

**II.**

**MATERIAL UND METHODEN**

## II.1. Organismen und Plasmide

| <i>E. coli</i><br>Stämme | Genotyp  | Hersteller |
|--------------------------|--|------------|
| DH10B                    | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMS mcrBC</i> ) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15<br>Δ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697<br><i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ <sup>-</sup>   | Gibco BRL  |
| XL1-Blue                 | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i><br><i>relA1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>pro AB lac</i> <sup>f</sup> ΔM15 Tn 10 ( <i>Tet</i> <sup>r</sup> )] <sup>f</sup>  | Stratagene |
| SURE@2                   | <i>e14</i> <sup>-</sup> ( <i>McrA</i> ) Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> ) 171<br><i>endA1 supE44 thi-1 recA1 lac recB recJ sbcC</i><br><i>umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lac</i> <sup>f</sup> ΔM15<br>Tn10 ( <i>Tet</i> <sup>r</sup> ) <i>Amy Cam</i> <sup>r</sup> ] | Stratagene |
| Top10                    | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMS.mcrBC</i> ) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15<br>Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ( <i>ara- leu</i> )7697<br><i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>   | Invitrogen |

| <i>Candida</i> und <i>Saccharomyces</i><br>Arten | Isolatbezeichnung | Publikation                 |
|--|-------------------|-----------------------------|
| <i>C. albicans</i>                               | SC5314            | GILLUM <i>et al.</i> , 1984 |
| <i>C. albicans</i>                               | WO-I              | MORROW <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>C. glabrata</i>                               | 1667              | RÜCHEL <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>C. krusei</i>                                 | C6                | RÜCHEL, klinisches Isolat   |
| <i>C. parapsilosis</i>                           | DSM4237           | RÜCHEL <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>S. cerevisiae</i>                             | JRY2              | PRATJE, nicht publiziert    |

| Plasmide | Insert                              | Ausgangs-<br>Vektor | Publikation                |
|----------|-------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| pAF9     | <i>SAP9</i>                         | pGEM-T              | vorliegende Arbeit         |
| pAF10-5' | <i>SAP9</i> 5'-Ende des Gens        | pGEM-T              | vorliegende Arbeit         |
| pAF10-3' | <i>SAP9</i> 3'-Ende des Gens        | pGEM-T              | vorliegende Arbeit         |
| pAF9ura  | <i>sap9::hisG-URA3-hisG::sap9</i>   | pGEM-T              | vorliegende Arbeit         |
| pAF10ura | <i>sap10::hisG-URA3-hisG::sap10</i> | pUC18               | vorliegende Arbeit         |
| pClp10   | <i>RP10-URA3</i>                    | pClp10              | MURAD <i>et al.</i> , 2000 |
| pMB7     | <i>hisG-URA3-hisG</i>               | pUC18               | FONZI & IRVIN, 1993        |
| pAF1     | <i>SAP6</i>                         | TOPO-XL             | vorliegende Arbeit         |
| pAF2     | <i>SAP6-URA3</i>                    | TOPO-XL             | vorliegende Arbeit         |
| pAF3     | <i>URA3</i>                         | pGEM-T              | vorliegende Arbeit         |
| pAF4     | <i>RP10-URA3-SAP6</i>               | pUC18               | vorliegende Arbeit         |

| Plasmide in<br><i>P. pastoris</i> | Genprodukt | Klonierungsvektor | Publikation                           |
|-----------------------------------|------------|-------------------|---------------------------------------|
| pCA2                              | Sap2p      | pKJ113            | BORG-VON ZEPELIN <i>et al.</i> , 1998 |
| pCA9                              | Sap9p      | pKJ113            | MONOD, nicht publiziert               |
| pCA10                             | Sap10p     | pKJ113            | MONOD, nicht publiziert               |

| <b>C. albicans-<br/>Mutanten-<br/>stämme</b> | <b>Phänotyp<br/>(Ausgangsstamm)</b>                | <b>Genotyp</b>   | <b>Publikation</b>            |
|--|--|--|-------------------------------|
| CAF2-1                                       | Ura3 <sup>+</sup> (SC5314)                         | <i>Δura3::imm434 / URA3</i>  | FONZI & IRVIN, 1993           |
| CAI4   | Ura3 <sup>-</sup> (CAF2-1)                         | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434</i>   | FONZI & IRVIN, 1993           |
| <i>Δsap6</i> -Mutante                        | Ura3 <sup>-</sup> (CAI4)                           | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap6::hisG / Δsap6::hisG</i>   | SANGLARD <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Δcph1</i> -Mutante                        | Ura3 <sup>+</sup> (CAI4)                           | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δcph1::hisG / Δcph1::hisG-URA3-hisG</i>                               | LO <i>et al.</i> , 1997       |
| <i>Δefg1</i> -Mutante                        | Ura3 <sup>+</sup> (CAI4)                           | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δefg1::hisG / Δefg1::hisG-URA3-hisG</i>                               | STOLD <i>et al.</i> , 1997    |
| <i>Δefg1 / Δcph1</i> -<br>Mutante            | Ura3 <sup>+</sup> ( <i>Δcph1</i> -Mutante)         | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δcph1::hisG / Δcph1::hisG<br/>Δefg1::hisG / Δefg1::hisG-URA3-hisG</i> | LO <i>et al.</i> , 1997       |
| <i>Δkex2</i> -Mutante                        | Ura3 <sup>+</sup> (CAI4)                           | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δkex2::hisG /<br/>Δkex2::hisG-URA3-hisG</i>                           | NEWPORT & AGABIAN,<br>1997    |
| <b>SAP6-<br/>Retransformante</b>             | Ura3 <sup>+</sup> ( <i>Δsap6</i> -Mutante)         | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap6::hisG / Δsap6::hisG<br/>URA3-SAP6</i>                           | vorliegende Arbeit            |
| <b><i>Δsap9</i>-Mutanten</b>                 |  |  |                               |
| 16<br>18<br>19                               | Ura3 <sup>+</sup> (CAI4)<br>(CAI4)<br>(CAI4)       | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap9::hisG-URA3-hisG / SAP9</i>                                      | vorliegende Arbeit            |
| 16-1<br>18-6<br>19-1                         | Ura3 <sup>-</sup> (16)<br>(18)<br>(19)             | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap9::hisG / SAP9</i>  | vorliegende Arbeit            |
| 16-1-8<br>18-6-1<br>19-1-6                   | Ura3 <sup>+</sup> (16-1)<br>(18-6)<br>(19-1)       | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap9::hisG /<br/>Δsap9::hisG-URA3-hisG</i>                           | vorliegende Arbeit            |
| 16-1-8-3<br>18-6-1-3<br>19-1-6-3             | Ura3 <sup>-</sup> (16-1-8)<br>(18-6-1)<br>(19-1-6) | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap9::hisG / Δsap9::hisG</i>   | vorliegende Arbeit            |
| <b><i>Δsap10</i>-Mutanten</b>                |  |  |                               |
| 10<br>19                                     | Ura3 <sup>+</sup> (CAI4)<br>(CAI4)<br>(CAI4)       | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap10::hisG-URA3-hisG / SAP10</i>                                    | vorliegende Arbeit            |
| 10-1<br>19-1                                 | Ura3 <sup>-</sup> (10)<br>(19)                     | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap10::hisG / SAP10</i>  | vorliegende Arbeit            |
| 10-1-3<br>19-1-17                            | Ura3 <sup>+</sup> (10-1)<br>(19-1)                 | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap10::hisG /<br/>Δsap10::hisG-URA3-hisG</i>                         | vorliegende Arbeit            |
| 10-1-3-3<br>19-1-17-1                        | Ura3 <sup>-</sup> (10-1-3)<br>(19-1-17)            | <i>Δura3::imm434 / Δura3::imm434<br/>Δsap10::hisG / Δsap10::hisG</i>                                       | vorliegende Arbeit            |

## II.2. Medien

| Medien                        | Komponente                                     | Hersteller                       |
|-------------------------------|--|----------------------------------|
| <b>BMGY</b>                   | 1% (w/v) Hefe-Extrakt                          | Duchefa                          |
|                               | 1% (w/v) Peptone                               | Duchefa                          |
|                               | 100 mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,0) | Merck                            |
|                               | 1,34% YNB                                      | Duchefa                          |
|                               | <b>Y</b> east <b>N</b> itrogen <b>B</b> ase    |                                  |
|                               | 4 x 10 <sup>-5</sup> % Biotin                  | Merck                            |
|                               | 1% Glycerol                                    | Merck                            |
| <b>BMMY</b>                   | 1% (w/v) Hefe-Extrakt                          | Duchefa                          |
|                               | 1% (w/v) Peptone                               | Duchefa                          |
|                               | 100 mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,0) | Merck                            |
|                               | 1,34% YNB                                      | Duchefa                          |
|                               | 4 x 10 <sup>-5</sup> % (w/v) Biotin            | Merck                            |
|                               | 0,5% (w/v) Methanol                            | Merck                            |
| <b>LB-Vollmedium</b>          | 1% (w/v) Trypton                               | Duchefa                          |
|                               | 1% (w/v) Hefe-Extrakt                          | Duchefa                          |
|                               | 0,5% (w/v) NaCl                                | Merck                            |
|                               | pH 7,5   |                                  |
| <b>LB-Agar</b>                | LB-Vollmedium                                  |                                  |
|                               | 1,5% (w/v) Agar                                | Difco                            |
| <b>LB-Amp</b>                 | LB-Vollmedium                                  |                                  |
|                               | 100 µg/ml (w/v) Ampicillin                     | Roche                            |
| <b>LB-Amp-IPTG-X-Gal-Agar</b> | LB-Agar  |                                  |
|                               | 0,008% (w/v) X-Gal                             | AmpliChem                        |
|                               | 200 µM IPTG                                    | PeqLab / BioTech Trade & Service |
| <b>LB-Kan-Agar</b>            | LB-Agar  |                                  |
|                               | 50 µg/ml Kanamycin                             | Roche                            |
| <b>SOC-Medium</b>             | 2% (w/v) Bacto-Trypton                         | Duchefa                          |
|                               | 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt                        | Duchefa                          |
|                               | 10 mM NaCl                                     | Merck                            |
|                               | 10 mM MgCl <sub>2</sub>                        | Merck                            |
|                               | 10 mM MgSO <sub>4</sub>                        | Merck                            |
|                               | 20 mM Glucose                                  | Merck                            |
| <b>5% FCS-Medium</b>          | 5% (v/v) fötales Kalbsserum                    | Sigma                            |

