

|

Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion intrazellulärer Phospholipasen bei *Candida albicans*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalis
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

**vorgelegt von
Donika Kunze
aus Greifswald**

Juli 2008

1.Gutachter: Prof. Dr. B. Hube

2.Gutachter: Prof. Dr. R. Mutzel

Disputation am: 24. 11. 2008

Danksagung

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde im Robert Koch- Institut (Berlin) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. B. Hube durchgeführt, wofür ich mich zu Dank verpflichtet fühle. Dieser Dank schließt auch die Bereitschaft von Herrn Prof. Dr. R. Mutzel und Herrn Prof. Dr. B. Hube zur Begutachtung der Arbeit, sowie die Finanzierung der Arbeit durch das Robert Koch- Institut und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ein.

Desweiteren möchte ich mich bei meinem Kollegen Oliver Bader für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit, bei meinem Kollegen Sascha Thewes für die Hilfe bei den Microarray-Experimenten, sowie bei Frau Dr. Antje Flieger und ihrer Nachwuchsgruppe 5 für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bedanken. Für die Bereitschaft zur Hilfe danke ich auch Herrn Altmann und dem Sequenzierteam des RKI. Ein Dankeschön auch an jeden, der mir im Laufe der Arbeit eine Frage beantwortet hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meiner Schwester Damaris ohne deren Verständnis, Sorge um mich und Glaube an mich ich diese Arbeit nicht hätte zu Ende bringen können.

Ich danke auch meinen Freundinnen Nicole, Gesine, Christine und Verwandten, die mir durch ihr Nachfragen und ihr Interesse Beistand leisteten und mir immer wieder über geistige Durststrecken halfen.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Sohn Olrik danken, der zwar die Anfertigung dieser Arbeit verzögerte, aber meinem Leben dafür eine ganz besondere Bereicherung gibt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	KLASSIFIZIERUNG DER PHOSPHOLIPASEN	1
1.2	FUNKTION DER PHOSPHOLIPASEN	2
1.2.1	PHOSPHOLIPASEN ALS PATHOGENITÄTSFAKTOREN	3
1.3	PHOSPHATIDYLINOSITID-SPEZIFISCHE PHOSPHOLIPASEN DER KLASSE C (PI-PLC)	5
1.3.1	<i>PLC1</i> VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	6
1.4	<i>CANDIDA ALBICANS</i>, EIN HUMANPATHOGENER PILZ	7
1.4.1	<i>CANDIDA ALBICANS</i> UND <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	10
1.4.2	DIE PHOSPHOLIPASEN VON <i>CANDIDA ALBICANS</i> UND HOMOLOGE GENE IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	11
1.5	ZIEL DER ARBEIT	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	MATERIAL	16
2.1.1	GERÄTE UND SOFTWARE	16
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIAL	16
2.1.3	VERWENDETE STÄMME	16
2.1.3.1	VERWENDETE STÄMME VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	16
2.1.3.2	VERWENDETE STÄMME VON <i>E. COLI</i>	17
2.1.3.3	WÄHREND DIESER ARBEIT GENERIERTE <i>CANDIDA ALBICANS</i> MUTANTEN	17
2.1.4	PLASMIDE	19
2.1.4.1	BEZOGENE PLASMIDE	19
2.1.4.2	IN DIESER ARBEIT ERSTELLTE PLASMIDE	19
2.1.5	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	20
2.2	METHODEN	23
2.2.1	<u>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</u>	23
2.2.1.1	DNA-AUFTRENNUNG DURCH GELELEKTROPHORESE	23
2.2.1.2	DNA -EXTRAKTION AUS DEM AGAROSEGEL	24
2.2.1.3.	DNA-SPALTUNG DURCH RESTRIKTION	24
2.2.1.4	DEPHOSPHORYLIERUNG	24
2.2.1.5	MUNGBOHNEN-NUKLEASEBEHANDLUNG VON RESTRIKTIONSFRAGMENTEN	25

2.2.1.6	PHENOL- CHLOROFORM- EXTRAKTION	25
2.2.1.7	ALKOHOLFÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN	25
2.2.1.8	LIGATION	26
2.2.1.9	ENTSALZEN EINES LIGATIONSANSATZES FÜR ELEKTROPORATION	26
2.2.1.10	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	26
2.2.1.11	DIREKTE AUFREINIGUNG EINES PCR-PRODUKTES	28
2.2.1.12	KLONIERUNG EINES PCR-PRODUKTES	28
2.2.1.13	EXPRESSIONSANALYSE MITTELS SEMIQUANTITATIVER PCR	28
2.2.1.14	SOUTHERN-BLOT	29
2.2.1.15	SEQUENZIERUNGSREAKTION	30
2.2.1.16	VORBEREITUNG DER GLASPERLEN FÜR DIE RNA-EXTRAKTION	30
2.2.1.17	RNA-ISOLIERUNG AUS <i>CANDIDA ALBICANS</i> -ZELLEN	31
2.2.1.18	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNA UND DNA	31
2.2.1.19	RNA-GELELEKTROPHORESE	32
2.2.1.20	NORTHERN-BLOT	33
2.2.1.21	CDNA-SYNTHESE	33
2.2.1.22	MICROARRAY	35
2.2.2	<u>MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN (<i>E. COLI</i>)</u>	37
2.2.2.1	MEDIEN FÜR DIE ANZUCHT VON <i>E. COLI</i>	37
2.2.2.2	DIE SELEKTION DER BAKTERIEN MITTELS ANTIBIOTIKA	37
2.2.2.3	HERSTELLEN KOMPETENTER ZELLEN VON <i>E. COLI</i> FÜR DIE HITZESCHOCKTRANSFORMATION	38
2.2.2.4	HITZESCHOCKTRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	39
2.2.2.5	HERSTELLEN KOMPETENTER ZELLEN FÜR DIE ELEKTROPORATION	39
2.2.2.6	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> DURCH ELEKTROPORATION	39
2.2.2.7	MINIPRÄPARATION VON PLASMID- DNA AUS <i>E. COLI</i>	40
2.2.2.8	MAXIPRÄPARATION VON PLASMID- DNA AUS <i>E. COLI</i>	41
2.2.2.9	KOLONIEHYBRIDISIERUNG	41
2.2.2.10	GLYCEROLSTOCKS	42
2.2.3	<u>MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN (<i>CANDIDA ALBICANS</i>)</u>	42
2.2.3.1	ANZUCHT UND BESTIMMUNG DER ZELLZAHL VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	42
2.2.3.2	MEDIEN FÜR DIE ANZUCHT UND DIE PHÄNOTYPISIERUNG VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	43

2.2.3.3	AUSZÄHLEN VON HYPHEN- UND HEFEZELLEN UNTER DEM MIKROSKOP	45
2.2.3.4	GEZIELTE MUTAGENESE VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	46
2.2.3.5	TRANSFORMATION VON <i>CANDIDA ALBICANS</i>	46
2.2.3.6	FOA-BEHANDLUNG VON <i>CANDIDA ALBICANS</i> TRANSFORMANDEN	48
2.2.3.7	MINIPRÄPARATION GENOMISCHER DNA AUS <i>CANDIDA ALBICANS</i>	49
2.2.3.8	PHÄNOTYPSCREEN BEI <i>CANDIDA ALBICANS</i>	50
2.2.3.9	ZUSATZSTOFFE IM MEDIUM BEIM PHÄNOTYPSCREEN	50
2.2.3.10	PLATTEN MIT VERSCHIEDENEN PH-WERTEN FÜR DEN PHÄNOTYPSCREEN	52
2.2.4	<u>BIOCHEMISCHE METHODEN</u>	53
2.2.4.1	ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER FREIEN FETTSÄUREN	53
2.2.4.1.1	HERSTELLEN DER PROBEN FÜR DEN ASSAY	53
2.2.4.1.2	BESTIMMUNG DER FREIEN FETTSÄUREN	54
2.2.4.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	55
2.2.5	<u>MIKROSKOPISCHE FÄRBEMETHODEN</u>	56
2.2.5.1	QUINACRINE-FÄRBUNG	56
2.2.5.2	FÄRBUNG LEBENDER ZELLEN (VIABILITY STAIN)	56
2.2.5.3	CALCOFLUOR-FÄRBUNG	57
3	<u>ERGEBNISSE</u>	59
3.1	DIE PHOSPHOLIPASEN DER KLASSE C	59
3.1.1	EINE PUTATIVE KERNLOKALISIERUNGSSEQUENZ IM <i>CAPLC1</i> GEN	59
3.1.2	VERSUCHE ZUR DISRUPTION DES <i>CAPLC1</i> GENS	60
3.1.3	DIE KONDITIONELLE <i>CAPLC1</i> -MUTANTE MIT DEM <i>MET3</i> -PROMOTOR	62
3.1.4	DIE KONDITIONELLE <i>CAPLC1</i> -MUTANTE IM Δ <i>CAPLD1</i> / Δ <i>CAPLD1</i>	
	HINTERGRUND	63
3.1.5	ÜBERPRÜFUNG DER REGULATION DES <i>MET3</i> -PROMOTORS	63
3.1.6	PHÄNOTYP DER KONDITIONELLEN <i>CAPLC1</i> -MUTANTE (Δ <i>CAPLC1</i> / <i>PMET3-CAPLC1</i>)	64
3.1.7	PHÄNOTYP DER Δ <i>CAPLD1</i> / Δ <i>CAPLD1</i> Δ <i>CAPLC1</i> / <i>PMET3-CAPLC1</i> DOPPELMUTANTE	67
3.1.8	PHÄNOTYPISCHE ANALYSE DER HETEROZYGOTEN <i>CAPLC1</i> -MUTANTE (Δ <i>CAPLC1</i> / <i>CAPLC1</i>)	68
3.1.9	EXPRESSION VON <i>CAPLC1</i> UNTER AUSGEWÄHLTEN <i>IN VITRO</i> BEDINGUNGEN	70

