Accession Number	Molecular Weight	Taxonomy	Monomer unten	Monomer oben	Crosslink unten	Crosslink oben
1	Tup1p	RecName: Full=Transcriptional repressor TUP1	gi 1353558886 (+2)	58 kDa	Candida albicans SC5314	709	168	58	58
2	Trypsin	Chain A, Trypsin in Complex With Borate conserved hypothetical protein [Candida albicans WO-1]	gi 110590762 (+3) gi 238878424	23 kDa 110 kDa	Sus scrofa Candida albicans WO-1	51	11	56	78
3	Svl3 Ortholog	keratin 1 [Homo sapiens]	gi 11935049 (+6)	66 kDa	Homo sapiens	4	9	8	13
4	Keratin	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10-like isoform 2 [Macaca mulatta]	gi 109115260 (+12)	62 kDa	Macaca mulatta	4	6	5	5
5	Keratin	cyokeratin 9 [Homo sapiens]	gi 435476 (+2)	62 kDa	Homo sapiens	0	6	6	4
6	Keratin	epidermal cyokeratin 2 [Homo sapiens]	gi 181402 (+3)	66 kDa	Homo sapiens	0	7	4	0
7	Keratin	Cytoplasmic thioredoxin isoenzyme of the thioredoxin system [Komagataella pastoris GS115]	gi 254573180	11 kDa	unknown	0	0	0	2
8	Trx	Chain A, Hen Egg White Lysozyme Mutant With Alanine Substituted For Glycine	gi 10120553 (+27) gi 229552	14 kDa 66 kDa	Gallus domesticus Bos Taurus	0	0	0	2
9	Lysozym	predicted protein [Candida albicans WO-1]	gi 238878522 (+2)	36 kDa	Candida albicans WO-1	0	4	0	0
10	Albumin	asparagine synthetase 2 [Candida albicans WO-1]	gi 238883775 (+3)	65 kDa	Candida albicans WO-1	0	3	0	0
11	Asr1p	hypothetical protein CaO19.10653 [Candida albicans SC5314]	gi 68481210 (+1)	98 kDa	Candida albicans SC5314	0	3	0	0
12	Asn1p	hypothetical protein [Komagataella pastoris GS115]	gi 254567996	15 kDa	unknown	0	0	2	0
13	Smy2 Ortholog	transcription factor Tcc1p [Candida albicans]	gi 114213475 (+1)	80 kDa	Candida albicans	0	0	0	2
14	Unknown	glycosidase [Candida albicans]	gi 1337255613 (+5)	121 kDa	Candida albicans	0	0	0	2
15	Tcc1p								
16	Png2								

Tabelle 27 Auswertung der in Nano-LC-ESI-MS/MS gefundenen Peptide von Tup1p L63X mit Scaffold Software. Die Auswertung wurde nach „Number of Unique Spectra“ durchgeführt, wodurch unterschiedliche Peptide gezählt werden, nicht jedoch gleiche Peptide mit Modifikationen. Außerdem wurde ausgewertet nach „Percentage of Total Spectra“, wodurch der Anteil der gefundenen Peptide am Gesamtspektrum quantifiziert wurde. Die Datenreihe für Tup1p wurde rot markiert. Kontaminationen, wie Trypsin und Keratin wurden grau hinterlegt

	Abdeckung Sequenz CT Tup1p	V5-Epitop	His ₆ -Epitop	L63	L63X <i>p</i> -Amino- phenylalanin
Tup1p L63X Monomer unten	47,3 %	ja	nein	nein	nein
Tup1p L63X Monomer oben	49,2 %	nein	ja	nein	ja
Crosslink unten	46,9 %	ja	nein	ja	nein
Crosslink oben	37,3 %	nein	nein	ja	nein

Tabelle 28 Zuordnung der Peptide von Tup1p L63X aus MALDI-TOF. Die Abdeckung der Sequenz mit den detektierten Peptiden ist in Prozent angegeben. Weiterhin ist vermerkt, ob in den Proben jeweils Peptide dem V5-Epitop, dem His₆-Epitop oder einem Position 63 abdeckendem Peptid zugeordnet werden konnten, das entweder Leucin oder als Abbauprodukt von *p*-Azidophenylalanin *p*-Aminophenylalanin enthielt.