| Medien   | Komponente  | Hersteller                            |
|--|---|---------------------------------------|
| <b>FCS-Agar</b>  | 5% FCS-Medium<br>1% (w/v) Agar  | Difco                                 |
| <b>Lee's-Medium</b> (LEE <i>et al.</i> , 1975)                 | Definiertes synthetisches Medium,<br>eingestellt auf pH 4,5 oder pH 6,5                                 |                                       |
| <b>SD-Agar</b>   | SD-Minimalmedium<br>1% (w/v) Agar   | Difco                                 |
| <b>SD mit 1 M Sorbitol</b>                                     | SD-Minimalmedium<br>1 M Sorbitol  | Sigma                                 |
| <b>SD-Agar mit 1 M Sorbitol</b>                                | SD-Agar<br>1 M Sorbitol   | Sigma                                 |
| <b>SD-Agar mit 7% (w/v) Glycerol</b>                           |   | Merck                                 |
| <b>SD-Agar mit 3% (w/v) Glycerol und 2% (w/v) Kaliumacetat</b> |   | Merck / Merck                         |
| <b>SD-Agar mit 3% (w/v) Glycerol und 2% (w/v) Galactose</b>    |   | Merck / Merck                         |
| <b>SD-Agar mit 5% (w/v) Sorbitol</b>                           |   | Sigma                                 |
| <b>SD-Agar mit 6% (w/v) Sorbitol</b>                           |   | Sigma                                 |
| <b>SD-Agar mit 7% (w/v) Sorbitol</b>                           |   | Sigma                                 |
| <b>SD-Agar mit 1 M Natriumchlorid</b>                          |   | Merck                                 |
| <b>SD-Agar mit 1,25 M Natriumchlorid</b>                       |   | Merck                                 |
| <b>SD-FOA-Uridin-Selektionsagar</b>                            | SD-Medium<br>2% (w/v) Agar<br>0,1% (w/v) FOA (5-Fluororotat)<br>5-fluorotric acid<br>2,5% (w/v) Uridin  | Duchefa<br>Duchefa<br>Duchefa / Merck |
| <b>YNB-Minimalmedium mit Ammoniumsulfat</b>                    | 0,17% (w/v) YNB ohne Aminosäuren<br>und Ammoniumsulfat<br>0,5% (w/v) Ammoniumsulfat<br>2% (w/v) Glucose | Duchefa<br>Merck<br>Merck             |
| <b>YCB / BSA- Minimalmedium</b>                                | 1,17% (w/v) YCB<br>1% (w/v) Glucose<br>0,5% (w/v) BSA   | Duchefa<br>Merck<br>Sigma             |
| <b>YCB / BSA-Agar</b>  | YCB / BSA-Minimalmedium<br>2% (w/v) Agar  | Difco                                 |
| <b>YP</b>  | 1% (w/v) <u>Y</u> east extract<br>1% (w/v) <u>P</u> eptone  | Duchefa<br>Duchefa                    |
| <b>YP mit 5% (w/v) Galactose</b>                               |   | Merck                                 |
| <b>YP mit 2% (w/v) Raffinose</b>                               |   | Merck                                 |

| Medien   | Komponente                     | Hersteller    |
|--|--------------------------------|---------------|
| YPG-Vollmedium   | 1% (w/v) <u>Y</u> east extract | Duchefa       |
|  | 1% (w/v) <u>P</u> eptone       | Duchefa       |
|  | 2% (w/v) <u>G</u> lucose       | Merck         |
| YPG-Agar   | YPG-Vollmedium                 |               |
|  | 2% (w/v) Agar                  | Difco         |
| YPG-Agar mit 7% (w/v) Glycerol                           |                                | Merck         |
| YPG-Agar mit 3% (w/v) Glycerol und 2% (w/v) Kaliumacetat |                                | Merck / Merck |

## II.3. Puffer

### II.3.1. CITRAT-PUFFER

Für die Aktivitätstests von Aspartat-Proteasen (II.5.3.4., II.5.3.5., III.4.2.) wurde ein Reaktionspuffer mit verschiedenen pH-Werten verwendet. Dieser wurde aus 0,1 M Citrat-Puffer hergestellt, der sich aus zwei Stocklösungen zusammensetzt. Stock A entsprach der 0,1 M Citrationsäure-Lösung (pH 2,0) und Stock B entsprach der 0,1 M Natriumcitrat-Lösung (pH 8,0). Um den gewünschten pH-Wert einzustellen, wurden die unten aufgeführten Volumen (ml) beider Lösungen vermengt und auf 100 ml aufgefüllt (Tab. 3).

| Stock A | Stock B | pH  | Stock A | Stock B | pH  |
|---------|---------|-----|---------|---------|-----|
| 46,5    | 3,5     | 3,0 | 23,0    | 27,0    | 4,8 |
| 43,7    | 6,3     | 3,2 | 20,5    | 29,5    | 5,0 |
| 40,0    | 10,0    | 3,4 | 18,0    | 32,0    | 5,2 |
| 37,0    | 13,0    | 3,6 | 16,0    | 34,0    | 5,4 |
| 35,0    | 15,0    | 3,8 | 13,7    | 36,3    | 5,6 |
| 33,0    | 17,0    | 4,0 | 11,8    | 38,2    | 5,8 |
| 31,5    | 18,5    | 4,2 | 9,5     | 41,5    | 6,0 |
| 28,0    | 22,0    | 4,4 | 7,2     | 42,8    | 6,2 |
| 25,5    | 24,5    | 4,6 |         |         |     |

**Tab. 3. Zusammensetzung des Citrat-Puffers mit unterschiedlichen pH-Werten.**

### II.3.2. KALIUMPHOSPHAT-PUFFER

Die Wachstumssensitivität der hergestellten  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten wurde in YPG-Vollmedium und SD-Minimalmedium (II.2., II.4.2., III.3.5.) überprüft. Der benötigte pH-Wert in diesen Medien wurden mit dem zehnfachkonzentrierten 1 M Kaliumphosphatpuffer eingestellt, der aus Stock A: 1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (pH 9,2) und Stock B: 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (pH 4,0) zusammengesetzt wurde (Tab. 4). Um einen pH-Wert des Puffers zu erreichen, wurden die beiden Stocks in den unten angegebenen Mengen (ml) zusammengesetzt und auf 200 ml aufgefüllt.

| Stock A | Stock B | pH  | Stock A | Stock B | pH  |
|---------|---------|-----|---------|---------|-----|
| 8,5     | 91,5    | 5,8 | 61,5    | 38,5    | 7,0 |
| 13,2    | 86,8    | 6,0 | 71,7    | 28,3    | 7,2 |
| 19,2    | 80,8    | 6,2 | 80,2    | 19,8    | 7,4 |
| 27,8    | 72,2    | 6,4 | 86,6    | 13,4    | 7,6 |
| 38,1    | 61,9    | 6,6 | 90,8    | 9,2     | 7,8 |
| 49,7    | 50,3    | 6,8 | 94,8    | 6,0     | 8,0 |

**Tab. 4. Zusammensetzung des Kaliumphosphat-Puffers mit unterschiedlichen pH-Werten.**

## II.4. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

### II.4.1. Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte im LB-Flüssigmedium (II.2.) bei 37°C unter Schütteln mit 200 upm. Transformierte *E. coli* mit einem Selektionsplasmid (II.1.) wurden in LB-Medium mit Antibiotika-Zusatz (II.2.) kultiviert. Zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen in größeren Mengen wurde über Nacht eine 5 ml Vorkultur inkubiert und am nächsten Morgen damit eine 250-500 ml Hauptkultur angeimpft.

### II.4.2. Anzucht von *Candida sp.*

*Candida*-Kulturen wurden bei mäßigem Schütteln mit 120-150 upm in den Flüssigmedien (II.2.) kultiviert. Für die Transformation von *C. albicans* (II.5.2.19.), DNA-Isolierungen (II.5.2.3.) sowie Wachstumsuntersuchungen (III.3.5.) wurden 5 ml Vorkulturen, die zum Animpfen von Hauptkulturen sowie zum Auftragen von Zellsuspension auf Festmedien dienen, für 12-48 Stunden bei 37°C bzw. 24°C inkubiert. Nach der Transformation (II.5.2.19.) wurden die Zellen bzw. Protoplasten auf SD-Medium mit Sorbitol (II.2.) und nach der Regeneration der Zellen auf SD-Medium ohne Sorbitol (II.2.) ausplattiert und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Die Wachstumsuntersuchungen der hergestellten  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten im YPG-Flüssigmedium (II.2.) bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten (III.3.5.) wurden in ELISA-Platten durchgeführt. Die Näpfe der ELISA-Platten wurden jeweils mit 200  $\mu$ l YPG-Medium gefüllt, das auf jeweils einen der gewählten pH-Werte (II.3.) eingestellt und mit  $10^6$  Zellen / ml beimpft wurde. Das Wachstum wurde in in ELISA-Platten bei 595 nm in einem ELISA-Reader Dynatech MR 4000 (Dynatech Laboratories) photometrisch bestimmt.

Für die phänotypischen Untersuchungen der hergestellten  $\Delta sap9$ - und  $\Delta sap10$ -Mutanten beim Wachstum auf verschiedenen Festmedien (III.3.5.) wurde der Tropfentest angewandt. Die Zellen wurden über Nacht im YPG-Medium (II.2.) bei 37°C inkubiert und vor dem Auftragen mit sterilem Wasser gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden auf die Konzentration  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Zellen / ml eingestellt, in 10  $\mu$ l großen Tropfen auf Festmedien getropft und bei 37°C bzw. 22°C inkubiert.