3.1.10	GENOMWEITE EXPRESSIONSANALYSE DER <i>ΔCAPLC1/PMET3-CAPLC1</i> MUTANTE IM MICROARRAY-EXPERIMENT	71
3.1.11	WEITERE PHOSPHOLIPASE C GENE IN <i>CANDIDA ALBICANS</i> - <i>CAPLC2</i> UND <i>CAPLC3</i>	74
3.1.12	NACHWEIS DES <i>CAPLC2/3</i> GENS IN ANDEREN <i>CANDIDA</i> – ARTEN	76
3.1.13	DIE <i>IN VITRO</i> EXPRESSION VON <i>CAPLC2</i> UND <i>CAPLC3</i> IST ÄHNLICH	77
3.1.14	DIE DISRUPTION VON <i>CAPLC2</i> UND <i>CAPLC3</i> IN EINER DOPPELMUTANTE	78
3.1.15	PHÄNOTYPISCHE ANALYSE DER <i>CAPLC2/3</i> – DOPPELMUTANTE	80
3.1.16	AUFHEBUNG DER PHÄNOTYPEN DURCH EIN EXTRACHROMOSOMAL EXPRIMIERTES <i>CAPLC2</i> GEN	82
3.2	DAS <i>CADOA1</i>-GEN	83
3.2.1	ANALYSE DER SEQUENZDATEN VON <i>CADOA1</i> (IPF4477; ORF 6.7382; ORF 19.4829)	83
3.2.2	UNTERSUCHUNG DER <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION VON <i>CADOA1</i>	88
3.2.3	DISRUPTION DES <i>CADOA1</i> GENS	90
3.2.4	WACHSTUMSVERGLEICH VON WILDTyp UND <i>CADOA1</i> -MUTANTE IN FLÜSSIGKULTUR	91
3.2.5	WEITERE PHÄNOTYPISCHE ANALYSEN DER <i>CADOA1</i> -MUTANTE	96
3.2.6	AUFHEBUNG DER PHÄNOTYPEN DURCH EXTRACHROMOSOMAL EXPRIMIERTES <i>CADOA1</i>	102
3.2.7	ÜBEREXPRESSION DES <i>CADOA1</i> GENS	105
3.2.8	UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN INDUKTION DER TRANSKRIPTION VON <i>CADOA1 IN VITRO</i>	105
3.2.9	MICROARRAY-ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSPROFILE VON <i>CADOA1</i> -MUTANTE UND WILDTyp	107
3.2.10	UNTERSUCHUNG DER ROLLE DER MELLITINÄHNLICHEN SEQUENZ FÜR DIE <i>CADOA1</i> -FUNKTIONALITÄT	110
3.2.11	BESTIMMUNG DER PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄTEN IN DER <i>CADOA1</i> - MUTANTE UND IM WILDTyp	113
3.2.12	VERSUCH DER LOKALISATION VON <i>CADOA1</i> MITTELS GFP-FUSION	117
3.2.13	TEST DER <i>CADOA1</i> -MUTANTE IM MAUSINFEKTIONSMODELL	117

4	DISKUSSION	118
4.1	ABLEITUNGEN AUS DEN SEQUENZEN DER PHOSPHOLIPASEN DER KLASSE C	118
4.2	DIE <i>CAPLC</i> -MUTANTEN UNTERSCHIEDEN SICH IN DEN PHÄNOTYPEN	120
4.3	EXPRESSION DER <i>CAPLC</i> -GENE MIT INDUZIERBAREN PROMOTOREN	123
4.4	DIE TRANSKRIPTION VON <i>CAPLC1</i> , <i>CAPLC2</i> UND <i>CAPLC3</i>	125
4.5	MICROARRAY-ANALYSE DER Δ <i>CAPLC1/PMET3-CAPLC1</i> MUTANTE	127
4.6	ZWEI PUTATIVE FUNKTIONEN VON <i>CADOA1</i> AUFGRUND VON SEQUENZVERGLEICHEN	130
4.7	DIE <i>CADOA1</i> -MUTANTE ZEIGT EINEN PLEIOTROPEN PHÄNOTYP	132
4.8	RETRANSFORMATION UND ÜBEREXPRESSION MIT HILFE DES <i>PCK1</i> -PROMOTORS	135
4.9	INDUKTION DER TRANSKRIPTION VON <i>CADOA1</i>	136
4.10	MICROARRAY-ANALYSE DER <i>CADOA1</i> -MUTANTE	137
4.11	DIE MELLITINÄHNLICHE SEQUENZ IST FÜR DIE FUNKTIONALITÄT VON <i>CADOA1</i> NOTWENDIG	140
4.12	PHOSPHOLIPASEAKTIVITÄTEN	141
5	AUSBLICK	144
6	ZUSAMMENFASSUNG	147
6.1	SUMMARY	149
7	LITERATURVERZEICHNIS	151
8	PUBLIKATIONEN	166
9	ANHANG	168
9.1	ABKÜRZUNGEN	168
9.2	AUSFÜHRLICHE TABELLE ZUR MICROARRAY-ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSPROFILE VON <i>CADOA1</i> -MUTANTE UND WILD-TYP	170
9.3	PLASMIDKARTEN	173

1 EINLEITUNG

1.1 Klassifizierung der Phospholipasen

Phospholipasen sind Hydrolasen und spalten die Esterbindungen in Phospholipiden. Letztere bestehen meist aus einem Glycerolgrundgerüst (seltener aus einem Sphingosingrundgerüst), bei dem das erste und zweite Kohlenstoffatom (C-Atom) jeweils mit einer Fettsäure verestert ist. Das dritte C-Atom ist über eine Phosphatgruppe mit einem Alkohol verbunden. Die Alkoholkomponente in Phosphoglyceriden ist gewöhnlich Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inositol. In Abhängigkeit von der Position, an der die Phospholipasen wirken, werden sie in die Klassen A, B, C und D eingeteilt. So spalten Phospholipasen der Klasse A (PLA) die Fettsäuren von dem ersten oder zweiten C-Atom. Ein Zifferzusatz in der Bezeichnung gibt das C-Atom an (PLA₁, PLA₂). Lysophospholipasen entfernen die verbliebene Fettsäure nach einer PLA-Hydrolyse. Phospholipasen der Klasse B (PLB) spalten beide Fettsäuren der C-Atome 1 und 2 ab und haben oft eine Transacylaseaktivität, so dass die eigentliche Hydrolyse am gleichen C-Atom erfolgt. Das Ergebnis ist ein Reaktionsprodukt wie nach der Hydrolyse mit PLA₁ und PLA₂ nacheinander. Für PLBs werden auch die Bezeichnungen Lysophospholipase (LP) und Lysophospholipase-Transacylase (LPTA) verwendet. Die Klassen C und D (PLC bzw. PLD) spalten beide den Alkohol am 3. C-Atom ab, unterscheiden sich jedoch darin, an welchem Reaktionsprodukt die Phosphatgruppe verbleibt (Abb. 1.1-1). Die PLC spaltet den phosphorylierten Alkohol ab (Stryer 1994; Karlson *et al.* 1994). PLDs katalysieren neben der Hydrolyse auch eine Umesterung. Dabei wird der Phosphatidylrest nicht auf Wasser, sondern auf einen primären oder sekundären Alkohol übertragen.

Innerhalb der Klassen der Phospholipasen gibt es die Möglichkeit der Einteilung nach ihrer Substratspezifität. So gibt es beispielsweise Phosphoinositid-spezifische PLCs (PI-PLC) und Phosphatidylcholin-spezifische PLCs (PC-PLC). Dabei ist die Spezifität z. T. nur eine Bevorzugung des Substrates und *in vitro* können in Abhängigkeit vom Phospholipidangebot auch weitere Phospholipide hydrolysiert werden. Anhand der Strukturmerkmale werden innerhalb der Phospholipaseklassen Subklassen unterschieden und meist mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet. Oft beeinflusst die Verfügbarkeit von Ca⁺⁺- Ionen die Aktivität von Phospholipasen, z.

B. bei der PLD (Exton, 1998) und bei der PLC (Toker, 2002). Ein weiteres Charakteristikum der Enzyme ist der Wirkort, denn sie können intrazellulär wirken oder sekretiert werden.

Phospholipasen kommen unter anderem in Darmsäften, Bakteriensekreten und Giften (von Bienen und Schlangen) vor. Einige werden in der Biotechnologie als Biokatalysatoren zur Gewinnung von Phospholipiden genutzt und in der Grundlagenforschung zur Bestimmung von Membranlipidkomponenten eingesetzt. PLA₂ spielt eine wichtige Rolle als Hauptallergen im Bienengift mit 10-12% der Trockenmasse des Gifts (s. Allergendatenbank von Merck unter www.allergopharma.de).

Die Phospholipasen können sich auch gegenseitig beeinflussen. Phosphatidat (PA), das PLD- Produkt, aktiviert die PLC und Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das PLC Substrat, aktiviert die Säuger-PLD.

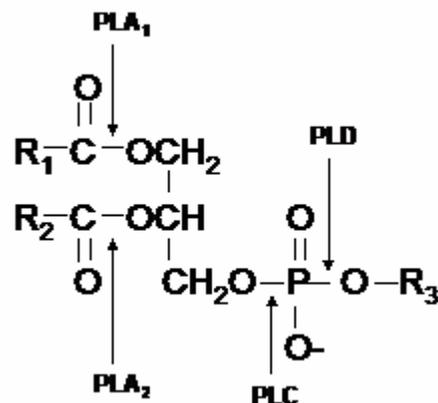


Abbildung 1.1-1: Hydrolysepositionen der Phospholipasen PLA₁, PLA₂, PLC und PLD. R₁, R₂ steht für typische gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren (aliphatische Gruppen), R₃ für die polare Kopfgruppe mit Alkoholen wie Cholin, Glycerol, Inositol, Ethanolamin oder andere.

1.2 Funktion der Phospholipasen

Aufgrund ihrer Aktivität können Phospholipasen drei generelle Funktionen ausüben. Dazu zählt der Lipidabbau durch Hydrolyse, die Lipidmembranumgestaltung und die zelluläre Regulation durch Beteiligung der Reaktionsprodukte an verschiedenen Signalkaskaden. Pathogene Mikroorganismen können diese Funktionen zusätzlich bei Interaktionen mit dem Wirt nutzen. So erhöhen Lysophospholipide die Membranfluidität, was zur leichteren Lyse oder Penetration der Wirtszelle führen

kann. Arachidonsäure, ein Reaktionsprodukt der PLA- / PLB-Aktivität, ist eine Vorstufe der Eicosanoide. Aus ihr werden Prostaglandine und Leukotriene biosynthetisiert. Erstgenannte hemmen unter anderem die Chemokinproduktion, Phagozytose, Lymphozytenproliferation und die Th1-Typ Immunantwort. Diacylglycerol (DAG), das durch PLC- Aktivität entsteht, bindet direkt einige Proteinkinasen C (PKC) und aktiviert sie dadurch. PKCs sind Bestandteil der MAPK-Kaskade (mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade), die u. a. die Zellproliferation reguliert. Lisovitch *et al.* (1994) wiesen Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat [PI(4,5)P₂], ein PLC Substrat, als Cofaktor der PLD Aktivität nach. Nicht nur im Zytosol, sondern auch im Zellkern spielen Phospholipasen C, Inositol und Lipide eine wichtige regulatorische Rolle. Cocco *et al.* (2000) beschreiben einen autonomen Inositol-Lipid-Kreislauf im Kerninnern.