Sequence data: Tup1p L63X Monomer unten

Tup1_C-Tag:Amino Acids

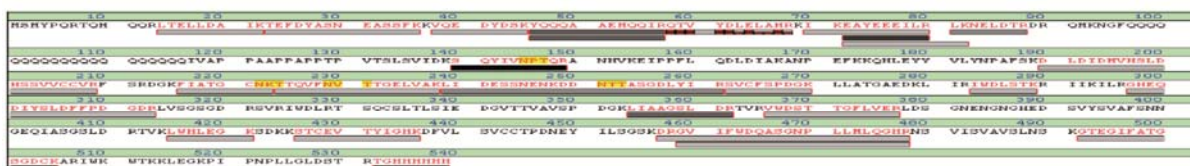
Intensity Coverage: 68.9 % (244072 cnts) Sequence Coverage MS: 47.3%
 Sequence Coverage MS/MS: 3.7% pl (isoelectric point): 5.9



Sequence data: Tup1p L63X Monomer oben

Tup1_C-Tag:Amino Acids

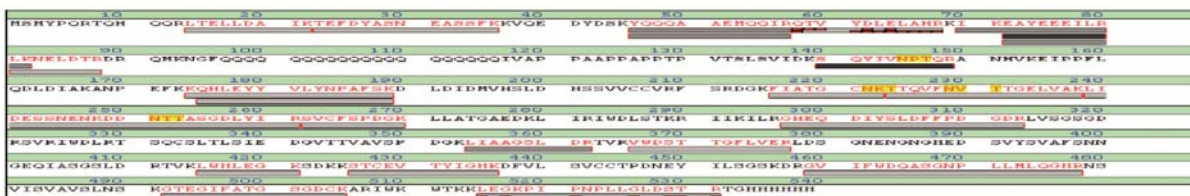
Intensity Coverage: 58.6 % (758881 cnts) Sequence Coverage MS: 49.2%
 Sequence Coverage MS/MS: 2.0% pl (isoelectric point): 5.9



Sequence data: Tup1p L63X Crosslink unten

Tup1_C-Tag:Amino Acids

Intensity Coverage: 47.6 % (479145 cnts) Sequence Coverage MS: 46.9%
 Sequence Coverage MS/MS: 5.2% pl (isoelectric point): 5.9



Sequence data: Tup1p L63X Crosslink oben

Tup1_C-Tag:Amino Acids

Intensity Coverage: 34.0 % (232028 cnts) Sequence Coverage MS: 37.3%
 Sequence Coverage MS/MS: 1.7% pl (isoelectric point): 5.9