### II.4.3. Myzelinduktion bei *C. albicans*

Die Ausbildung des Myzels kann von zahlreichen Faktoren ausgelöst werden (I.2.5.). In dieser Arbeit wurde der Hefe-Myzel-Übergang in Flüssigkulturen im Lee's-Medium durch pH und Temperaturwechsel (II.2., BUFFO *et al.*, 1984) und durch Zusatz von Serum (II.2., GOW & GOODAY, 1982) induziert. Zur Myzelinduktion wurde die Vorkultur über Nacht in Lee's-Medium pH 4,5 inkubiert. Unter diesen Bedingungen kann die Bildung von Zellen ausschließlich in Hefeform erreicht werden. Vor dem Beimpfen von Lee's-pH 6,5 bzw. 5%igen FCS-Medien (II.2.) zur Myzelinduktion wurden die Zellzahl in der Vorkultur bestimmt und die Zellen mit sterilem Wasser gewaschen. Zum Sedimentieren wurden die Zellen bei 1.600 x g zentrifugiert. Die Hauptkulturen wurden mit  $5 \times 10^6$  bis maximal  $1 \times 10^7$  Zellen / ml beimpft, da bei höheren Zelldichte die Effizienz der Myzelinduktion stark abnimmt. Die Inkubation der Zellkulturen in Lee's- und Serum-Medien erfolgte unter Schütteln bei 200 upm und 37°C. Die Zellen wurden in der Regel in dreißigminütigen Abständen geerntet und bei 5.000 x g und 4°C pelletiert. Für die RNA-Aufarbeitung (II.5.1.1.) wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### II.4.4. Infektionsmodelle von *C. albicans*

In der Arbeit wurden mehrere Infektionsmodelle von *C. albicans* verwendet. Das Modell für orale Kandidosen – das RHE (I.3.5.) - beruht auf einer Gewebekultur aus oralen humanen Epithelzellen. Das RHE-Modell (Skinethic) besteht aus einer durch eine Polycarbonatunterlage gestützten mehrschichtigen und hochdifferenzierten Schleimhaut ohne *Stratum corneum*, die aus einer menschlichen Keratinozyten-Tumorzelllinie erzeugt werden. Die Infektion des RHE mit *C. albicans* (III.1.2.1.) wurde nach SCHALLER *et al.* (1998) durchgeführt.

Für Expressionsuntersuchungen der *SAP*-Gene *in vivo* (III.1.2.) wurden die mit *C. albicans* infizierten Gewebe aus Mäusen nach oraler (III.1.2.1.) oder

i. p. Infektion (III.1.2.2.) von M. Kretschmar und T. Nichterlein zur Verfügung gestellt. Für orale Infektionen wurden DBA/2- und Balb/c-Mäusestämme und für i. p. Infektionen Balb/c-Mäuse eingesetzt. Zum Inokulieren wurden *C. albicans*-Zellen über Nacht im YPG-Flüssigmedium bei 37°C inkubiert, anschließend zwei mal mit PBS gewaschen und in gleichem Puffer resuspendiert. Mit  $1 \times 10^8$  *Candida*-Zellen wurden die Tiere oral bzw. intra peritoneal infiziert (M. KRETSCHMAR & T. NICHTERLEIN, persönliche Mitteilung, KRETSCHMAR *et al.*, 1999, 2002).

Die Expression der Gene *SAP9* und *SAP10* wurde in menschlichem Blut getestet (III.3.2.). Für dieses Infektionsmodell wurde eine Vorkultur von *C. albicans* Stamm SC5314 in Lee's-Medium bei pH 4,5 angezogen (II.2., II.4.3). Die *C. albicans*-Zellen wurden zwei mal mit PBS gewaschen. Das frische, menschliche Blut mit Heparin-Zusatz wurde mit  $5 \times 10^7$  in der Hefeform befindlichen, Zellen inokuliert und bei 37°C inkubiert.

## **II.5. Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **II.5.1. ARBEITEN MIT RNA**

Aufgrund starker Labilität der RNA verlangt die Arbeit mit dieser Substanz bestimmte Vorsichtsmaßnahmen. Eine Degradation der RNA kann ein Resultat sowohl enzymatischer als auch chemischer Reaktionen sein. RNasen befinden sich in größeren Mengen auf der menschlichen Haut. Deshalb wurden Handschuhe während der Arbeit getragen und die Proben auf Eis aufbewahrt. Die Gefäßoberflächen, die mit Arbeitslösungen in Kontakt kommen sollten, wurden thermisch bzw. chemisch behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu inaktivieren. Glas- und Keramikgefäße bzw. Metallteile wurden bei ca. 200°C zwei Stunden gebacken. Plastikgefäße und andere Gegenstände, die thermisch nicht behandelt werden konnten, wurden mit 0,1 M NaOH 10 min behandelt und anschließend gut mit Wasser gespült. Das hochreine Wasser für die Herstellung benötigter Lösungen bzw.

zum Aufnehmen der RNA wurde direkt aus einer Wasseraufbereitungsanlage (Millipore) benutzt. Die geernteten Zellkulturen wurden bei 4°C und 3500 upm 5 min pelletiert und das Pellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren (III.1.1., III.3.5.). Langfristig wurden die Zellen für eine spätere RNA-Aufreinigung und bereits isolierte RNA bei -70°C gelagert.

#### **II.5.1.1. RNA-ISOLIERUNG AUS ZELLKULTUREN**

RNA-Isolierungen aus Zellkulturen (III.1.1.) und infizierten Mäuse-Organen (III.1.2.) erfolgte mit Hilfe von peqGOLD RNAPure™ Reagenz (PeqLab Biotechnologie). Das Verfahren basiert auf einer Extraktionsmethode mit einer einphasigen Mischung aus Guanidinthiocyanat und Phenol (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). Zur Aufreinigung der RNA aus Zellkulturen (II.4.3., III.1.1.) wurden durchschnittlich  $5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  Zellen aufgearbeitet. Das Zellpellet wurde mit 1 ml peqGOLD RNAPure™ und einer Spatelspitze voll Glassperlen versetzt. Die Zellen wurden durch fünfminütiges Vortexen aufgeschlossen. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

#### **II.5.1.2. ISOLIERUNG VON RNA AUS INFIZIERTEN ORGANEN**

Die Isolierung der RNA aus Organen wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Organe (II.4.4.) wurden im peqGOLD RNAPure™-Kit (Peqlab Biotechnologie) mit dem Ultraturrax dispergiert. Unmittelbar vor dem Aufarbeiten der Organe wurde deren Gewicht bestimmt und pro 50-100 mg Organgewebe wurde 1 ml peqGOLD RNAPure™-Kit verwendet. Die Gewebesuspension wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann bei 12.000 x g und 4°C 10 min zentrifugiert. Dabei wurden die Gewebereste und Fette pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt, 10-15 s auf dem Vortexer gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig, ohne das man die DNA-haltige Interphase berührte, abgenommen und erneut mit 500 µl peqGOLD RNAPure™-Kit und 50 µl Chloroform ausgeschüttelt. Nach der

Zentrifugation wurde die RNA aus der oberen Phase mit 700 µl Isopropanol bei RT 10-15 min gefällt und 10 min bei 12.000 x g und 4°C pelletiert. Anschließend wurde sie mit 70% Ethanol gewaschen und, je nach Organgröße, in 30-60 µl Wasser aufgenommen. Zum vollständigen Lösen des RNA-Pellets wurde die Probe 10 min bei 55°C mäßig geschüttelt. Die Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde sowohl photometrisch als auch elektrophoretisch (II.5.1.5., II.5.1.4.) bestimmt.

### II.5.1.3. RNA-FÄLLUNG

Um stark verdünnte RNA-Lösungen zu konzentrieren, wurde die RNA entweder mit einem Volumen Isopropanol oder zwei Volumina Ethanol oder einem Volumen 4 M LiCl gefällt. Mit Isopropanol wurde die RNA 10 min bei RT und mit Ethanol 30 min bei -70°C aus der Lösung gefällt. Bei geringen Mengen wurde die RNA-Fällung durch einen Zusatz von 70 µg Glycogen (PeqLab) verstärkt. Nach dem Pelletieren durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4°C, wurde die RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Bei der Fällung mit 4 M LiCl wurde die RNA 10 min bei 3.000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die gefällte RNA wurde nur kurz bei RT getrocknet, im Wasser aufgenommen und 10 min bei 55°C und mäßigem Schütteln gelöst.

### II.5.1.4. RNA-AUFTRENNUNG

Um die RNA auf den intakten Zustand zu prüfen bzw. die Mengen abzuschätzen, wurden sie in denaturierenden Formaldehyd- und in nicht denaturierenden Tris-Borat-EDTA- (TBE) 1% Agarose-Gelen untersucht.

Die erste Auftrennungsmethode erfolgte in Gegenwart von 1 x MOPS-Puffer (20 mM Morpholinopropanesulphonsäure (MOPS), 8 mM Natriumacetat, 0,1 mM Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA, pH 8,0)) und Formaldehyd zu 37% (v/v) Endkonzentration in der Agaroselösung. Der Laufpuffer bestand aus 1 x MOPS-Puffer. Vor dem Beladen des Gels wurden die RNA-haltigen Lösungen 4,5 µl mit 14,5 µl MFF-Denaturierungsladepuffer (10 x MOPS, 37% (v/v) Formaldehyd, 50% (v/v) Formamid) versetzt und bei 65°C für

15 min inkubiert. Nach dem Denaturieren wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt und dann kurz zentrifugiert. Zu den Ansätzen wurden 2 µl Beladungspuffer (50% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25% (w/v) Xylencyanol und 0,25% (w/v) Bromphenolblau) hinzugegeben. Die RNA wurde bei 5 V pro cm Gel mehrere Stunden aufgetrennt.