1.2.1 Beispiele bekannter Phospholipasen als Pathogenitätsfaktoren

Für alle Klassen der Phospholipasen mit verschiedenen Substratspezifitäten gibt es Beispiele für unterschiedliche pathogene Wirkungen. Sie sind hauptsächlich im Bereich der pathogenen Bakterien zu finden (Schmiehl *et al.* 1999). Doch sind auch einige Beispiele von eukaryotischen Krankheitserregern bekannt, bei denen Phospholipasen eine wichtige Rolle spielen. Gemeinsam ist allen die extrazelluläre Aktivität im Falle von direkter pathogener Wirkung. Intrazelluläre Phospholipasen können nur indirekt, über die sie betreffenden Signalkaskaden, auf die Pathogenität Einfluss nehmen.

Phospholipasen der Klasse A sind es, die *Rickettsia* sp. vor Phagosomen schützen und Zellmembranen lysieren. Auch bei *Salmonella newport* spielen sie eine wichtige Rolle.

Das alpha Toxin von *Clostridium perfringens* ist eine Phospholipase C (Titball 1993) und induziert die Expression von Interleukin-8 (IL-8) in Endothelzellen (Bunting *et al.* 1997). *Listeria monocytogenes* besitzt gleich zwei für die Pathogenität wichtige PLC-Proteine: eine Phosphoinositid-spezifisch Phospholipase (PI-PLC) und eine Phosphatidylcholin-spezifische (PC-PLC) mit einem breiteren Substratspektrum. Letztere wird als proPC-PLC synthetisiert, pH-abhängig aktiviert und für die Verbreitung von Wirtszelle zu Wirtszelle genutzt (Camilli *et al.* 1991; Geoffroy *et al.* 1991; Marquis *et al.* 2000). Mit gleich 4 PLC-Proteinen besitzt *Mycobacterium tuberculosis* sogar noch mehr für die Virulenz relevante Phospholipasen einer Klasse

(Raynaud *et al.* 2002). *Bacillus cereus* besitzt eine PI-PLC, die den eukaryotischen PLCs ähnlich ist und eine PC-PLC, die mit dem alpha Toxin von *Clostridium perfringens* strukturell verwandt ist. *Pseudomonas aeruginosa* produziert eine hämolytische PC-PLC (=PlcH) und eine nicht hämolytische PC-PLC (=PlcN). Obwohl beide unter einander sehr ähnlich sind, ist nur PlcH bestimmend für die Virulenz in verschiedenen Organismen. PlcH kommt mit dem Chaperon (PlcR₂) als heterodimerer Komplex PlcHR₂ vor. Dieser Komplex bindet Calcium, das keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität hat, jedoch die hämolytische Aktivität von PlcHR₂ hemmt. Anders als die Zink-Metallophospholipasen C aus *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* (alpha-Toxin) und *Listeria monocytogenes* sind PlcHR₂ und PlcN nicht mit dem PC-PLC spezifischen, kompetitiven Hemmer D609 inhibierbar (Meyers *et al.* 1990; Stonehouse *et al.* 2002). Drei der Phospholipasen von *Mycobacterium tuberculosis* (PlcA, PlcB, PlcC) werden ebenfalls nicht durch D609 gehemmt.

Die gereinigte PLD des *Corynebacterium pseudotuberculosis* wirkt dermonekrotisch und nach Injektion in Tiere sogar lethal. Neutrophile können in ihrer Chemotaxis durch die PLD gestört werden, was eigentlich für das in Neutrophilen und Makrophagen lebende Bakterium eher hinderlich wäre. Aber die PLD-Aktivität kann auch die vasculäre Permeabilität erhöhen und somit zur Ausbreitung der Infektion von Vorteil sein. (Schmiel *et al.* 1999)

Auch bei eukaryotischen Krankheitserregern spielen Phospholipasen eine Rolle. So penetrieren *Toxoplasma gondii* und *Entamoeba histolytica* mit Hilfe ihrer Phospholipasen A die Wirtszellen (Ghannoum 2000). Letztere stimuliert zusätzlich die Epithelzellen zur Zytokinproduktion (IL-6, IL-8) (Eckmann *et al.* 1995). *Cryptococcus neoformans*, ein humanpathogener Pilz, besitzt eine PC-PLB und *Aspergillus fumigatus* eine PLB, eine PLC und eine PLD. Drei Phospholipasen besitzt auch *Aspergillus flavus*, allerdings handelt es sich dabei um Enzyme der Klassen PLA, PLB und PLC. Phospholipasen höherer Organismen können ebenfalls eine schädigende Wirkung auf den Menschen haben, wie zum Beispiel die in Schlangen- und Bienengift enthaltene PLA.

1.3 Phosphatidylinositid-spezifische Phospholipasen der Klasse C (PI-PLC)

Aus dem Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P₂ bzw. PIP₂] entstehen durch PLC-vermittelte Hydrolyse Inositol 1,4,5-triphosphat [I(1,4,5)P₃ bzw. IP₃] und Diacylglycerol (DAG). Beide Reaktionsprodukte sind bekannte Signalmoleküle („second messenger“) in der Antwort auf extrazelluläre Signale. IP₃ ist außerdem eine Vorstufe für Inositolpolyphosphate, die wiederum auch regulatorische Funktionen haben. PI(4,5)P₂ ist nicht nur Substrat für PLCs, sondern auch für Kinasen und Phosphatasen. Durch die direkte Bindung an Proteine kann es auf deren Aktivität Einfluss nehmen, allerdings sind *in vitro* mehr Bindepartner bekannt als *in vivo* bewiesen wurden, weil PH-Domänen („pleckstrin homology“-Domäne) verschiedene Phosphoinositole binden können. Beim Zytoskelettaufbau und der Aktinmodellierung spielt PI(4,5)P₂ nachweislich eine wichtige Rolle, bindet aber über noch unbekannt Domänen an die entsprechenden Proteine (z. B. α Actinin, Gelsolin, Profilin) und nicht über PH-Domänen. Die PH-Domäne ist dennoch die wichtigste Phosphoinositolbindedomäne.

Aufgrund von Strukturmerkmalen werden die PI-PLCs der Säuger in vier Subklassen eingeteilt: β , γ , δ und ϵ . Allen gemeinsam ist das Vorhandensein einer X- und einer Y- Domäne. Andere strukturelle Elemente bestimmen die Lokalisation und Funktionsspezifitäten der einzelnen Subklassen. Auch ihre Aktivierung ist unterschiedlich, beispielsweise wird die β -Form durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert und die γ -Form durch die Aktivierung des Tyrosin-Kinase-Weges. In niederen Eukaryoten sind bislang nur PLCs der δ Isoform bekannt, weshalb diese Form auch als ursprüngliche PLC vermutet wird (Rhee 2001; Ochocka *et al.* 2003). Zwischen bakteriellen und Säuger-PLCs bestehen nur geringe Gemeinsamkeiten innerhalb des N-Terminus, d. h. in der X-Domäne. Auch in den von ihnen bevorzugten Substraten unterscheiden sie sich, denn die Säuger-PLCs zeigen höchste Aktivität bei Phosphoinositiden, die an Position 4 und 5 phosphoryliert sind. Diese Phosphoinositide sind keine Substrate bakterieller PLCs, die im Gegensatz zu den Säugerenzymen GPI-Anker abspalten können (Griffith *et al.* 1999).

1.3.1 PLC1 von *Saccharomyces cerevisiae*

1993 wurden in gleich drei unabhängigen Arbeiten die Phospholipase C von *S. cerevisiae* (Plc1), das entsprechende Gen und PLC-negative Mutanten beschrieben (Yoko-o *et al.*; Flick *et al.*; Payne *et al.*). Diese Phospholipase besitzt die konservierten X und Y Domänen und wurde wegen der strukturellen Ähnlichkeit dem PLCd –Typ zugeordnet. Yoko-o *et al.* erwähnten bei Expressionstudien lange Expositionszeiten bei Northern-Analysen und folgerten, dass die Transkriptmenge gering ist. Payne *et al.* wiesen auf eine potentielle Kernlokalisierungssequenz hin und York *et al.* beschrieben später (1999 und 2001) eine nukleare Funktion der ScPlc1 als Bestandteil des ArgR-Mcm1 Transkriptionskomplexes und als Bestandteil des mit Inositolpolyphosphat regulierten mRNA Transports aus dem Kern. In einigen genetischen Hintergründen ist das Gen essentiell (Yoko-o *et al.* 1993). Die Mutante zeigt eine Temperatur- und Osmosensitivität, eine erhöhte Missegregation der Chromosomen und Defekte bei der Verwertung von anderen Kohlenstoffquellen als Glukose (z. B. Galaktose, Raffinose, Glycerol). Durch Zugabe von Calciumionen konnte die Temperatursensitivität und erhöhte Chromosomenmissegregation teilweise aufgehoben werden. Das Phospholipidmuster ändert sich in der ScPLC1-Mutante nicht (Cocchetti *et al.* 1998). Durch einen „yeast-two-hybrid“ Screen wurden mehrere Interaktionspartner der ScPlc1 gefunden. ScPlc1 bindet an zwei Proteine des Kinetochorbildungskomplexes, ScNdc10 und ScCep3 (Lin *et al.* 2000), wodurch der nocodazolsensitive Phänotyp und der beobachtete Mikrochromosomenverlust der Mutante erklärbar ist. Desweiteren interagiert ScPlc1 mit dem C-Terminus der Phosphatidylinositol Kinase ScTor2, die eine Funktion in der zellzyklusabhängigen Aktinskelettbildung hat (Lin *et al.* 1998). Flick und Thorner (1998) zeigten eine Interaktion der ScPlc1 mit dem phosphatregulierten Signalweg. Weiterhin wird ScPlc1 für den durch oxidativen Stress induzierten Ume3 Abbau benötigt (Cooper *et al.* 1999).