Abb. 32 Sequenzabdeckung der Peptide von Tup1p L63X aus MALDI-TOF. Die Sequenzabdeckung ist für die jeweilige Probe gezeigt. In Peptiden detektierte Aminosäuren sind rot markiert. Die Balken markieren die Abgrenzungen der jeweiligen Peptide und sind nach Intensität des Peaks schwarz (stark) oder grau (schwach) gefärbt. Peptide, die per Tandem-MS analysiert worden, enthalten rote Kästchen, welche die Ionenserien markieren.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Morphologische Formen von <i>C. albicans</i> .	21
Abb. 2 Regulationsmechanismen der Hypheninduktion.	22
Abb. 3 Strukturformeln von Phenylalanin und <i>p</i> -Azidophenylalanin.	35
Abb. 4 Translation von Proteinen mit synthetischen Aminosäuren unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes.	39
Abb. 5 Strategie zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen mit dem erweiterten genetischen Code.	105
Abb. 6 Expression und Optimierung der <i>EcTyrtrRNA</i> _{CUA} .	108
Abb. 7 Expression und Optimierung der AzF-RS.	112
Abb. 8 Aminoacylierung der <i>EcTyrtrRNA</i> _{CUA} in Abhängigkeit der AzF-RS Varianten (n=3).	115
Abb. 9 Aminoacylierung der <i>EcTyrtrRNA</i> _{CUA} in Abwesenheit einer AzF-RS.	116
Abb. 10 Schematische Darstellung des GFP Assays und der ermittelten Fluoreszenzintensitäten.	118
Abb. 11 Die Expression des orthogonalen Pärchens zeigt keine negativen Effekte auf Wachstum und Morphologie in <i>C. albicans</i> .	120
Abb. 12. Strukturen der Di- und Oligomere von Tsa1p und Sequenzvergleich zwischen Thioredoxin-Peroxidasen aus <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>H. sapiens</i> .	122
Abb. 13 <i>In vivo</i> Einbau von AzF in CaTsa1p.	124
Abb. 14 Struktur der N-terminalen Domäne von Tup1p und zur Substitution mit AzF ausgewählte Positionen.	127
Abb. 15 Massenspektrometrischer Nachweis von AzF und dessen Abbauprodukten in Tsa1p und Tup1p.	129
Abb. 16 Markierung der Azidogruppe in Proteinen mit einem fluoreszenzmarkierten Phosphin.	131
Abb. 17 Induktion von Crosslinks mit Tsa1p Varianten.	134
Abb. 18 Crosslink-Induktion mit mutanten Tup1p Varianten.	136
Abb. 19 Immunologische Identifikation der Interaktionspartner.	138
Abb. 20 Aufreinigung von Tup1p L63X und dessen Crosslink-Produkten sowie Identifikation per Nano-LC-ESI-MS/MS.	140
Abb. 21 Crosslink-Induktion in verschiedenen Medien.	142
Abb. 22 Reaktionsmechanismus der Azidogruppe nach Photolyse.	181
Abb. 23 In dieser Arbeit für die Expression der <i>EcTyrtrRNA</i> _{CUA} verwendete Pol III-regulatorische Sequenzen.	182
Abb. 24 Vergleich der A- und B-Boxen.	182

Abb. 25 Beladung der *Ec*TyrtRNA_{CUA} durch die *Candida albicans* codon-optimierte TyrRS. 183

Abb. 26 Sequenzvergleich zwischen *Ca*Tsa1p und *Sc*Tsa1p..... 183

Abb. 27 Sequenzvergleich zwischen *Ca*Tsa1p und humaner Thioredoxin Peroxidase B
(1QMV)..... 184

Abb. 28 Aufreinigung von His₆-getagtem Tsa WT und Tsa N141X Az über Ni-NTA
Affinitätschromatographie..... 184

Abb. 29 Sequenzvergleich *Ca*Tup1p und *Sc*Tup1p. 185

Abb. 30 Ergebnisse Nano-LC-ESI-MS/MS für Bande Tup1p Monomer unten..... 186

Abb. 31 Ergebnisse Nano-LC- ESI-MS/MS für Bande Tup1p L63X Monomer oben. 187

Abb. 32 Sequenzabdeckung der Peptide von Tup1p L63X aus MALDI-TOF. 191

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Verwendete Antibiotika und Antimykotika	48
Tabelle 2	Verwendete Reaktions-Kitsysteme	48
Tabelle 3	Pufferlösungen	49
Tabelle 4	Kulturmedien für Bakterien und Hefen	49
Tabelle 5	Verwendete Enzyme	51
Tabelle 6	Verwendete Antikörper.....	51
Tabelle 7	In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide	52
Tabelle 8	Oligonukleotide für die Klonierung von Plasmid pSFS2A ActPr AzF-RS 3 CTG opt His6 ActT 3'FR.....	54
Tabelle 9	Oligonukleotide für die Mutagenese der aus Plasmid pSFS2A ActPr AzF-RS 3 V5 ActT 3'FR resultierenden AzF-RS Varianten	54
Tabelle 10	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A ActPr AzF-RS1 ActT 3'FR (ohne V5-Epitop).....	55
Tabelle 11	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A tE 4 tRNAs up FR.....	55
Tabelle 12	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A snR52 4 tRNAs up FR.....	55
Tabelle 13	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT	55
Tabelle 14	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A Eno1Pr CT GPF EnoT und pSFS2A Eno1Pr CT GFP N149X EnoT	56
Tabelle 15	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT Tsa1 und den daraus resultierenden Varianten mit Amber Codon.....	56
Tabelle 16	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT HA	57
Tabelle 17	Oligonukleotide für die Klonierung von pSFS2A CT Tup1 und den daraus resultierenden Varianten mit Amber Codon.....	57
Tabelle 18	Oligonukleotide für die Sequenzierung von hergestellten Plamiden bzw. zur Verifizierung der korrekten Integration in das <i>C. albicans</i> Genom.....	57
Tabelle 19	In dieser Arbeit verwendete und hergestellte <i>Candida albicans</i> Stämme	59
Tabelle 20	In dieser Arbeit verwendeter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm	61
Tabelle 21	Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2 kleine Gele)	97
Tabelle 22	Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2 große Gele)	97
Tabelle 23	Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE (1 Gel)	97
Tabelle 24	Aminosäuren des aktiven Zentrums der AzF-RS Varianten.....	113
Tabelle 25	Abstände ausgewählter Aminosäurepositionen in zwei Ketten von humaner Thioredoxin Peroxidase B.....	123
Tabelle 26	Zuordnung der Peptide von Tup1p L63X aus der Nano-LC-ESI-MS/MS.....	188