Schneller konnte die RNA in nicht denaturierenden 1%TBE-Gelen (90 mM Tris-Borat (pH 8,0), 2 mM EDTA) bei 70 V für 30 min aufgetrennt werden. Die RNA-haltigen Lösungen nach der fünfminütigen Denaturierung bei 65°C wurden auf Eis gestellt, mit Beladungspuffer (15% (w/v) Ficoll, 0,25% (w/v) Xylencyanol und 0,25% (w/v) Bromphenolblau) entsprechend 1:5 versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die RNA im Agarose-Gel wurde in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) ca. 1 min gefärbt und auf dem UV-Tisch analysiert.

#### **II.5.1.5. PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA wurde bei 260 nm Wellenlänge getestet. Dabei wurde angenommen, dass bei der Extinktion 1 die Konzentration der RNA 40 µg/ml betrug. Eine DNA- bzw. Protein-freie RNA-Lösung ergibt einen 260 nm / 280 nm-Quotienten von 1,6 - 1,8.

#### **II.5.1.6. HERSTELLUNG VON cDNA AUS *CANDIDA*-ZELLKULTUREN**

Die isolierte, gesamte RNA wurde für die Expressionsanalyse mittels RT-PCR verwendet. Es wurden 500 ng bis 2 µg RNA für die *in vitro* Untersuchungen (III.1.1.) zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Herstellung der cDNA aus mit *C. albicans* infizierten Gewebe (II.5.1.7.) wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Vor einer unmittelbaren cDNA-Synthese wurden eventuell vorhandene DNA-Reste aus den Ansätzen entfernt, indem die RNA-Lösung mit 40 U RNaseOUT™ (Gibco BRL Life Technologies), einem RNase-Inhibitor, und DNaseI (Gibco BRL Life Technologies, bzw. Promega) nach dem Protokoll der Hersteller behandelt wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA (pH 8,0) und Inkubation bei 70°C für 10 min gestoppt. Gleichzeitig führte die Erhitzung der Ansätze zum

Auflösen der sekundären Struktur der RNA. Um diese Konformationsänderung aufrechtzuerhalten, wurden die Ansätze gleich auf Eis gestellt. Für die Erststrangsynthese der DNA wurden 500 ng Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (MWG), 5 x First Strand Buffer (Gibco BRL Life Technologies), 0,1 mM DTT (Gibco BRL Life Technologies), 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas) und 40 U RNaseOUT™ (Gibco BRL Life Technologies) zu den Ansätzen hinzupipettiert. Die 20 µl Reaktionsansätze wurden 2 min bei 42°C vorgewärmt und nach Zugabe von 200 U Superscript™-Reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies) eine Stunde bei gleichbleibender Temperatur weiter inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Erhitzung auf 70°C für 15 min gestoppt.

#### **II.5.1.7. HERSTELLUNG VON cDNA AUS INFIZIERTEN ORGANEN**

Da der Hintergrund der Wirts-RNA sehr hoch war, wurden für die Herstellung der cDNA 20 µg gesamt RNA in maximal 7,8 µl eingesetzt. Die RNA wurde zuerst im Gegenwart von 40 U RNaseOUT™ (Gibco BRL Life Technologies) mit 2 U DNase (Gibco BRL Life Technologies) im 12 µl Reaktionsansatz 15-20 min bei RT inkubiert. Zum Inaktivieren des Enzyms wurde 1 µl 25 mM EDTA hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für die Erststrangsynthese wurden folgende Komponente hinzugegeben: 50 U RNaseOUT™ (Gibco BRL Life Technologies), First Strand Buffer (Gibco BRL Life Technologies), 0,1 M DTT (Gibco BRL Life Technologies), 500 ng Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (MWG) und 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas). Der Ansatz wurde 2 min bei 42°C aufgewärmt und nach Zugabe von 200 U Reverse Transkriptase Superscript™ II (Gibco BRL Life Technologies) 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Durch Erhitzung des Ansatzes auf 70°C für 15 min wurde die Reaktion gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde von RNA-Resten, Oligonukleotiden und dNTPs über die NucleoSpin Extract™-Röhrchen (Macherey-Nagel) gereinigt. Der 25 µl Ansatz wurde mit 75 µl TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) aufgefüllt und mit 400 µl NT2-Puffer (Macherey-Nagel) versetzt. Das Gemisch wurde auf die Säule geladen und 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf aus dem Sammelgefäß wurde entfernt und die gebundene

cDNA wurde mit 500 µl NTW-Puffer (Macherey-Nagel) und anschließend mit 500 µl NT3-Puffer (Macherey-Nagel) gewaschen. Die cDNA wurde mit 50 µl Wasser nach der Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 min von der Säule eluiert und bis zu zwei Wochen für weitere Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt.

Die hergestellte cDNA wurde anschließend auf Verunreinigungen mit genomischer DNA überprüft, indem eine Amplifikation eines Intron-haltigen Haushaltsgens durchgeführt wurde. Für die Kontroll-PCR wurden Primer für das Gen des Elongationsfaktors 1β (*EFB1*) gewählt (II.5.2.11.), die außerhalb des Introns lokalisiert sind und bei einer Kontamination mit genomischer DNA ein Fragment mit Intron von 918 bp erfassen. Die reine cDNA als eine Kopie der mRNA beinhaltet kein Intron. Deshalb ergibt deren Amplifikation mit dem gleichen Primerpaar ein kleineres Fragment von 554 bp, dessen Größe sich genau um die Größe des Introns unterscheidet.

## II.5.2. ARBEITEN MIT DNA

### II.5.2.1. ISOLIERUNG VON PLASMIDEN AUS *E. COLI*-ZELLEN IM GROßEN MAßSTAB

Um große Mengen von Plasmid zu isolieren, wurden 250 ml Hauptkultur mit 5 ml LB-Vorkultur mit Antibiotika-Zusatz (II.2.) angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Zellen 20 min bei 2.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA resuspendiert und 300 µl 50 mg/ml in TE (II.5.1.7.) gelöstem Lysozym dazugegeben. Nach 10 min Inkubation wurde die Zellsuspension in 30 ml Nalgene®-Röhrchen überführt und mit 10 ml Denaturierungslösung (0,2 N NaOH, 1% SDS) versetzt, gut gemischt und 10 min auf dem Eis inkubiert. Zum Schluss wurden 7,5 ml von der Neutralisierungslösung (3 M Kalium, 5 M Acetat) hinzugegeben und nach gleicher Inkubationszeit auf Eis 30 min bei 45.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und 15 min bei RT stehen gelassen. Nach dem Pelletieren (10 min, 13.000 x g) wurde das Pellet getrocknet und in 8 ml TE-Puffer aufgenommen. Durch Eingabe von 8 ml 5 M LiCl-Lösung und anschließender fünfzehnminütigen Inkubation auf dem Eis wurde die RNA

gefällt. Nach dem Abzentrifugieren für 15 min bei 20.000 x g und 4°C wurde der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, 10 min auf dem Eis stehen gelassen und die gefällte DNA 10 min bei 20.000 x g und 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 5 ml TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase aufgenommen. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C (alternativ bei 4°C über Nacht) wurde die DNA-Lösung in PE-Röhrchen überführt und zweimal mit 5 ml Phenol / Chloroform (1:1) extrahiert. Nach jedem Ausschütteln wurde das Extrakt 4 min bei 600 x g und RT zentrifugiert und die Oberphase jeweils in ein neues Reagenzröhrchen überführt. Anschließend wurde das restliche Phenol mit 10 ml Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, abzentrifugiert und die obere Phase in 30 ml Nalgene®-Röhrchen überführt. Die DNA wurde mit 0,8 Volumen Isopropanol gefällt und 1 Stunde auf dem Eis oder alternativ bei 4°C über Nacht inkubiert. Die pelletierte DNA wurde dann mit 10 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde, je nach Ausbeute, in 150-500 µl TE-Puffer aufgenommen und 0,5 µl davon für die Mengenbestimmung auf ein Agarose-Gel (II.5.2.8.) aufgetragen.

#### **II.5.2.2. PRÄPARATION VON PLASMIDEN AUS *E. COLI*-ZELLEN IN KLEINEM MAßSTAB (TENS-METHOD)**

Zur Isolierung von kleinen Mengen an Plasmiden wurden 1,5 ml einer über Nacht inkubierten Kultur 1 min bei maximaler Umdrehungszahl in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgegossen. Darin wurde das Zellpellet resuspendiert und mit 300 µl 5 x TENS-Puffer (1 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 N NaOH, 0,5% (w/v) SDS) versetzt. Die gut gemischte Zellsuspension wurde 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurden 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) hinzugegeben und wieder gut gemischt. Durch eine dreiminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden Zellreste und ausgefallene Proteine pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß mit 1 ml 96%igem Ethanol überführt, gemischt und erneut 3 min zentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol versetzt, 1 min bei maximalen Umdrehungen zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wurde in

30 µl TE-Puffer (II.5.1.7.) mit 20 µg/ml RNase resuspendiert. Von dieser DNA-Lösung wurden 5 µl anschließend für einen Restriktionsendonukleasen-Verdau (II.5.2.7.) eingesetzt.