Für die Aktivierung der Pseudohyphenbildung bei Stickstoffmangel sind in *Saccharomyces cerevisiae* zwei Signalwege vorhanden bzw. bekannt, der cAMP- und der MAPK-Weg. Beide sind vernetzt, so aktiviert das kleine G-Protein Ras2 beide (Borges-Walmsley und Walmsley 2000). Die ScPlc1 agiert als GTPase aktivierendes Protein bei der Bindung des ScGpr1 Rezeptors an dessen G-Protein ScGpa2 im nährstoffinduzierten Signalweg (Ansari *et al.* 1999). An der Aktivierung

der ATPase über den Glukosesensor ScSnf3 ist der Gpa2-Plc1-Komplex ebenfalls beteiligt (Souza *et al.* 2001). Bisher deutet kein Phänotyp der *ScPLC1*-Mutante auf eine Verbindung von ScPlc1 und Proteinkinase C (ScPkc1), denn ScPkc1 scheint an der MAPK-Kaskade mitzuwirken, welche unter anderem für die Anpassung an hypoosmotischen Stress und für die Zellwandintegrität nötig ist. Die *ScPLC1*-Mutante ist aber u. a. sensitiv gegenüber hoher Osmolarität. Es gibt wenige Hinweise für die in Säugern sonst übliche Aktivierung der Pkc1 durch das Plc1-Reaktionsprodukt DAG.

Im Hefegenom ist kein Homolog zum Säuger IP₃-Rezeptor vorhanden und auch eine IP₃ konzentrationsabhängige Kontrolle der Ca⁺⁺-Konzentration ist nicht endgültig geklärt. Dagegen ist bereits gezeigt worden, dass IP₃ in *S. cerevisiae* als Ausgangspunkt für höher phosphorylierte Phosphoinositole, die wichtige Regulationsfunktionen haben, dient. So zeigten York *et al.* (1999), dass in der *ScPLC1*-Mutante keine detektierbaren Mengen IP₆ vorhanden waren, dagegen in einer *ScPLC1* überexprimierenden Mutante eine Akkumulation multipler Inositolpolyphosphate stattfand. Es existiert ein IP₆ – Signalweg, der den mRNA Export aus dem Zellkern reguliert. IP₄ ist nötig für die Funktion der ArgR-Mcm1 Transkriptionsmaschinerie (Odom *et al.* 2000; reviewed durch Wera *et al.* 2001).

1.4 *Candida albicans*, ein humanpathogener Pilz

Der Hemiascomycet *Candida albicans* ist der häufigste Verursacher von Pilzinfektionen beim Menschen. Infektionen durch *C. albicans* sind in den letzten Jahren aufgrund der zunehmenden Zahl immunsupprimierter Patienten, z. B. nach einer Transplantation, Zytostatikabehandlung oder bei HIV-Infektion, vermehrt in den Blickpunkt der Forschung getreten (Kullberg *et al.* 2002). Als Opportunist besiedelt der Pilz vor allem die Schleimhäute der Mundhöhle und des Gastrointestinaltraktes gesunder Personen, ohne Krankheitsanzeichen hervorzurufen. Bei Frauen treten auch ohne Vorliegen einer Immunsuppression sehr häufig akute oder chronisch rezidivierende Vulvovaginalcandidosen auf (Mendling 2004). Auch bei Patienten mit bestätigter Dermatomykose dominiert *Candida albicans* unter den nachgewiesenen Hefen (Hipler *et al.* 2004; Rüchel *et al.* 2002). Das Hauptaugenmerk der Forschung über *C. albicans* richtete sich auf die Suche bzw. Charakterisierung von Virulenzfaktoren als potentielle Angriffsziele für antimykotische Therapeutika, aber

auch auf die Untersuchung von Resistenzmechanismen gegen verwendete Antimykotika.

Nach F. C. Odds (1994) erfolgt die Infektion durch *C. albicans* in 4 Stufen. Zu Beginn adhärert und besiedelt der Pilz Epithelzellen, dann penetrieren Hyphenzellen in bzw. durch das Epithel und befallen das Vaskularsystem, durch das der Pilz verbreitet werden kann. Schließlich penetriert er aus dem System wieder ins Gewebe (Kumamoto und Vines 2005-a). Virulenzfaktoren spielen in allen Stufen der Infektion eine Rolle, dazu gehören unter anderem Adhäsine, sekretierte Proteasen und cytoplasmatische Proteine. Die Definition eines Virulenzfaktors ist in der wissenschaftlichen Literatur unterschiedlich. Bei Haynes (2001) sind 3 verschiedene Virulenzfaktordefinitionen aufgelistet. Die erste Möglichkeit dabei ist die Einstufung aller Gene als Virulenzfaktoren, deren homozygote Nullmutanten verminderte Virulenz im Tierinfektionsmodell zeigen. Eine solche Einteilung wurde auch von Navarro-Garcia *et al.* (2001) vorgenommen, wobei die Virulenzfaktoren zusätzlich in folgende Gruppen eingeteilt wurden: metabolische Proteine, Zellwand, Signaltransduktionswege, sekretierte Faktoren und andere Faktoren. Diese Form der Definition enthält viele intrazelluläre Proteine, die bei der zweiten Möglichkeit der Definition nicht mehr berücksichtigt werden. Dabei werden nur Faktoren als wahre Virulenzfaktoren bezeichnet, die auch direkten Kontakt mit der Säugerzelle haben. Calderone und Fonzi (2001) behandeln in ihrem Artikel zu Virulenzfaktoren zwar keine metabolischen Gene oder Proteine mehr, sondern hauptsächlich Adhäsionsfaktoren, wie z. B. Adhäsine, Hwp1, Int1, ALS-Genprodukte und sekretierte, hydrolysierende Proteine, wie z. B. sekretierte Aspartatproteasen (Saps) und Phospholipase B1 (Plb1), jedoch auch Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Tec1, Cph1, Efg1. Vertreter der dritten Definition von Virulenzfaktoren sind Casadevall und Pirofski (2003), die alle Komponenten, die den Wirt beschädigen („Damage framework“), als Virulenzfaktoren bezeichnen und essentielle Komponenten für die Überlebensfähigkeit im Wirt einbeziehen. Die Auswertung eines Fragebogens zur Definition von Virulenzfaktoren auf der ASM Conference on Candida and Candidiasis 2002 in Tampa, USA, bestätigte die Wichtigkeit von Tierinfektionsexperimenten als Voraussetzung zur Bezeichnung eines Virulenzfaktors. Die Einbeziehung essentieller Gene stieß auf unterschiedliche Meinungen. Zusammenfassend wurde vorgeschlagen, dass die Bezeichnung Virulenzfaktor nur für Faktoren verwendet werden sollte, die direkt mit Wirtskomponenten interagieren; Moleküle, die in

irgendeiner Weise einen Virulenzfaktor beeinflussen, z. B. dessen Funktion oder Expression, sollten als Virulenzregulatoren bezeichnet werden (Odds *et al.* 2003). Nach Saville *et al.* (2003) wird die Fähigkeit des Hefe-Myzel-Überganges („yeast-to-hyphae transition“; Dimorphismus) mittlerweile als Virulenzmechanismus anerkannt. Dagegen scheint es widerlegt, dass die Hyphenform per se die virulente Form des Pilzes ist (Kumamoto und Vices 2005-b). Zwei Signalwege zur Regulation der Hyphenbildung sind besonders gut untersucht: die MAPK- (mitogen aktivierte Proteinkinase) und cAMP-Kaskade, an deren Enden mehrere Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Tup1, Efg1, und Cph1 stehen (Ernst 2000, Kumamoto und Vices 2005-a). Diese Signalkaskaden sind jedoch noch längst nicht vollständig aufgeklärt. So fehlt Wissen über die möglichen Quervernetzungen zwischen ihnen, über die Rezeptoren am Anfang der Kaskaden, über die spezifischen Stimuli und einzelnen Zwischenstufen, sowie mögliche „by-pass“-Reaktionen. Da es bei *S. cerevisiae* ähnliche Signaltransduktionswege gibt, welche die Pseudohyphenbildung bei Stickstoffmangel steuern, wurden viele Erkenntnisse über den Dimorphismus bei *C. albicans* durch den Vergleich mit der Bäckerhefe erhalten.

In Abhängigkeit von den Umweltbedingungen kommt *C. albicans* als Hefezellform, echte Hyphenform, Pseudohyphenform oder als Chlamydospore vor. Für die Untersuchung des Pilzes sind jeweils *in vitro* Bedingungen bekannt, die eine bestimmte Wachstumsform hervorrufen (Berman *et al.* 2002).

In allen Morphologien wächst *C. albicans* als diploider Organismus, weshalb der Pilz auch zur Gruppe der Deuteromyceten gerechnet wird. Ein echter sexueller Zyklus und dessen Stadien sind bisher nicht bekannt, wenngleich in der Genomsequenz des Pilzes homologe Gene für einen kompletten sexuellen Zyklus gefunden wurden (Tzung *et al.* 2001). Das molekularbiologische Arbeiten mit einem solchen, als obligat diploid erscheinenden Pilz wird dadurch erschwert.

Für das Generieren von Mutanten in *C. albicans* wird am häufigsten eine wiederholt verwendbare Disruptionskassette mit dem *CaURA3* Gen als Marker verwendet, mit der sequentiell die Allele eines oder mehrerer Gene ausgeschaltet werden können (s. auch 2.2.3.4). Neuere Untersuchungen haben jedoch einen Effekt der Lokalisation des *CaURA3* –Markers im Genom auf die Adhäsion an humanes Gewebe und auf die Virulenz in der Maus festgestellt (Bain *et al.* 2001; Staab und Sundstrom 2003). Die Herstellung einer Disruptionskassette kann durch eine PCR vermittelte Amplifikation vereinfacht werden. Dabei wird die Disruptionskassette

direkt durch PCR generiert und nicht erst in einen Vektor kloniert (Wilson *et al.* 1999). Neben einem *URA3* –auxotrophen Stamm gibt es weitere auxotrophe Mutanten von *C. albicans*, die durch die Transformation von Selektionsgenen, wie z. B. *CaHIS1* und *CaARG4*, komplementiert werden können. Diese Stämme werden ebenfalls für die Herstellung von Mutanten verwendet, wobei die Disruption jedes Allels eines Gens mit einem anderen Marker erfolgen kann (Wilson *et al.* 1999). Enloe *et al.* (2000) haben mit einer *URA3* - *ARG4* kombinierenden Disruptionskassette eine Möglichkeit gezeigt, ein essentielles Gen indirekt nachzuweisen. Das FLP/FRT-System zum Erstellen von Mutanten von *S. cerevisiae* wurde auch für *C. albicans* übernommen (Morschhäuser *et al.* 1999). Nur eine Veröffentlichung beschreibt bisher die Verwendung von antisense RNA zum Erstellen von Mutanten (DeBaker *et al.* 2001).