Tabelle 27 Auswertung der in Nano-LC-ESI-MS/MS gefundenen Peptide von Tup1p L63X mit Scaffold Software. 189

Tabelle 28 Zuordnung der Peptide von Tup1p L63X aus MALDI-TOF. 190

DANKSAGUNG

Für die viele Hilfe und Unterstützung, die für das Zustandekommen dieser Arbeit entscheidend war, möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken:

- Bei Prof. Dr. Thomas Hirth für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart unter hervorragenden Bedingungen durchzuführen.
- Bei PD Dr. Steffen Rupp für sein Interesse, die fachkundigen Anmerkungen und die Übernahme der Prüfung.
- PD Dr. Hans Rudolph und Prof. Dr. Peter Scheurich danke ich recht herzlich für ihr Interesse an dieser Arbeit und die freundliche Übernahme des Coreferates.
- Dr. Kai Sohn kann ich nicht genug danken. Lieber Kai, danke für das großartige Thema, trotz „initialer Schwierigkeiten“ hätte ich kein anderes gewollt. Danke für Deine überaus kompetente fachliche Betreuung, Dein Vertrauen, Deine Geduld, Deine innovative Denkweise, Deine wirklich unerschöpfliche Motivation und Begeisterungsfähigkeit. Ich konnte sehr viel von Dir lernen und dafür danke ich Dir von Herzen.
- Der Landesgraduiertenförderung des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg bin ich sehr dankbar für die Förderung durch ein Stipendium.
- Besonders möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Functional Genomics bedanken: Elena Lindemann, Michael Berg, Christian Grumaz, Yannick Bantel, Stefan Lorenz, Andreas Ritter, Karolina Mosler, Sebastian Vogler und Stefanie Arnold. Ich danke Euch für das tolle Arbeitsklima, die hilfreichen Diskussionen, die großartige Zusammenarbeit und die schöne Zeit in und außerhalb des Labors mit Euch!
- Bei Yannick Bantel und Franziska Kazenwadel möchte ich mich besonders bedanken. Eure Motivation, Wissbegierde und Ausdauer haben nicht nur zum Erfolg Eurer Diplomarbeiten beigetragen sondern auch meine Arbeit ganz

entscheidend vorangebracht. Vielen Dank dafür, ihr habt einfach super Arbeit geleistet!

- Meinen lieben Bürokollegen Christian Grumaz, Michael Berg und Stefan Lorenz danke ich für die langjährige, großartige Unterstützung in allen Lebenslagen und die lustige Zeit, die wir zusammen hatten.
- Außerdem möchte ich mich bei der ganzen Abteilung Molekulare Biotechnologie (MBT) bedanken, für die Hilfsbereitschaft und gegenseitige Unterstützung. Insbesondere möchte ich Dr. Ekkehard Hiller danken, für seine Hilfe bei der Durchführung von massenspektrometrischen Messungen und seine Geduld, Fragen rund um das Thema zu beantworten.
- Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner tollen Familie, bei meinen lieben Eltern, Geschwistern, meiner „Schwiegerfamilie“ und meinem Christian bedanken. Ihr wisst, was mir Eure Unterstützung bedeutet. Danke!
- Schließlich möchte ich diese Arbeit meinen lieben Eltern widmen. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen! Danke.