### **II.5.2.3. PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS *CANDIDA SP.* IM GROßEN**

#### **MARSTAB**

Um große Mengen der genomischen DNA aus *Candida sp.* zu isolieren wurden 50 ml Zellkultur in einem Falcon-Tube 5 min bei 1.550 x g und RT zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml 0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl 14 mM Mercaptoethanol sowie eine Spatelspitze Lyticase (entspricht ungefähr 0,2% (w/v) Endkonzentration) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30-90 min bei 37°C inkubiert und dann 10 min bei 6.200 x g und RT zentrifugiert. Das Protoplasten-Pellet wurde in 2,45 ml 50 mM EDTA, 75 mM Tris Base, 0,4%igem (w/v) SDS aufgenommen und bei 65°C 30-90 min in einem Wasserbad inkubiert. Mit 400 µl 5 M Kaliumacetat wurden aus dem Zelllysat die Proteine gefällt und 10 min bei 6.200 x g und RT pelletiert. Der Überstand wurde in einem neuen Tube mit zwei Volumina 96%igem Ethanol versetzt und kurz bei RT stehen gelassen. Die bei 6.200 x g und bei RT für 10 min pelletierten Nukleinsäuren wurden mit 3 ml 70%igem Ethanol versetzt und erneut 5 min bei 6.200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4,5 ml TE aufgelöst und 0,5 ml 10% (w/v) SDS, sowie eine Spatelspitze Proteinase K (entspricht ungefähr 0,2% (w/v) Endkonzentration) wurden zugegeben. Anschließend wurde bei 37°C mindestens 45 min geschüttelt. Der Ansatz wurde mit einem Volumen Phenol / Chloroform (1:1) aufgeschüttelt und zur Phasentrennung 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in einem neuen Tube mit zwei Volumina 96%igem Ethanol versetzt und die gefällte DNA, wie oben beschrieben, gewaschen. Das Pellet wurde dann in 2 ml TE-Puffer und 10 µl 10 mg/ml RNase A-Stammlösung aufgenommen und bei 37°C 30-90 min in einem Wasserbad inkubiert. Die DNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt und mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde schließlich in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C zum Resuspendieren stehen gelassen.

#### **II.5.2.4. PRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS *C. ALBICANS* IN KLEINEM MAßSTAB**

Zur Aufreinigung von geringen Mengen genomischer DNA aus *C. albicans* wurden 1,5 ml von einer über Nacht inkubierten Kultur 5 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl 0,9 M Sorbitol, 0,1 M EDTA aufgelöst, und es wurden 2 µl 14 mM Mercaptoethanol sowie eine Spatelspitze Lyticase (entspricht ungefähr 0,2% (w/v) Endkonzentration) dazugegeben. Die Ansätze wurden 30-90 min bei 37°C inkubiert und 5 min bei 2.500 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 245 µl 50 mM EDTA, 80 mM Tris Base, 0,4%igem (w/v) SDS resuspendiert. Die Ansätze wurden 30-90 min bei 70°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 40 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach kurzer Inkubation bei RT wurden die Nukleinsäuren 20 min bei 13.000 x g pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 13.000 x g 5 min erneut zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit RNase (50 µg/ml) resuspendiert. Zehn µg wurden für eine Southern-Blot-Analyse (II.5.2.12.) eingesetzt.

#### **II.5.2.5. PHENOL / CHLOROFORM-EXTRAKTION VON DNA**

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese mit Phenol / Chloroform (1:1) extrahiert. Die DNA-haltige Lösung wurde nach Bedarf auf ein Mindestvolumen von 100 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und mit einem Volumen Phenol / Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde der Extrakt zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß überführt. Aus dieser Phase wurde die DNA mit Ethanol gefällt (II.5.2.6.).

#### **II.5.2.6. FÄLLUNG VON DNA AUS LÖSUNGEN**

Mittels DNA-Fällung mit Ethanol, Isopropanol oder Butanol wurde DNA aus stark verdünnten Lösungen angereichert. Für die Fällung der DNA aus kleinen Volumina wurde standardmäßig Ethanol verwendet. Bei den stark

verdünnten DNA-Lösungen bzw. großen Volumina wurde Isopropanol eingesetzt. Zum Entsalzen der DNA in kleinen Volumina, wie z. B. nach einer Ligation (II.5.2.16), wurde Butanol verwendet. Bei der Ethanol- bzw. Isopropanol-Fällung wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und zwei Volumina 96%igem Ethanol bzw. 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 0,8 Volumina Isopropanol versetzt. Bei Ethanolfällungen wurden Ansätze 10 min auf dem Eis inkubiert und die DNA 30 min bei maximalen Umdrehungen und 0°C pelletiert. Die mit Isopropanol gefällte DNA wurde bei RT inkubiert und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in beiden Fällen anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Bei der Fällung mit Butanol wurden die Ansätze auf 50 µl aufgefüllt und mit 10 Volumen Butanol versetzt. Dieser Ansatz wurde gut gemischt, bis die Phasentrennung nicht mehr sichtbar war, und 15 min bei RT und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Butanol-Überstand wurde restlos abgenommen. Nach allen Fällungsmethoden wurde das DNA-Pellet getrocknet und in destilliertem Wasser bzw. TE-Puffer aufgenommen.

#### **II.5.2.7. HYDROLYSE VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN**

Für die Restriktion von DNA wurden als Minimum 10 µl Ansätze eingesetzt. Diese setzten sich aus der DNA, einem, dem Enzym entsprechenden Puffer des Herstellers und dem jeweiligen Enzym zusammen. In der Regel wurden für einen vollständigen Verdau 3 U Enzym pro µg Plasmid-DNA bzw. 5 U Enzym pro µg genomischer DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1-24 Stunden. Die Inkubations- bzw. Inaktivierungstemperaturen wurde vom Hersteller (MBI Fermentas, BioLabs, Roche und Pharmacia) vorgegeben.

#### **II.5.2.8. AGAROSEGELELEKTROPHORESE**

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte in der Regel in 1% (w/v) TBE-Agarose-Gelen (II.5.1.3.) in Horizontalelektrophorese-Kammern. Die Auftrennung unbehandelter, genomischer DNA wurde in 0,8% (w/v) Agarose-Gelen durchgeführt. Für die Präparation von DNA-Fragmenten aus der Agarose-Gelen (II.5.2.9.) wurden modifizierte 1% (w/v) TAE-Agarose-Gele (40 mM Tris-Aacetat (pH 8,0), 0,1 mM Natrium-EDTA) angewendet. Die DNA-

Ansätze wurden mit dem Beladungspuffer (15% (w/v) Ficoll, 0,25% (w/v) Xylencyanol und 0,25% (w/v) Bromphenolblau) 5:1 vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größen- bzw. Mengenbestimmung der Fragmente in den Proben wurden kommerzielle DNA-Längenstandards (MBI Fermentas, Eurogentec) mit definierten Fragmenten auf das Gel mitaufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer angelegten Spannung von 50 V bis 180 V durchgeführt. Die Agarose-Gele wurden anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) 10 min inkubiert und chemolumineszierende DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Tisch analysiert.

#### **II.5.2.9. ELUIEREN VON DNA-FRAGMENTEN AUS EINEM AGAROSE-GEL**

Um ein definiertes DNA-Fragment zu isolieren, erfolgte die Auftrennung der DNA in einem Agarose-Gel (II.5.2.8.) mit extra breiten Taschen. Für eine schärfere Auftrennung wurde eine Spannung von maximal 50 V angelegt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und das richtige Fragment auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Prep-A-Gene® DNA Isolierungs-Kits (Bio-Rad) bzw. NucleoSpin Extract Kit (Macherey & Nagel) bzw. Ultrafee®-DA (Millipore) aus dem Agarose-Gel eluiert.

#### **II.5.2.10. DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG**

Die DNA-Konzentration lässt sich spektralphotometrisch bei 260 nm Wellenlänge bestimmen, wobei angenommen wird, dass bei der Extinktion 1 die Konzentration doppelsträngiger DNA 50 µg/ml und einzelsträngiger DNA-Oligonukleotiden 33 µg/ml beträgt.

In Agarose-Gelen lässt sich die DNA-Konzentration visuell bestimmen, indem man die DNA zusammen mit einer definierten Menge von Marker-DNA elektrophoretisch auftrennt und sie nach Anfärben mit Ethidiumbromid mit dieser vergleicht.

### II.5.2.11. POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente angewandt. Für die Ansätze wurden Puffer und MgCl<sub>2</sub>-Lösungen vom Hersteller eingesetzt. Die Amplifikation langer Fragmente über 3 kb und von Fragmenten zwecks weiterer Klonierung erfolgte mit Hilfe des Expand™ Long Template PCR Systems (Roche) mit Kontrolllesefunktion („Proof reading“) bzw. eLONGase™ Enzyme Mix (Gibco BRL) nach den Protokollen der Hersteller.

| Primer  | Sequenz (5'→3')  |
|---|--|
| hisG 3' 3'  | GGCGCGACTTCGACAGAACC   |
| S6Re 5'<br>3'   | <u>AAGGCCTT</u> GACATAGTACGCCTCAAATGGAAG<br><u>AAGGCCTT</u> TATCACTACATTAAGTTCACTCAC   |
| SAP9 5'<br>5'2<br>5'3<br>3'2<br>9Sacl 5'<br>9XhoI 3'  | GTGCCACCAAATGAGAC<br>CTCAATACTGCCGATGC<br>CTGCTAAGGCACCTTTCAA<br>TAAACCAAACATAGTAGGATA<br><u>CGAGCTCGT</u> GCCACCAAATGAGAC<br><u>CCGCTCGAGCGG</u> TATAAGACACTTGAGCTA   |
| SAP10 10B<br>10T7R1<br>10T7R2<br>10T7R3<br>10T3-1<br>10T3-2<br>10T3-3<br>10KpnI 3'<br>10HindIII 3'<br>10Sacl 5' | AAGAGTGGCCAAGAGCATCA<br>CGGATGATGATCTCAACCTAC<br>ACTCGTCAAATTCACCACGT<br>CAACAAGTACTTCATTTACAC<br>CAAATTCGTACATTCACTG<br>TGTCGTTGATAAGAGGCATTG<br>TAATATCCAAACTACCAAATC<br><u>CGGGGTACCCCG</u> TCAGATACACTCGATCTATTGGC<br><u>CCCAAGCTTGGG</u> TGTAAATGAAGTATTTGTTGG<br><u>CGAGCTCGT</u> TAATAATGAATTTGTATT |
| URA3 5'-PstI<br>3'-PstI   | <u>AACTGCAGAACCAATGCATTGG</u> AGTACTAATAGGAATTGATTTGG<br><u>AACTGCAGAACCAATGCATTGG</u> TGATTGTAAATAGTAATAATTAC   |
| Yapsin1 YPS1 3'<br>YPS1 5'  | AACAAGCGCGACGACGACTC<br>GTGCCATGGATATTTCAAGATTG  |
| Yapsin2 YPS2 3'<br>YPS2 5'  | CTTTGGCTAGCGTGGTTGAGAG<br>GATTGTGCTCCGTTTTCTTTTC   |