Zur Regulation bzw. Beeinflussung und Untersuchung der Genexpression ausgesuchter Gene stehen mehrere *Candida*-Promotoren zur Verfügung, aber auch ein Tetracyclin regulierbarer Promotor und Gene mehrerer Codon-optimierter Fluoreszenzproteine (Berman *et al.* 2002). Genomweite Expressionsstudien von *C. albicans* sind mit Microarrays, z. B. der Firma Eurogentec, möglich.

1.4.1 *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*

Der Ascomycet *S. cerevisiae* gilt auch in der *Candida*-Forschung als Modellorganismus. Homologe Gene können oft bereits durch Sequenzvergleich identifiziert und heterolog exprimiert werden. Viele Signalwege und Regulationen von Genen und Proteinen scheinen konserviert zu sein. Daher ist der direkte Vergleich von *S. cerevisiae* als ein nicht pathogener, einzelliger Pilz mit dem humanpathogenen Pilz *C. albicans* besonders interessant. Unterschiede im Genom und Proteom, sowie die Regulation der Gene und Proteine können immer unter dem Blickwinkel der Anpassung von *C. albicans* an die spezifischen Umweltbedingungen im Wirt betrachtet werden. Aus dieser Perspektive sind die Unterschiede der beiden Pilze hervorzuheben. So durchläuft *S. cerevisiae* einen sexuellen Zyklus mit einem haploiden Stadium und zeigt weniger morphologische Formen als *C. albicans* (nur Hefeform und Pseudohyphen). Letztere Tatsache schließt *S. cerevisiae* als Modell für die Bildung von echten Hyphen und Chlamydosporen aus (Berman *et al.* 2002; De Backer *et al.* 2000).

Homologe Sequenzen in beiden Organismen können auf eine ähnliche oder gar gleiche Funktion des Gens/Proteins hindeuten. Dennoch kann die Rolle innerhalb des Organismus eine ganz andere sein. Zum Beispiel ist gezeigt worden, dass die Phänotypen von Mutanten, denen das Gen *SPT3* fehlt, bei *S. cerevisiae* und *C. albicans* nahezu gegensätzlich sind (Laprade *et al.* 2002). Weiterhin können Orthologe von essentiellen Genen bei *S. cerevisiae* in *C. albicans* nicht essentiell sein bzw. umgekehrt (z. B. ist *MED8* essentiell in *S. cerevisiae*, aber nicht in *C. albicans* (Bruno *et al.* 2004)). In vielen anderen Fällen konnten durch die heterologe Expression von *Candida*-Genen in *S. cerevisiae* dagegen Mutationen komplementiert und Proteinfunktionen bestätigt werden. Bei der heterologen Expression ist jedoch zu beachten, dass in *C. albicans* das CUG-Codon nicht wie herkömmlich als Leucin, sondern überwiegend als Serin abgelesen wird (Santos *et al.* 1995; Massey *et al.* 2003).

1.4.2 Die Phospholipasen von *Candida albicans* und homologe Gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Dass Phospholipasen von *C. albicans* eine Rolle bei der Pathogenese spielen, geht nicht nur aus der Phänotypisierung der entsprechenden Mutanten hervor, sondern wurde bereits nach der Bestimmung der Aktivität von Phospholipasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion und bei verschiedenen Isolaten vorgeschlagen. Bereits 1985 zeigten Barrett-Bee *et al.* einen Zusammenhang zwischen extrazellulärer Phospholipaseaktivität und Pathogenität bei *C. albicans* auf. *C. albicans* Isolate aus Blut von Patienten besitzen mehr extrazelluläre Phospholipaseaktivität als kommensale Stämme (Ibrahim *et al.* 1995). Eine neuere Untersuchung von 186 *Candida*-Isolaten auf sekretorische Protease- und Phospholipaseaktivität zeigte, dass 72% der Isolate Phospholipaseaktivität aufwiesen und diese bei den Isolaten von respiratorischen Infekten am höchsten war (Borst *et al.* 2003). Die weniger pathogenen non-*albicans* Stämme produzieren relativ weniger sekretorische Phospholipasen (Ghannoum 2000).

Bei *C. albicans* wird angenommen, dass die extrazelluläre Phospholipaseaktivität der Hyphenspitze am größten ist (Ghannoum 2000). Bereits 1977 schlossen Price und Cawson aufgrund von Reaktionsprodukten auf intrazelluläre PLA- und Lysophospholipase-Aktivität von *C. albicans*. Eine PLC-Aktivität wurde von den

gleichen Autoren nicht nachgewiesen. Mit weiteren Enzymassays konnten jedoch später PLA- und PLC-Aktivitäten in den Mikrosomenfraktionen und PLC-Aktivität auch in der cytosolischen Fraktion bestimmt werden (Mago und Khuller 1990). 1991 bestimmte Takahashi mittels Enzymassays extrazellulär die Aktivität von drei Typen von Phospholipasen: Lysophospholipase, LPTA und PLB. Goyal und Khuller (1992) wiesen ebenfalls über Aktivitätstests intra- und extrazellulär PLA- und Lysophospholipase-Aktivität nach. Dabei waren beide intrazellulären Aktivitäten in der Hefeform höher, extrazellulär nur die Lysophospholipase-Aktivität in der Hefeform höher.

Im Zuge des Genomprojektes wurden 5 Gene, auf Grund ihrer Ähnlichkeiten zu Phospholipasen von *S. cerevisiae*, als PLB annotiert. Diese PLB-Genfamilie zeigt während des Filamentwachstums eine stärkere Expression (Theiss *et al.* 2006). Bei *S. cerevisiae* sind 3 Phospholipasen B bekannt (Lee *et al.* 1994; Merkel *et al.* 1999; Fyrst *et al.* 1999).

In *C. albicans* wurden zwei Phospholipasen der Klasse B, kodiert durch die Gene *CaPLB1* und *CaPLB2*, genauer charakterisiert (Hoover *et al.* 1998; Leidich *et al.* 1998; Sugiyama *et al.* 1999). Beide Proteine haben N-terminal hydrophobe Aminosäuren als Signal zum Transport ins Endoplasmatische Reticulum (sekretorischer Weg). Die C-terminalen Enden weisen keine besonderen Motive auf. Dagegen besitzt *CaPlb5* eine C-terminale putative GPI-Anker Sequenz (Theiss *et al.* 2006). *CaPLB1* wird beim Morphologiewechsel induziert und trägt zur Virulenz von *C. albicans* bei. Für eine *CaPLB1*-negative Mutante wurde gezeigt, dass sie weniger invasiv und in zwei verschiedenen Mausinfektionsmodellen, einem für intravenöse Infektion und einem für orale-intragastrische Infektion (Mukherjee *et al.* 2001), weniger virulent ist. Mirbod *et al.* wiesen bei der gereinigten *CaPlb1* eine LPTA-Aktivität, LysoPL- und PLB-Aktivität nach.

Bisher ist nur eine Phosphatidylcholin- spezifische Phospholipase D (*CaPlD1*) in *C. albicans* beschrieben worden (McLain *et al.* 1997; Hube *et al.* 2001) und auch bei Analysen des Genomprojekts wurden bisher keine Gene identifiziert, die Ähnlichkeiten mit *PLD* Genen haben. Bei *S. cerevisiae* sind je eine Ca^{2+} -unabhängige, PC- spezifische (kodiert durch *PLD1/SPO14*) und eine Ca^{2+} -abhängige, PE- und PS- spezifische Phospholipase D beschrieben worden. Während letztere nur anhand ihrer Aktivität charakterisiert ist (Tang *et al.* 2002), kennt man das Gen der *ScPlD1* und den Phänotyp der Mutante (Waksman *et al.* 1996; Ella *et al.*

1996). Ein entsprechendes PE-Plc codierendes Gen wurde trotz verschiedener Ansätze jedoch bislang noch nicht in *S. cerevisiae* gefunden.

Die PC-Plc in *C. albicans* wird während der Morphogenese aktiviert. So zeigte die $\Delta Capld1/\Delta Capld1$ Mutante einen Morphologiedefekt und resultierend daraus einen Virulenzverlust (Dolan *et al.* 2004). Das Reaktionsprodukt der CaPlc1, Phosphatidsäure (PA), aktiviert die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase (PI4P5K), die wiederum PI(4,5)P₂ herstellt. PI(4,5)P₂ gilt als Substrat für eine PI-Plc und aktiviert die CaPlc1 selber. Das Gen für die PI4P5K wurde in *C. albicans* mit *CaMSS4* benannt (Hairfield *et al.* 2002). In *S. cerevisiae* ist die PI4P5K essentiell aufgrund ihrer Rolle in der Actin-Zytoskelettförmung (Desrivieres *et al.* 1998). Sowohl die Aktivität der CaPlc1 als auch die Transkription des entsprechenden Gens nehmen während der Umwandlung von der Hefe- in die Hyphenform zu (McLain *et al.* 1997; Hube *et al.* 2001). Die *PLD1*-Mutante von *C. albicans* überlebt nicht in inneren Organen nach intravenöser Infektion von Mäusen. Nach oraler Infektion führt die Mutante, im Vergleich zum parental Stamm, nicht zur Verminderung des Körpergewichts der Mäuse und wirkt auch nicht lethal auf immunsupprimierte Mäuse. *In vitro* bildet $\Delta Capld1/\Delta Capld1$ keine Hyphen auf festem Spider-Medium und kann epitheliale Monolayer nicht penetrieren. Die Hyphenbildung *in vivo* ist möglich, dennoch ist die Virulenz reduziert (Dolan *et al.* 2004).

Im Unterschied zu *S. cerevisiae*, wo nur eine Phospholipase der Klasse C (ScPlc1) bekannt ist, hat *C. albicans* drei Plcs. *CaPLC1* ist das homologe Gen zu der Phospholipase ScPlc1 in *S. cerevisiae* (Bennett *et al.* 1998). *CaPLC2* und *CaPLC3* (*PI-PLC* bei Andaluz *et al.* 2001) sind zwar zu einander fast identisch, doch unterscheiden sie sich sehr von *CaPLC1* und *ScPLC1*.