LEBENS LAUF

von Silke Grumaz, geb. Palzer
geboren am 26. November 1983
in Oldenburg

PROMOTION

seit 06. 2009 Promotion am Fraunhofer IGB in Stuttgart

STUDIUM

03. 2008 – 11. 2008 Diplomarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart
Thema: „Entwicklung eines Systems zur Analyse molekularer Interaktionen im humanpathogenen Pilz *Candida albicans*“

10. 2003 – 11. 2008 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hohenheim in Stuttgart
Schwerpunkte: Genetik, Zelluläre Mikrobiologie, Virologie
Abschluss: Diplom-Biologin

PRAKTIKA

11. 2008 – 05. 2009 Projektarbeit am Fraunhofer IGB in Stuttgart

07. 2007 – 09. 2007 Praktikum am Fraunhofer IGB in Stuttgart

08. 2005 – 08. 2005 Praktikum am Institut für klinische Genetik im Olgahospital Stuttgart

SCHULBILDUNG

09. 2000 – 06. 2003 Gymnasium am Romäusring Villingen-Schwenningen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09. 1994 – 07. 2000 St. Ursula Progymnasium Villingen-Schwenningen

PUBLIKATIONEN

ZEITSCHRIFTENBEITRÄGE

Palzer S., Bantel Y., Kazenwadel F., Berg M., Rupp S., Sohn K.

An Expanded Genetic Code in *Candida albicans* to study Protein-Protein Interactions *in vivo*.

Eukaryotic Cell 2013 **12** (6) 816-827

Berg M., Michalowski A., **Palzer S.**, Rupp S., Sohn K.

An *in vivo* photo-cross-linking approach reveals a homodimerization domain of Aha1 in *S. cerevisiae*

Manuskript eingereicht

Schumacher S., Nestler J., Otto T., Wegener M., Ehrentreich-Förster E., Michel D., Wunderlich K., **Palzer S.**, Sohn K., Weber A., Burgard M., Grzesiak A., Teichert A., Brandenburg A., Koger B., Albers J., Nebling E., Bier F. F.

Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis

Lab Chip 2012 **12** (3) 464-73

KONFERENZVORTRÄGE

Palzer S., Bantel Y., Kazenwadel F., Berg M., Rupp S., Sohn K.

An expanded genetic code in *C. albicans* to study molecular interactions *in vivo*

11th ASM Conference on Candida and Candidiasis, 29. März – 2. April 2012 San Francisco, USA

POSTERPRÄSENTATIONEN

Palzer S., Bantel Y., Kazenwadel F., Berg M., Rupp S., Sohn K.

An expanded genetic code in *C. albicans* to study molecular interactions *in vivo*

18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 11. – 15. Juni 2012 Berlin, Deutschland

Palzer S., Bantel Y., Kazenwadel F., Berg M., Rupp S., Sohn K.

An expanded genetic code in *C. albicans* to study molecular interactions *in vivo*

11th ASM Conference on Candida and Candidiasis, 29. März – 2. April 2012 San Francisco, USA

Palzer S., Kazenwadel F., Berg M., Rupp S., Sohn K.

Expanding the genetic code of *C. albicans* for the incorporation of unnatural photocrosslinker amino acids *in vivo*

4th FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens, 07. – 13. Mai 2011 La Colle sur Loup, Frankreich

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.

Silke Palzer

Stuttgart, Juni 2013

In der vorliegenden Arbeit wurde der genetische Code des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* durch gezielte Etablierung und Optimierung eines orthogonalen Pärchens bestehend aus tRNA und tRNA-Synthetase um die synthetische Aminosäure *p*-Azidophenylalanin erweitert. Nach Integration der synthetischen Aminosäure *in vivo* und UV-Bestrahlung war eine positionsspezifische Kreuzvernetzung binärer Protein-Protein-Interaktionen möglich, wie anhand von zwei Modellproteinen gezeigt werden konnte. Diese kreuzvernetzten Proteinkomplexe konnten zudem aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert werden. Somit konnte die generelle Eignung der Methode für die Identifizierung auch unbekannter Interaktionen gezeigt werden und ein wirkungsvolles Werkzeug für die *Candida*-Forschung etabliert werden.

ISBN 978-3-8396-0685-8