**Tab. 5. Die für Klonierungen, Sequenzierungen, Herstellung von den Sonden und Analyse von *C. albicans* Mutanten in der Arbeit verwendeten Primer.**

Um die Amplifikation unspezifischer Fragmente zu reduzieren, wurde eine sogenannte „hot start“ PCR mit Zugabe von Taq-Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt angewandt. Die Test-PCR bzw. PCR mit cDNA

als Template (II.5.1.6., II.5.1.7.) wurden mit *Taq* DNA Polymerase (Gibco BRL Life Technologies) durchgeführt.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Primer bei den Firmen MWG-Biotech AG und TIB MOLBIOL Syntheselabor hergestellt. Die Klonierungsprimer (Tab. 5) wurden mit Restriktionsschnittstellen entworfen (II.5.2.16.). Die Palindrome in solchen Primer sind unterstrichen. Primer, die für die Sequenzierungen und Analysen von *C. albicans* Mutanten verwendet wurden, sind ebenfalls in der Tabelle 5 aufgeführt.

| Primer | Sequenz (5'→3')  | Fragment-Größe                 | Tm           | Publikation  |
|--------|--|--------------------------------|--------------|--|
| EFB1   | 5' ATTGAACGAATTCTTGGCGAC<br>3' CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG        | 554 bp (cDNA)<br>918 bp (gDNA) |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP1   | 5' AGGGAAAGGTATTTACTACT<br>3' GATTTGCTTACATAGTAAGTAC         | 1002 bp                        |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP2   | 5' GTTGATTGTCAAGTCACTTATAGTG<br>3' TCTTAGGTCAAGGCAGAAATACTGG | 898 bp                         |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP3   | 5' TGGATTGGAACATTTCTAATTC<br>3' CAATCTCCAGAGGAGTACTTCC       | 1285 bp                        |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP4   | 5' TTTTCATTAACAACCAACCATTTC<br>3' GTCCTGGTGGCTTCGTTGC        | 739bp                          |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP5   | 5' CCATACATTCAAATGGCAAGCTCG<br>3' ATAATTAATCTAAAGTCAAAGTTC   | 1544 bp                        | 62°C         | vorliegende Arbeit<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999            |
| SAP6   | 5' TTCTTCAAACGTTTTAATTCTCT<br>3' CATAAATGACTTCAAAATATAAAT    | 1516 bp                        |              | SCHALLER <i>et al.</i> , 1999<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999 |
| SAP7   | 5' TCTTCTTCACTGGAAGCTGC<br>3' AGGAACAACGGCATGGTTATC          | 1199 bp                        | 57°C<br>57°C | vorliegende Arbeit<br>vorliegende Arbeit                       |
| SAP8   | 5' TGGCTCAAGGTCTTGCTATC<br>3' CTCTATAAAGTAGAAATACTTGA        | 1161 bp                        | 57°C         | vorliegende Arbeit<br>SCHALLER <i>et al.</i> , 1999            |
| SAP9   | 5' CTCAATACTGCCGATGC<br>3' TAAACCAAACATAGTAGGATA             | 717 bp                         | 51°C<br>52°C | vorliegende Arbeit<br>vorliegende Arbeit                       |
| SAP10  | 5' CGGATGATGATCTCAACCTAC<br>3' CAAATTCGTCACATTCCTG           | 955 bp                         | 57°C<br>53°C | vorliegende Arbeit<br>vorliegende Arbeit                       |

**Tab. 6. Primer zur Expressionsanalyse von SAP-Genen *in vitro*.**  
Abkürzung: Tm - Annealing Temperatur, gDNA – genomische DNA.

In den Tabellen 6 und 11 (III.1.2.) aufgeführten Primer wurden bei der Untersuchung der Expression der *SAP*-Gene *in vitro* (III.1.1.) und *in vivo* (III.1.2.) mittels RT-PCR (II.5.1.5.) verwendet.

Mit Hilfe eines zyklischen Gradienten-Thermoblock (Biometra) wurde eine optimale „Annealing“-Temperatur der Primerpaare ermittelt. Die PCR wurde in der Regel im 25 µl Ansatz durchgeführt. Die grundsätzliche Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in der Tabelle 7 zusammengefasst. Der zyklische Thermoblock (Primus (MWG), Personal (Biometra)) in dem die Reaktion ablief, wurde vor dem Start der Amplifikation auf 95°C vorgeheizt. Die PCR-Programme wurden nach dem folgenden Muster programmiert: der erste Zyklus dauerte 3 min bei 94°C, die nächsten 25 bis 40 Zyklen je 30 s bei 94°C, 30 s bei 50°C-68°C und 60 s pro 1000 bp langes Fragment bei 72°C. Abschließend wurden die PCR-Ansätze 8 min bei 72°C inkubiert.

| Stocklösung                            | Endkonzentration           |
|--|----------------------------|
| 10 x PCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> | 1 x                        |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>                | 1,5 mM                     |
| 10 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas)         | 0,2 mM von jedem Nukleotid |
| 100 pmol/µl Primer                     | 50 pmol von jedem Primer   |
| Template-DNA                           | 100 ng                     |
| 100 µg/ml BSA (MBI Fermentas)          | 125 ng                     |
| <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)        | 1,25 Units                 |

**Tab. 7. Standard-Zusammensetzung der PCR-Ansätze.**

#### II.5.2.12. SOUTHERN-BLOT

Zur DNA-Detektion wurde die Methode der nicht radioaktiven DIG-DNA-Markierung mit Hilfe des DIG Easy Hyb Kits (Roche) angewandt. Die hochsensitiven, DIG-markierten Sonden wurde in einer PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) hergestellt. Die PCR-Produkte wurden aus geringen Mengen genomischer DNA (1-100 ng) amplifiziert und unter den gleichen Bedingungen, wie bei einer optimierten PCR (II.5.2.11.) markiert. Die DIG-Markierung wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (II.5.2.8.)

überprüft. Durch den Einbau von DIG-dUTP in die Amplifikate erhöhte sich im Vergleich zu nicht markierten Fragmenten das Molekulargewicht der PCR-Fragmente. Für die Hybridisierung wurden mindestens 2 µl von dem PCR-Ansatz pro ml Hybridisierungslösung angesetzt. Die Sonden wurden bei -20°C aufbewahrt und bei Wiederverwendung 10 min bei 68°C denaturiert. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen-Agarosegel (II.5.2.8.) mit DIG markiertem DNA-Längenstandard VII (Roche) bei 70 V für 3-4 Stunden getrennt. Der Vakuumblotter (Amersham Pharmacia Biotech) wurde für die Inbetriebnahme vorbereitet und über eine Waschflasche an einer Vakuumpumpe angeschlossen, die auf 30-50 mbar eingestellt war. Auf das Gel wurde mit einer Glaspipette Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) aufgetragen, und 20 min denaturiert. Die Lösung wurde dann abgenommen und eine Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,5)) für den gleichen Zeitraum aufgetragen. Die DNA wurde 2-5 Stunden mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0-7,2)) auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen.

Anschließend wurde die Nylonmembran im UV-Crosslinker bestrahlt, um die transferierte DNA kovalent an die Membran zu binden. Die Membran wurde in 6 x SSC angefeuchtet und gerollt in eine Hybridisierungsflasche eingeführt. Die Membran wurde 30 min bis 1 Stunde bei 42°C im vorgewärmten DIG Easy Hyb-Hybridisierungspuffer (Roche) prähybridisiert und anschließend über Nacht bei gleicher Temperatur mit einer denaturierten Sonde hybridisiert.

Die Membran wurde in der Hybridisierungsflasche weiter gewaschen. Nach Hybridisierungen mit homologen Sonden wurden hochstringente Bedingungen mit höheren Temperaturen während des Waschvorganges gewählt. Für weniger homologe Sonden wurden niedrigere Temperatur und ein höherer Salzgehalt beim Waschen gewählt (Tab. 8).

| nierigstringente Bedingungen          | hochstringente Bedingungen          |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 5 x SSC / 0,1% SDS (2 x 5 min, RT)    | 2 x SSC / 0,1% SDS (2 x 5 min, RT)  |
| 2 x SSC / 0,1% SDS (2 x 15 min, 42°C) | 0,2 x SSC / 0,1% SDS (15 min, 65°C) |
|                                       | 0,1 x SSC / 0,1% SDS (15 min, 65°C) |

**Tab. 8. Waschschritte der Nylonmembran nach dem Hybridisieren.**

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper erfolgte mit 0,1% (w/v) Blockierungsreagenz (Roche) im B1-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen eingestellt)) für 30 min bei RT. Unter den gleichen Bedingungen wurde mit der Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) 1:7500 in B2-Puffer verdünnt, durch 1,2 µm Filter filtriert) inkubiert. Beide Lösungen wurden mehrmals verwendet und nach jedem Gebrauch filtriert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit Waschlösung (0,3% (v/v) Tween 20 in B1-Puffer) gewaschen, in der B3-Lösung (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5)) 5 min äquilibriert und mit CDP-Star (Roche, 1:100 in B3-Puffer verdünnt) benetzt. Dabei wurde die Membran auf eine Seite eines zurecht geschnittenen Polyethylen- (PE) Schlauches aufgelegt und mit der anderen Seite des Schlauches nach dem Auftragen von CDP-Star zugedeckt. Die Luftblasen wurden herausgedrückt. Die Membran wurde 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde kurz mit Whatman-Papier abgetupft und in einen neuen PE-Schlauch eingeschweißt. Ein Röntgenfilm wurde zunächst für 10-20 min aufgelegt. Nach der Entwicklung des Filmes wurde nach Bedarf ein weiterer Film länger oder kürzer exponiert.