CaPLC1 mRNA konnte in der Hefe- und Hyphenform mit RT-PCR nachgewiesen werden, im Northern aber nicht detektiert werden (Bennett *et al.* 1998). Daraus lässt sich folgern, dass die Transkriptmenge, ähnlich wie in *S. cerevisiae*, gering ist. Frühere Experimente von Gadd und Foster (1997), die einen Anstieg der IP₃ Konzentration während einer Hypheninduktion mit Lee's Medium und transient während des Wachstums als Hefeform beobachteten, zeigten eine Verbindung zwischen Plc-Reaktionsprodukt IP₃ und Morphologiewechsel.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Regulation der Morphologie und damit auch der Virulenz des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* erfolgt über verschiedene, noch nicht vollständig geklärte Signalkaskaden, die zudem oft untereinander wechselwirken. Dabei können Produkte enzymatischer Reaktionen regulierend an verschiedenen Stellen eingreifen. Das können auch die Reaktionsprodukte der Phospholipasen, die dadurch nicht nur am zellulären Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Da sich jedoch auch die Lipidzusammensetzung der Membran während der Morphogenese ändert, können intrazelluläre Phospholipasen folglich mehrere denkbare Funktionen bei der Regulation der Morphologie und damit auch der Virulenz haben. Ein Teil dieser Arbeit befasste sich deshalb mit den Genen des Pilzes, die für Phospholipasen der Klasse C codieren bzw. deren Genprodukte. Es wird postuliert, dass die Reaktionsprodukte der Plcs, Inositol1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), als second messenger für virulenzassoziierte Funktionen des Pilzes fungieren können. Zu Beginn der Arbeit waren drei Gene (*PLC1*, *PLC2 = PI-PLC*, *PLC3*) in *C. albicans* beschrieben, die für solche Funktionen in Frage kamen (s. 1.4.2). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle dieser drei PLCs aufzuklären. Durch das Deletieren der einzelnen Gene sollten Disruptionsmutanten hergestellt und ihre Phänotypen, insbesondere bei der Morphologie, untersucht werden. Da durch die Ähnlichkeit von CaPlc2 und CaPlc3 eine phänotypische Komplementierung in Betracht gezogen werden musste, sollte eine Doppelmutante erstellt werden. Phänotypische Auswertungen und die Untersuchung der Genexpression der Mutanten sollten aufklären, ob die Phospholipasen an den bereits bekannten Regulationsnetzwerken und Kaskaden in *C. albicans* beteiligt sind und welche Funktionen die Plcs haben könnten.

Ein zweiter Teil der Arbeit galt einem Gen, das an der Regulation von Phospholipase A (PLA) Aktivität in *C. albicans* beteiligt sein könnte. Schon in frühen Publikationen wurde das Vorhandensein einer Phospholipase A in *C. albicans* postuliert (s. 1.4.2). Im bekannten Genom von *C. albicans* konnte jedoch kein Gen mit Ähnlichkeiten zu anderen Phospholipasen der Klasse A identifiziert werden. Das in dieser Arbeit als *CaDOA1* bezeichnete Gen von *C. albicans* hat Ähnlichkeiten zu einem Gen in Säugern, dessen Produkt als Phospholipase A aktivierendes Protein (PLAP) bezeichnet wird. Durch Herstellung von Disruptions- und Überexpressions-

mutanten, durch Untersuchung von Expressionsprofilen und Durchführung von Enzymassays sollte auch hier versucht werden, die Funktion dieses Gens in *C. albicans* aufzuklären.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Mikroskope

Axiovert 200	Carl Zeiss
Fotomikroskop II	Carl Zeiss
Leica DMIL	Leica
cLSM510	Carl Zeiss

Geldokumentation

Alphamager™2000	Biozym
Multimage™Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation

Spezielle Anwendungssoftware

AxioVision3.1	Zeiss
easyWIN6.1	TECAN
Chemilmager 4000i3.3b	Biozym
AIDA image analyser 2.0	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Lasergene	DNASTAR, Inc.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Chemikalien wurden, wenn nicht im Speziellen bezeichnet, von den Firmen Fluka, Roth, Merck und Sigma bezogen. Enzyme wurden von MBI Fermentas verwendet mit einigen Ausnahmen. Für Fotoaufnahmen am Mikroskop wurden die Filme Ektachrome 400 und 64T von Kodak genutzt.

2.1.3 Verwendete Stämme

2.1.3.1 Verwendete Stämme von *Candida albicans*

Name	Hersteller/ bezogen von/ Referenz
SC5314	klinisches Isolat, Fonzi <i>et al.</i> 1993
CAF2-1	Fonzi <i>et al.</i> 1993
CAI-4	Fonzi <i>et al.</i> 1993

CaPLC1/

$\Delta Caplc1$ - <i>hisG-URA3-hisG</i>	M219 - Arbeitsgruppenstammsammlung
$\Delta Capld1/\Delta Capld1$	
<i>CaPLC1/\Delta Caplc1-hisG</i>	M220 und M221 - Arbeitsgruppenstammsammlung
<i>CaPLC1/\Delta Caplc1-hisG</i>	M222 – Arbeitsgruppenstammsammlung
$\Delta Caplc1/pMET3$ - <i>CaPLC1</i>	M226 – Arbeitsgruppenstammsammlung
$\Delta Capld1/Ca\Delta pld1$	M195 – Arbeitsgruppenstammsammlung

2.1.3.2 Verwendete Stämme von *E. coli*

Name	Hersteller/ bezogen von/ Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Invitrogen

2.1.3.3 Während dieser Arbeit generierte *Candida albicans* Mutanten

Von allen hergestellten Mutanten sind mehrere Isogene generiert und aufbewahrt worden. In der folgenden Tabelle sind lediglich die aufgeführt, mit denen auch gearbeitet wurde.

Stamm-Nummer	Stamm	Genotyp	Klonbezeichnungen-Arbeitsbezeichnung (isogene Klone)
DK1	$\Delta doa1/DOA1$	CAI-4 Derivat, $DOA1/\Delta doa1::hisG-URA3-hisG$	10.2, 10.3, 1P
DK1-1	$\Delta doa1/DOA1$	CAI-4 Derivat, $DOA1/\Delta doa::hisG$	10.2-1, 10.3-1, 1P-1
DK2	$\Delta doa1/\Delta doa1$	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1::hisG-URA3-hisG/\Delta doa1::hisG$	10.2-1-16, 10.3-1-17, 10.3-1-25, 10.3-1-30, 1P-1-4
DK2-1	$\Delta doa1/\Delta doa1$	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1::hisG/\Delta doa1::hisG$	10.3-1-25-1
DK3	$\Delta doa1/\Delta doa1$ + pBI-1- <i>DOA1</i>	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1::hisG/\Delta doa1::hisG$ + pBI-1- <i>DOA1</i>	10P8, 10P9
DK4	CAI-4 + pBI-1- <i>DOA1</i>	CAI-4 + pBI-1- <i>DOA1</i>	IP9, IP12, IP4, IP6
DK5	$\Delta doa1/\Delta doa1$ + pBI-1	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1::hisG/\Delta doa1::hisG$ + pBI-1	10I4, 10I7
DK6	$\Delta doa1/\Delta doa1$ + pBI-1- <i>DOA1-KVL</i>	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1-hisG/\Delta doa1-hisG$ + pBI-1- <i>DOA1-KVL</i>	KVL5, KVL9, KVL11, KVL18, KVL19
DK7	$\Delta doa1/\Delta doa1$	CAI-4 Derivat,	
DK8	$\Delta doa1/\Delta doa1$	CAI-4 Derivat, $\Delta doa1::hisG/\Delta doa1::hisG$, <i>rps1::Clp10-DOA1/RPS1</i>	1, 5, 43, 48

DK9	CAI-4 + pBI-1	CAI-4 + pBI-1	C1, C2, C3, C4
DK10	$\Delta doa1/DOA1+GFP$	CAI-4 Derivat, $DOA1+GFP/\Delta doa1::hisG$	10.3-1-G2, 1P-2-G3
DK11	$\Delta plc2/PLC2$	CAI-4 Derivat, $PLC2/\Delta plc2::hisG-URA3-hisG$	14C2
DK11-1	$\Delta plc2/PLC2$	CAI-4 Derivat, $PLC2/\Delta plc2::hisG$	14C2-3
DK12	$\Delta plc2/\Delta plc2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG-URA3-hisG/\Delta plc2::hisG$	14C2-3-16
DK12-1	$\Delta plc2/\Delta plc2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2-hisG$	14C2-3-16-4
DK13	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/PLC3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2::hisG, PLC3/\Delta plc3::hisG-URA3-hisG$	14C2-3-16-4-20
DK13-1	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/PLC3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2::hisG, PLC3/\Delta plc3::hisG$	14C2-3-16-4-20-4, 14C2-3-16-4-20-5, 14C2-3-16-4-20-7, 14C2-3-16-4-20-13
DK14	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/\Delta plc3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2::hisG, \Delta plc3::hisG-URA3-hisG/\Delta plc3::hisG$	14C2-3-16-4-20-4-5 und 7 14C2-3-16-4-20-4-13
DK14-1	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/\Delta plc3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2::hisG, \Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG$	14C2-3-16-4-20-4-13-8 14C2-3-16-4-20-4-13-11
DK15	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/\Delta plc3+ pBI-1$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2::hisG/\Delta plc2::hisG, \Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG+ pBI-1$	14C2-3-16-4-20-4-13-8 +pBI-1 → 8I-13 14C2-3-16-4-20-4-13-11+pBI-1 → 11I-3, 11I-14
DK16	$\Delta plc2/\Delta plc2, \Delta plc3/\Delta plc3+ pBI-1- PLC2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc2-hisG/\Delta plc2-hisG, \Delta plc3-hisG/\Delta plc3-hisG+ pBI-1- PLC2$	14C2-3-16-4-20-4-13-11+ pDK-16 → 11-2, 11-3 14C2-3-16-4-20-4-13-8 +pDK-16 → 8-2, 8-3
DK17	$\Delta plc3/PLC3$	CAI-4 Derivat, $PLC3/\Delta plc3::hisG-URA3-hisG$	15C3
DK17-1	$\Delta plc3/PLC3$	CAI-4 Derivat, $PLC3/\Delta plc3::hisG$	15C3-1
DK18	$\Delta plc3/\Delta plc3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc3::hisG-URA3-hisG/\Delta plc3::hisG$	15C3-1-42, 15C3-1-43
DK18-1	$\Delta plc3/\Delta plc3$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG$	15C3-1-42-1, 15C3-1-43-1
DK19	$\Delta plc3/\Delta plc3, \Delta plc2/PLC2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG, PLC2/\Delta plc2::hisG-URA3-hisG$	15C3-1-43-1-24, 15C3-1-42-1-24
DK19-1	$\Delta plc3/\Delta plc3, \Delta plc2/PLC2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG, PLC2/\Delta plc2::hisG$	15C3-1-42-1-24-1, 15C3-1-43-1-24-1bis4, 15C3-1-43-1-24-9bis16
DK20	$\Delta plc3/\Delta plc3, \Delta plc2/\Delta plc2$	CAI-4 Derivat, $\Delta plc3::hisG/\Delta plc3::hisG, \Delta plc2::hisG-URA3-hisG/\Delta plc2::hisG$	15C3-1-42-1-24-5-16-1bis8
DK21	$\Delta pld1/\Delta pld1, \Delta plc1/pMET3-PLC1$	CAI-4 Derivat, $\Delta pld1::hisG/\Delta pld1::hisG, \Delta plc1::hisG/pMET3-PLC1$	M221-3, M221-4
DK22	CAI-4 + pBI-1- $PLC1$	CAI-4 + pBI-1- $PLC1$	PLC1-UE 3,9,17

2.1.4 Plasmide

2.1.4.1 Bezogene Plasmide

Plasmidname	Hersteller/ bezogen von/ Referenz
pGEM [®] - T Easy Vektor	Promega
pGEM [®] - T Vektor	Promega
pCR [®] 2.1 – TOPO	Invitrogen
pCR [®] - Blunt II – TOPO	Invitrogen
pBluescript II SK +	Stratagene
pMB7	Fonzi und Irwin 1993
pBI –1	Leuker <i>et al.</i> 1997; Stoldt <i>et al.</i> 1997
pCaDis	Care <i>et al.</i> 1999
pIM – 17	Inga Melzer (Arbeitsgruppenstammsammlung)
Clp10	Murad <i>et al.</i> 2000
pMG1602 (pGFP-URA3)	Gerami-Nejad <i>et al.</i> 2001
pDS952	Dominique Sanglard, Lausanne
pDB104	Dèsirée Bennett, Dublin
pGEM-URA3	Arbeitsgruppenstammsammlung

2.1.4.2 In dieser Arbeit erstellte Plasmide

Plasmidkarten mit einer Kurzbeschreibung der einzelnen Plasmide befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Plasmidname (kurz)	Plasmidname (ausführlich)	Nummer in der Plasmidsammlung
pDK-1	pCR2.1-TOPO-PLC1/3-4	P120
pDK-2	pGEM-T Easy-PLC1/ 3-4	P121
pDK-3	pCR2.1-TOPO-URA (Hind III)	P131
pDK-4	pGEM-T Easy-PLC1 (3-4)-URA3	P151
pDK-5	pCR2.1-TOPO-PLC2/ D1-D2	P130
pDK-6	pGEM-T Easy- PLC2/ D1-D2	P132
pDK-7	pGEM-T Easy-PLC2/ D1-D2-Hind III	P150
pDK-8	<i>PLC2</i> -Disruptionskassette	P158
pDK-9	pCR2.1-TOPO-DOA1/3-4	P124
pDK-10	pMB7-DOA1/3-4	P125

pDK-11	pCR2.1-TOPO-DOA1/1b-2a	P159
pDK-12	<i>CaDOA1</i> -Disruptionskassette	P160
pDK-13	pBS II-SK (+)-PLC2-lang (Pfu)	P161
pDK-14	pBI-1-PLC2-lang (Pfu)	P162
pDK-15	pGEM-T-PLC2-kurz	P163
pDK-16	pBI-1-PLC2-kurz	P164
pDK-17	pGEM-T Easy-PLC3	P165
pDK-18	pBI-1-PLC3	P166
pDK-19	pGEM-T-PLC1	P167
pDK-20	pBI-1-PLC1	P168
pDK-21	pGEM-T Easy-DOA1	P169
pDK-22	pBI-1-DOA1	P170
pDK-23	pBI-1-PLC1-URA3kurz	P171
pDK-24	pCR-Blunt II- TOPO-DOA1-RE-XhoI	P172
pDK-25	pCIP-10-DOA1-RE-XhoI	P173
pDK-26	pGEM-T Easy-DOA1-KVL	P174
pDK-27	pBI-1-DOA1-KVL	P175

2.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotidsequenzen wurden selbst erstellt und die Oligonukleotide von der Firma TIP-Molbiol, Berlin, synthetisiert. Sie wurden in einer Konzentration von 10pmol/µl verwendet.

Primernamen	Gen	Sequenz (5'.....3')
PLC-1 fwd	<i>PLC1</i>	ATG TTG GAA TCA TTA AAT CGT C
PLC-2 rev	<i>PLC1</i>	GTA CAA TTG ATC TTG ATT CAT C
PLC-3 fwd	<i>PLC1</i>	TTT GGG ATT CAT TAG CTC AAG G
PLC-4 rev	<i>PLC1</i>	TTG TAT CGA CAT TGC TAC TGC
PLC1-UE1 fwd	<i>PLC1</i>	AGA TCT AAT GTT GGA ATC ATT AAA T
PLC1-UE2 rev	<i>PLC1</i>	AGA TCT ACT AGT TGT TAT CTT CCC
PLC1-UE3 rev	<i>PLC1</i>	CCC GGG ACT AGT TGT TAT CTT CCC
PLC1-UE3a rev	<i>PLC1</i>	CCC GGG ACT AGT TGT TAT CTT C
PLC1-S3R rev	<i>PLC1</i>	TAG TAG TGA TGA TTG AAC CAC TA
PLC-1S rev	<i>PLC1</i>	TTG TTG AAT TAG CCA TTC TCC A
PLC-S3 fwd	<i>PLC1</i>	TAG TGG TTC AAT CAT CAC TAC TA
PLC-S4 rev	<i>PLC1</i>	ACT AGT TGT TAT CTT CCC CAT GA
PLC-3R rev.	<i>PLC1</i>	CCT TGA GTT AAT GGA TCC CAA A
PLC1-D1 rev	<i>PLC1</i>	TAA CAT TAG CAA AGC TTA TTG G
PLC1-D2 rev	<i>PLC1</i>	TAG TAT TTG AAG ATG ACG ATG ATG
PLC1-D2 fwd.	<i>PLC1</i>	GAT GAA TCA AGA TCA ATT GTA C

PLC1-D3 fwd.	<i>PLC1</i>	TGG AGA ATG GCT AAT TCA ACA A
PLC1-D4 fwd.	<i>PLC1</i>	ACT AGC TGG TGA TAA TGG TAA TG
PLC1-D5	<i>PLC1</i>	CCA ATT GCA CCA ACC ACC AGT
PLC1-D6	<i>PLC1</i>	AGT GAC TAA TAT AGC AAT AGG G
PLC1-D7	<i>PLC1</i>	GCA GTA GCA ATG TCG ATA CAA
PLC1-D8	<i>PLC1</i>	GAT ATT ACC ATC ACC AGC CGA A
PLC1-D9	<i>PLC1</i>	CCA AGA TTA CTT AAT TCA TTG ATG
PLC1-MET	<i>PLC1</i>	TTC AAC TTC CAA GTG TTG TCA C
C1CON-D1 fwd.	<i>PLC1-Contig</i>	AAC GGG GTT AAC TAG AAG AAT TAT
C1CON-D2 rev.	<i>PLC1-Contig</i>	AGC CAC ATC AAC AGC AGG AAC
piplc2-0 fwd.	<i>PLC2</i>	CAA TCG ATT GGT TTC TAT TTC AAT
piplc2-1 fwd.	<i>PLC2/3</i>	CAA AAC TTG GTT AAA GGA TAT TGA
piplc2-2 rev.	<i>PLC2/3</i>	GTT CAT CTT GAA CAC CAA ATC
piplc2-3 rev.	<i>PLC2/3</i>	ACA CAA TGA CAG TCT CCG AAG AA
piplc3-3 fwd.	<i>PLC3</i>	CAC TGA CAT ATA ATA CAT TAA TTC
piplc2-D1 fwd	<i>PLC2</i>	ATG AAG CTC TAT TAC TCG CAT CTT
piplc2-D2 rev	<i>PLC2/3</i>	TTA GTA TCA ATT AAA GCT TCA GGC
piplc-inv1 fwd	<i>PLC2/3</i>	GAT CGG TAC CTG ATG CTA GAG GTA
piplc-inv2 rev	<i>PLC2/3</i>	GAT CAA GCT TGA CAG TCT CCG AAG
PLC2-UE1 fwd	<i>PLC2</i>	AGA TCT ATG AAG CTC TAT TAC TCG
PLC2-UE2 rev	<i>PLC2</i>	AGA TCT TGC TTA ATG CGA CAA ATA
PLC2-UE3 rev	<i>PLC2</i>	CCC GGG TGC TTA ATG CGA CAA ATA
PLC3-UE1 fwd.	<i>PLC2/3</i>	AGA TCT ATG GTC GAC TAC AAA ACT
PLC3-UE2 rev.	<i>PLC3</i>	AGA TCT AGT TGT CAA CTT TGA AGC
DOA1-1 fwd	<i>DOA1</i>	CAA TGG TCT GGG GCA TAG TCA
DOA1-2 rev	<i>DOA1</i>	CGA GCT CTT CCA GAG TCG CGG
DOA1-3 fwd	<i>DOA1</i>	GTC GAC CGA GCC ACC ATT GAA
DOA1-4 rev	<i>DOA1</i>	GGT GAT TAA TTC TAG CGC TTG C
DOA1-5 rev	<i>DOA1</i>	GGG TGA GCT GTG AAA ACT CTG
DOA1-6 rev	<i>DOA1</i>	TGG TAA TTT CAA TGG TGG CTC G
DOA1-7 rev.	<i>DOA1</i>	AGA CTT GGA AGG AAT CAC TTT C
DOA1-8 rev.	<i>DOA1</i>	TTC ACC CGT AGA TAC AAA CTT GC
DOA1-9 rev.	<i>DOA1</i>	TTG GCA GTG CTA TTC TGT AAC TT
DOA1-10 rev.	<i>DOA1</i>	AGA TCT AAA TTA TCT CAG CAG CAT CAG
DOA1-1a fwd	<i>DOA1</i>	AGT TGA CAC TGT ATT GTG TTC TAC
DOA1-1b fwd	<i>DOA1</i>	CTG TTT GCA AAC TAG TTG TAT TC
DOA1-2a rev	<i>DOA1</i>	ATC GGC ACT ACA AGT TAA ATA GTG
DOA1-UE1 fwd	<i>DOA1</i>	AGA TCT ATG TCT TAC AAA CTT AGT
DOA1-UE2 rev	<i>DOA1</i>	AGA TCT ATT AGA GAT TCA TAA GAA
DOA1-UE3 rev	<i>DOA1</i>	CCC GGG ATT AGA GAT TCA TAA GAA
DOA1-RE1 fwd.	<i>DOA1</i>	AAT TTT TAG CGA TTC CAT GAG TAG
DOA1-RE2 rev.	<i>DOA1</i>	CAG ATT CCC CAT TAG AGA TTC AT
DOA1-RE1X fwd.	<i>DOA1</i>	CTC GAG AAT TTT TAG CGA TTC CAT GAG
DOA1-RE2X rev.	<i>DOA1</i>	CTC GAG CAG ATT CCC CAT TAG AGA TTC
DOA1-k-fwd.	<i>DOA1</i>	CTG CAG GGC ACT GAC AAT AAA TTA TA
DOA1-k-rev.	<i>DOA1</i>	CTG CAG AAG TGC TGG ATT TTC CAC AT