### II.5.2.13. KOLONIE-HYBRIDISIERUNG

Diese Methode erlaubt es, nach einer Transformation eine große Anzahl an Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines Inserts zu testen. Die gepickten Klone wurden auf zwei LB-Selektionsplatten-Platten (II.2.) mit aufgelegten karierten Nylonmembranen (Amersham Pharmacia Biotech) in gleicher Anordnung ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden beide Platten bei 4°C

gelagert. Eine von den Platten wurde nach 30 min weiter verarbeitet. Die Membran wurde von der Platte abgenommen und 15 min in einer Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl), 15 min in einer Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,5)) und 10 min in 2 x SSC inkubiert. Für jede Lösung wurde eine Petrischale mit ausgelegtem Whatman-Filter vorbereitet, und nach jedem Lösungswechsel wurde die Membran mit einem frischen Whatman-Blatt abgetupft. Dann wurde die Membran im UV-Crosslinker bestrahlt und auf sauberer Aluminiumfolie ausgelegt. Auf eine  $\varnothing$  82 mm Membran wurden 500  $\mu$ l 2 mg/ml Proteinase K gleichmäßig aufgetragen, die Aluminiumfolie geschlossen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde dann zwischen zwei mit Wasser getränkten Whatmanpapier-Blättern zusammengerollt. Die Zell- und Agarreste wurden vorsichtig und möglichst restlos durch das Abziehen des oberen Whatman-Blattes entfernt. Die DNA auf der Membran wurde daraufhin, wie beim Southern-Blot, prähybridisiert, hybridisiert und detektiert.

#### II.5.2.14. SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung wurde mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit durchgeführt. Die DNA wurde entweder nach der „Maxi-Präp“-Methode oder mit dem Midi-Präp (Macherey-Nagel) Kit isoliert. Für eine Sequenzreaktion wurde folgender Ansatz eingesetzt (Tab. 9).

---

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| Terminator Ready Reaktion Mix  | 2 $\mu$ l       |
| Template (doppelsträngige DNA) | 0,3-0,5 $\mu$ g |
| Primer                         | 10-15 pMol      |
| DMSO                           | 5%              |

---

**Tab. 9. Zusammensetzung einer Sequenzreaktion.**

Der Ansatz wurde auf 20  $\mu$ l Endvolumen aufgefüllt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Der zyklische Heizblock wurde unmittelbar vor dem

Reaktionsstart auf 95°C vorgeheizt. Die Sequenzreaktion wurde unter den Bedingungen, die in der Tabelle 10 angegeben sind, durchgeführt.

---

|           |      |       |
|-----------|------|-------|
| 1 Zyklus  | 96°C | 3 min |
| 35 Zyklen | 98°C | 50 s  |
|           | 55°C | 50 s  |
|           | 60°C | 4 min |

---

**Tab. 10. Programm für eine Sequenzreaktion.**

Der Ansatz wurde nach dem Reaktionsablauf ölfrei abgenommen und mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 250-300 µl 96%igem Ethanol präzipitiert. Nach dem Zentrifugieren (20 min, maximale Umdrehungen) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das DNA-Pellet ohne Waschen getrocknet. Das DNA-Pellet wurde zum Sequenzieren an das Servicelabor im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf (Hamburg) weitergeleitet.

#### **II.5.2.15. DEPHOSPHORELIERUNG VON LINEARISIERTEN VEKTOREN**

Alkaline Phosphatasen sind Phosphomonoesterasen, die die Phosphatreste von den 5'-Enden der DNA bei alkalischen pH-Werten unter 8 entfernen. Um die Religation des Vektors zu vermeiden, wurden unmittelbar vor einer Ligation (II.5.2.16.) die Behandlung des linearisierten Vektors mit CIAP („Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“, MBI Fermentas bzw. Gibco BRL Life Technologies) vorgenommen. Die Reaktion wurde nach den Protokollen der Hersteller durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inaktivierung des Enzyms auf ein präparatives Agarose-Gel (II.5.2.8.) aufgetragen und aufgetrennt. Die gewählten Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, aus der Agarose eluiert (II.5.2.9.) und für die Ligation (II.5.2.16.) eingesetzt.

#### **II.5.2.16. LIGATION**

Um die einzelnen DNA-Moleküle zusammenzufügen, wurde eine T4-Ligase (MBI Fermentas) bzw. Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die von dem Hersteller angegebenen

Reaktionsbedingungen der Ligation wurden eingehalten. Als molares Verhältnis von DNA-Fragment und Vektor wurde für eine Ligation mit überstehenden Enden („sticky ends“) ein Verhältnis von 1:1 und für eine Ligation mit glatten Enden („blund ends“) entsprechend ein Verhältnis von 3:1 gewählt. Die PCR-Fragmente (II.5.2.11.) wurden in den pGEM®-T Vector (Promega) oder den TOPO® XL PCR Cloning Vector (Invitrogen) kloniert.

#### II.5.2.17. ELEKTROPORATION VON *E. COLI*-ZELLEN

Die Elektroporation von *E. coli* ist eine sehr effiziente Transformationsmethode, bei der die bakterielle Zellmembran kurz durch einen elektrischen Impuls destabilisiert wird. Dieser Zustand wird zur Einführung einer Fremd-DNA in die Zelle ausgenutzt. Vor einer Elektroporation müssen sowohl die Ligationsansätze als auch die Zellen selbst entsalzt werden. Um die Ligationsansätze zu entsalzen wurden diese mit 35 µg Glycogen (PeqLab) und 2,5 Volumen 96%igem Ethanol gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Alternativ wurde der Ligationsansatz mit Butanol gefällt (II.5.2.6.). Das DNA-Pellet wurde gut getrocknet und in 10 µl Millipore-Wasser aufgenommen. Die Hälfte oder ein Viertel des Ansatzes wurde in einer Transformation eingesetzt. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden 10 pg ungeschnittener pBluescript SK (+/-) in einem zusätzlichen Ansatz transformiert.

Die zu transformierenden *E. coli*-Zellen (II.1.) wurden in 500 ml LB-Medium in einem 2-Literkolben mit 2,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter starkem Schütteln (250 upm) bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 wachsen gelassen. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Kulturen 10-15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 20 min bei 2.000 x g und 2°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem Millipore-Wasser resuspendiert und weitere 500 ml eiskaltes Wasser wurden zugegeben. Die Zellen wurden erneut bei gleichen Bedingungen pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Nach erneuter Zugabe von 500 ml eiskaltem Wasser wurde der Vorgang wiederholt. Die Zellsuspension wurde

in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und 10 min bei 2.000 x g und 2°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen in 500 µl bis 700 µl eiskaltem Wasser aufgenommen.

Der Ligationsansatz und 100 µl der Zellsuspension wurden in Elektroporations-Küvetten aliquotiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV und 25 µF. Nach der Elektroporation der Zellen wurden diese in 900 µl SOC-Medium (II.2.) 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und auf LB-Agar mit Antibiotika (II.2.) ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgewertet und weiter verarbeitet.

#### **II.5.2.18. GEZIELTE MUTAGENESE VON *C. ALBICANS***

Um Virulenzfaktoren bei *C. albicans* zu erforschen, wurden bei den ersten Versuchen in den 80er Jahren durch chemische und UV-Mutagenese Mutanten hergestellt, die möglicherweise mehrere und keine definierten Mutationen aufwiesen. Für ein sequentielles Ausschalten von zwei Allelen eines Zielgenes in einem Genlocus (KURTZ & MARRINAN, 1989), stehen nur wenige Selektionsmarker zur Verfügung. Die Selektionsmarker können im Gegensatz zur Bäckerhefe *S. cerevisiae* wegen des ausschließlich asexuellen Lebenszyklus von *C. albicans* nicht durch eine Rückkreuzung aus dem Gen eliminiert und zum Ausschalten eines weiteren Gens angewendet werden. Von ALANI *et al.* (1987) wurde eine Methode für *S. cerevisiae* beschrieben, bei der nur ein einzelner Selektionsmarker (*URA3*) für mehrere Disruptionen angewendet wurde. Eine modifizierte Methode, die auf den gleichen Prinzipien beruht, wurde auch für *C. albicans* entwickelt (FONZI & IRWIN, 1993).

Das *URA3*-Gen von *C. albicans* wurde in einem sogenannten *URA*-Blaster mit zwei direkt flankierenden identischen Sequenzen des *hisG*-Gens von *Salmonella typhimurium* kloniert. Durch eine gezielte Mutagenese von *C. albicans* mit einem spezifischen *URA*-Blaster wurde dann der auxotrophe Ura<sup>-</sup>-Stamm CA14 (II.1.) von *C. albicans* hergestellt, der, mit Ausnahme des *URA3*-Gens, keine weiteren Unterschiede zum parentalen Stamm SC5314

(II.1.) zeigte. Durch das Ausschalten des *URA3*-Gens wurde ein Defekt in der Pyrimidin-Biosynthese hervorgerufen und die Mutanten konnten nur bei der Anwesenheit von Uridin im Medium existieren. Wird jedoch der CAI4-Stamm ( $\Delta ura3 / \Delta ura3$ ) mit einem Ura-Blaster, der flankierende Sequenzen eines Zielgens enthält, transformiert, kann durch eine homologe Rekombination ein intaktes Zielgen ausgeschaltet werden (KURTZ *et al.*, 1986). Diese Transformanten überleben in einem Selektionsmedium ohne Uridin. Um anschließend den *URA3*-Marker wieder verwenden zu können, ist man nun auf eine zufällige Rekombination angewiesen. Eine *cis*-Rekombination zwischen zwei *hisG*-Sequenzen schließt das *URA3*-Gen und eine der beiden Kopien der *hisG*-Sequenzen aus. Die daraus resultierenden Ura<sup>-</sup>-Klone wurden auf einem Minimalmedium mit einem FOA-Zusatz selektiert, der für Ura<sup>+</sup>-Zellen toxisch ist (BOEKE *et al.*, 1984). In den heterozygoten Klonen wurde dann erneut mit der Ura-Disruptionskassette transformiert und das zweite Wildtyp-Allel durch die Integration der Kassette ausgeschaltet. Dieser Vorgang ist wiederholbar, so dass der *URA3*-Marker auch für das Ausschalten weiterer Gene regeneriert werden kann.

### II.5.2.19. TRANSFORMATION VON *C. ALBICANS*

#### II.5.2.19.1. PROTOPLASTIERUNG VON *C. ALBICANS*-ZELLEN UND TRANSFORMATION MITTELS PEG-BEHANDLUNG

Fünzig ml YPG-Medium (II.2.) wurden mit 2-3 ml einer Vorkultur angeimpft, so dass die Start-Zelldichte zwischen 0,2 und 0,3 bei OD<sub>600</sub> lag. Die Zellen wurden dann bei 30°C bis OD<sub>600</sub>=0,8-0,9 kultiviert und 5 min bei 1.600 x g bei RT pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml 1 M Sorbitol, 50 mM Dithiothreitol, 25 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert. Für die Protoplastierung wurden die Zellen erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, in 5 ml 0,1 M Natriumcitrat (pH 5,8), 1 M Sorbitol, 25 mM EDTA resuspendiert und mit 50 µl β-Glucuronidase versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 30°C wurden die Protoplasten 5 min bei 600 x g pelletiert und zum Schluss in 0,5 ml 1 M Sorbitol, 10 mM CaCl<sub>2</sub>,

10 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgelöst. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert.

Zu den aliquotierten Protoplasten wurden 10 µg DNA und 3,3 µl 10 mg/ml Yeast-maker-Carrier DNA (Clontech Laboratories) pipettiert, 15 min bei RT inkubiert und 10 Volumina von 20% (w/v) Polyethylenglykol 4000, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Protoplasten 5 min bei 600 x g abzentrifugiert und in SD-Medium mit 1 M Sorbitol (II.2.) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf SD-Agar mit Sorbitol (II.2.) gleichmäßig ausgestrichen und mindestens 5 Tage bei 30°C inkubiert. Die Transformanten wurden vor einer weiteren Verwendung auf SD-Platten ohne Sorbitol (II.2) übertragen.

#### **II.5.2.19.2. TRANSFORMATION VON *C. ALBICANS* NACH LITHIUMACETAT-BEHANDLUNG**

Die Zellkultur wurde wie bei der ersten Methode (II.5.2.19.2.) kultiviert. Das linearisierte Fragment (10 µg) wurde gefällt, in 5 µl Wasser aufgenommen und mit 3,3 µl 10 mg/ml Yeast-maker-Carrier DNA (Clontech Laboratories) versetzt. Die Zellen wurden 5 min bei 5.300 x g abzentrifugiert und in 5 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml TELiOAc-Puffer (0,1 M Lithiumacetat in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5)) aufgenommen und 100 µl Aliquot zur DNA-Lösung gegeben. Nach leichtem Schwenken wurde das Gemisch 30 min bei RT inkubiert und mit 0,7 ml PLATE-Puffer (40% (w/v) PEG 4000 in TELiOAc-Puffer) versetzt. Die gut vermischte Zellsuspension wurde über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag 1 Stunde mit einem Hitzeschock bei 42°C behandelt. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 600 x g pelletiert und, aufgenommen in 100 µl sterilem Wasser, gleichmäßig auf SD-Sorbitol-Agar (II.2.) verteilt. Die Transformanten wurden mindestens 5 Tage bei 30°C inkubiert.

#### **II.5.2.20. FOA-BEHANDLUNG VON *C. ALBICANS*-TRANSFORMANTEN**

Bei der 5-Fluororotat (FOA)-Selektion (III.3.4.) wurden Ura<sup>-</sup>-Klone selektiert, bei der nach der *cis*-Rekombination zwischen zwei *hisG*-Sequenzen ein

*URA3*-Gen und eine Kopie der *hisG*-Sequenzen deletiert wurden. Klone, bei denen die gesamte Disruptionskassette am richtigen Genort integriert war und die für eine weitere Transformation mit der gleichen Kassette vorgesehen waren, wurden auf SD-Agar ausgestrichen und 2 - 3 Tagen bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Zehn µl von der Zellsuspension wurden mit 90 µl sterilem Wasser verdünnt und auf die SD-FOA-Uridin-Selektionsplatten (II.2.) ausgestrichen. Nach 3 - 4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die gewachsene Klone auf YPG-Agar-Platten (II.2.) einzeln ausgestrichen und die DNA in einer Southern-Blot-Analyse (II.5.2.12.) und einer analytischen PCR (II.5.2.11.) untersucht.

### **II.5.3. ARBEITEN MIT PROTEINEN**

#### **II.5.3.1. EXPRESSION VON REKOMBINIERTEN PROTEINEN IN *P. PASTORIS***

*P. pastoris* ist eine methylotrophe Hefe und ist in der Lage Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. In dem ersten Schritt der Metabolisierung wird Methanol zu Formaldehyd mittels zweier Alkoholoxidase (Aox1p und Aox2p) in den Peroxisomen oxidiert. Die Alkoholoxidasen besitzen eine geringe Affinität zum Sauerstoff, die durch eine höhere Produktion von Enzymen kompensiert wird. Der *AOX1*-Promotor wird im Expressionssystem von *P. pastoris* (Invitrogen) benutzt, um heterologe Proteine zu produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System für die Expression der sekretierten Aspartat-Proteasen Sap2p, Sap9p und Sap10p (II.1., III.4.1.) angewandt.

Die 25 ml BMGY-Vorkultur (II.2.) wurde mit einer *P. pastoris*-Kolonie (II.1.) angeimpft und bei 30°C und 200 upm bis  $OD_{600} = 2 - 6$  wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 1.500 - 3.000 x g und RT für 5 min pelletiert und im BMMY-Medium (II.2.) auf  $OD_{600} = 1,0$  resuspendiert. Die Hauptkultur wurde bei 30°C und 200 upm 6 Tage inkubiert. Durch die regelmäßige Zugabe des reinen Methanols zur Hauptkultur alle 24 Stunden wurde die Methanol-Konzentration von 0,5% (v/v) im Medium konstant gehalten und damit eine

optimale Proteinexpression stimuliert. Das in das Medium sekretiertes Protein (III.4.1.) wurde aus dem Überstand der Zellsuspension nach einer Zentrifugation für 10 min bei 3.500 x g und 4°C isoliert. Der Überstand wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **II.5.3.2. AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IM GEL**

Die Proteine wurden in fertigen, kommerziellen 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gelen (Bio-Rad) in Protean™-Elektrophoresekammern (Bio-Rad), gefüllt mit 1 x Tris-Glycin-Elektrophorese Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1% (w/v) SDS), aufgetrennt (III.4.1., III.4.3.). Vor dem Beladen des Gels wurden die proteinhaltigen Lösungen mit dem gleichen Volumen Beladungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerol), 0,1 Volumina 1 M DTT versetzt und für 3 min auf 100°C zum Denaturieren des Proteins erhitzt. Die Ansätze wurden sofort auf Eis gestellt und in 15 µl-Aliquots mittels Hamilton Mikroliter-Spritze auf das Gel beladen. Nach dem Auftrennen der Proteine bei 30 mA wurde das Gel 1 – 4 Stunden in Coomassie blau (0,25% (w/v) Coomassie blau in Methanol / Wasser / Eisessig (5:4:1)) gefärbt und in Methanol / Wasser / Eisessig (5:4:1) über Nacht entfärbt. Zum Aufbewahren wurden die Gele in 20% Glycerol fixiert und in eine Plastiktasche eingeschweißt.

Die Größe der Proteine wurde beim Vergleich mit einem Protein-Größenstandard, Molekular Marker Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad) mit Myosin (216 kD), β-Galactosidase (132 kD), BSA (78 kD), Carbonanhydrase (45,7 kD), Sojabohnen Trypsin-Inhibitor (32,5 kD) und Lysozym (18,4 kD), abgeschätzt (III.4.1., III.4.3.).

### **II.5.3.3. BESTIMMUNG DER PROTEIN-KONZENTRATION**

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 595 nm erfolgte mit Hilfe des Protein Assay Kits (Bio-Rad). Der Test wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und basiert auf der Bradford-Methode.

Die Konzentration eines Proteins wurde visuell auf dem kommerziellen 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gel (Bio-Rad) im Vergleich zu einem Protein ähnlicher Größe in verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmt (III.4.1.).

#### **II.5.3.4. PROTEASEAKTIVITÄTSTEST**

Zur Proteaseaktivität-Bestimmung wurden 100 µl Proben von Kulturüberständen mit 300 µl 1%igem (w/v) Hämoglobin (Sigma) und 300 µl 0,1 M Citrat-Puffer (II.3.1.) verschiedener pH-Werte zusammenpipettiert und 30 min bis 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Degradation des Hämoglobins wurde durch eine Zugabe von 250 µl 20%iger (v/v) Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Gleichzeitig wurde ein Ansatz mit 1%iger Hämoglobinlösung mit entsprechendem Puffer ohne Probe inkubiert, die als Referenz diente. Die Probe wurde unmittelbar vor der TCA-Fällung hinzugegeben. Die TCA-gefällten Ansätze wurden 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Peptidkonzentration im Überstand bei 280 nm photometrisch gemessen (III.4.2.). Als allgemeiner Vergleichswert galt ein Extinktionsanstieg von 0,1 pro Stunde bei einer Reaktion von 5 µl Probe mit 10 µg/ml aktiver Protease (RÜCHEL, 1981).

#### **II.5.3.5. BESTIMMUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄT**

Als Substrat für die Bestimmung der Substratspezifität der Aspartat-Proteasen (III.4.3.) wurde BSA gewählt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 50 µg BSA, 0,1 M Citrat-Puffer (II.3.1.) und 1 µg Protease in einem Gesamtvolumen von 35 µl und wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 35 µl Beladungspuffer (II.5.3.2.) und DTT hinzugefügt. Nachdem der Ansatz 5 min bei 100°C denaturiert worden war, wurden die Proteine in 7-12% Tris-HCl-Gradienten SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie blau sichtbar gemacht (II.5.3.2.).