DOA1-k1a-fwd	<i>DOA1</i>	GGT ACC GGC ACT GAC AAT AAA TTA TA
DOA1-k1a-rev	<i>DOA1</i>	GGT ACC AAG TGC TGG ATT TTC CAC AT
DOA1-GFP fwd.	<i>DOA1, GFP</i>	GAA GCA GGA ACT CTT TAC GCA ATT AAT GGC GAA CAA CGA TTC CTT GAT ATC GCA GAA GAT TTA AAA AAT ATA GGT GGT GGT TCT AAA GGT GAA GAA TTA TT
DOA1-URA rev.	<i>DOA1, URA3</i>	GGC TCA ATA TGC TCA AAA AGT ATC TGA ATT ATA CAG ATA CGA TTA AAT AAT ACA CGT ACA TAG TAG TCT ATC TAG AAG GAC CAC CTT TGA TTG
DOA1-LOK1 fwd.	<i>DOA1, GFP, URA3</i>	GAA GCA GGA ACT CTT TAC GCA ATT
DOA1-LOK2 rev.	<i>DOA1, GFP, URA3</i>	GGC TCA ATA TGC TCA AAA AGT ATC
CaUBI4 fwd.	<i>UBI</i>	TCT GAC ACC ATC GAT AAC GTC
CaUBI4 rev.	<i>UBI</i>	GGT TCT GCC ATC TTC TAA TTG
CaGLE1 fwd.	<i>GLE1</i>	GAG GAA CGC AGA CGC CAA GAA
CaGLE1 rev.	<i>GLE1</i>	GAT CAT TCC AAT CAC TTC AGT ACT
CaIPK2 fwd.	<i>IPK2</i>	CTC AAG TTC AAC TGC ACG ATC AA
CaIPK2 rev.	<i>IPK2</i>	CTT ATG GTC ATC AGC ATC ATT TAT
CaIPK1 fwd.	<i>IPK1</i>	AAG ATC ACT TCA CCA GAA GAT TG
CaIPK1 rev.	<i>IPK1</i>	GTT TAG AGA ACA AGT TCG ACA GTA
CaPRE6 fwd.	<i>PRE6</i>	GTG GTA TTA GGA TGT GAA AAG AGA
CaPRE6 rev.	<i>PRE6</i>	TTT TAT AAC AGC ACC AGG TTT CAA
CaPRE10 fwd.	<i>PRE10</i>	GCC GTT GAA AAT GGT ACA TCA
CaPRE10 rev.	<i>PRE10</i>	TCT TGC AGC ATG ATT TAT TGC TTC
CaRPT6 fwd.	<i>RPT6</i>	CAT GAA GGT GGT ATA AGA CCA TAT
CaRPT6 rev.	<i>RPT6</i>	AAC TGC TCT TGC CAA TAA GGT CTT ATG TCC GAC ACT GAA AAC ACA GGA
CaSMT3 fwd.	<i>SMT3</i>	ACC AAT TTG TGC ACG GTG AGC TTC
CaSMT3 rev.	<i>SMT3</i>	ATG TCC GAA CCT TCA AAG GAA GAG
CaIPF13356 fwd.	<i>IPF13356</i>	TAT AAG GTA CCT CAC GGC AGG ATG
CaIPF13356 rev.	<i>IPF13356</i>	TCG TTG AGA GTC GTA CCA TCC AGT
CaIPF3262.3 fwd.	<i>IPF3262.3</i>	TCC TCC AGG GTA AAC ATC TTC CCA
CaIPF3262.3 rev.	<i>IPF3262.3</i>	AGA CCA AGT GAT GAT GAA TTA TTG
CaACB1exon2 fwd.	<i>ASB1exon2</i>	GTA TTT ACT GAT CAA TTC AGT AGC
CaACB1exon2 rev.	<i>ASB1exon2</i>	CCC GGG GCT GTG AAC CTG ATT TCA
PLD1-UE3 rev	<i>PLD1</i>	AGA TCT GCT GTG AAC CTG ATT TCA
PLD1-UE2 rev	<i>PLD1</i>	AGA TCT ATG CTG CCA ACA GCC GAA
PLD1-UE1 fwd	<i>PLD1</i>	GGC GCG ACT TCG ACA GAA C
HisG 1b rev	<i>HisG</i>	GTT CTG TCG AAG TCG CGC C
HisG 2b fwd	<i>HisG</i>	ATG AAC GCA TGA GAA AGC CCC
hisG-S1 fwd	<i>HisG</i>	GTC ATT CAG GGT ATT GAA GCT
hisG-S2 rev	<i>HisG</i>	

URA1b fwd	<i>URA3</i>	TTA GGT CCT TAT GTA TGC TTA ATC
URA2b rev	<i>URA3</i>	GAT TAA GCA TAC ATA AGG ACC TAA
URA-D4 fwd.	<i>URA3</i>	CAA TCA AAG GTG GTC CTT CTG GA
URA-D3 rev.	<i>URA3</i>	TGT TTC CGT TTA TAC CAT CCA A
URA-D2 rev.	<i>URA3</i>	GAT CAA GCT TCT AGA AGGACCACC TTTG
URA-D1 fwd.	<i>URA3</i>	GAT CAA GCT TGG ATG GTA TAA ACG GAA
Amp1 fwd.	<i>bla AmpR</i>	ATG CTT AAT CAG TGA GGC ACC
Amp2 rev.	<i>bla AmpR</i>	ACA TCG AAC TGG ATC TCA ACA
PCK-D1 fwd.	<i>PCK1-Promotor</i>	ATA TTA CGT ATT CTC CTC CTT CTC
PCK-D2 fwd.	<i>PCK1-Promotor</i>	GGA TCC ACT GTA TTC CAA TTT A
PCK-D3 rev.	<i>PCK1-Promotor</i>	GAG AAG GAG GAG AAT ACG TAA TAT
ACT1 fwd.	<i>ACT1</i>	ACC GAA GCT CCA ATG AAT CCA
ACT1 rev.	<i>ACT1</i>	GGA TGG ACC AGA TTC GTC GTA
EFB1 fwd.	<i>EFB1</i>	AGT CAT TGA ACG AAT TCT TGG CTG
EFB1 rev.	<i>EFB1</i>	TTC TTC AAC AGC AGC TTG TAA GTC
T7 Primer	<i>T7-Promotor</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
GFP1 fwd.	<i>GFP</i>	TCT AAA GGT GAA GAA TTA TT

Primer für die *CaPLC1* - Disruption nach Wilson *et al.* (1999):

plc-ura fwd. 80mer

5' – TAT TAT CTA GTT ATT CAA CTC CAT ATC GTG AAA TCA CCC AAA CCC AAA CTA
ACT ATT ATT GGA TGG TAT AAA CGG AAA CA – 3'

plc-ura rev. 80mer

5' – GTC TTA TAA TGA ATG ATG ATG TAG AAC TAC TAT TAG ATT TAT TAT TTT CAT
TAT CTT TCT AGA AGG ACC ACC TTT GAT TG – 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Auftrennung durch Gelelektrophorese

Unter Nutzung der negativen Ladung der Nukleinsäuren können sie elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele mit einer standardmäßigen Konzentration von 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer benutzt. Für spezielle Auftrennungsanforderungen wurde teilweise die Konzentration entsprechend folgender Richtlinie geändert: 0,8% (w/v) Agarose für DNA-Fragmente größer als 3kb und 2% (w/v) Agarose für Fragmente kleiner als 0,75kb.

Die DNA-Proben wurden 1:10 mit Stopp-Puffer versetzt und nach dem Elektrophoreselauf mit dem Interkalator Ethidiumbromid im UV-Bereich sichtbar gemacht. Dazu

wurde das Gel kurze Zeit in einem Färbebad mit einer Konzentration von ca. 200µl Ethidiumbromid/ 600ml dest. Wasser inkubiert. Die Konzentration der Ethidiumbromid-Stammlösung (Sigma) betrug 10mg/ml.

1xTBE- Puffer (5 Liter)	10x Stopp- Puffer
60,5 g Tris-base	30% (w/v) Ficoll
30,9 g Borsäure	0,25% (w/v) Bromphenolblau
3,7 g EDTA	0,25% (w/v) Xylene Cyanole FF in 0,2 M EDTA, pH 8, lösen

2.2.1.2 DNA -Extraktion aus dem Agarosegel

Für einige Anwendungen, wie z.B. Ligationen, benötigte gereinigte DNA-Banden wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des NucleoSpin Extract 2in1 Kit (Macherey-Nagel) extrahiert.

2.2.1.3. DNA-Spaltung durch Restriktion

Restriktionsendonukleasen des Typ II von der Firma MBI Fermentas wurden nach deren Beschreibung genutzt.

Ein typischer Restriktionsansatz sah folgendermaßen aus:

1-5µl DNA (abhängig von der DNA-Konzentration)
 0,5-1µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
 2µl 10x Restriktionspuffer
16,5-12,5µl bidest. Wasser
 = 20µl

2.2.1.4 Dephosphorylierung

Bei der Dephosphorylierung wird der von der T4 DNA -Ligase benötigte endständige 5'-Phosphatrest eines DNA-Stranges entfernt und somit eine Religation weitestgehend verhindert. Ein Dephosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

26,5µl DNA-Lösung
0,5µl Alkalische Phosphatase (MBI Fermentas)
3µl CIP-Puffer (10x)
= 30µl

Nach einer 1stündigen Inkubation bei 37°C wurde durch die Zugabe von EDTA (Endkonzentration 5mM) und eine Inkubation bei 75°C für 5min gestoppt. Anschließend erfolgte eine Phenol- Chloroform- Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung zur Reinigung der DNA.

2.2.1.5 Mungbohnen-Nukleasebehandlung von Restriktionsfragmenten

Mungbohnen-Nuklease ist eine spezifische DNA- und RNA-Endonuklease, die Einzelstänge am Ende eines Fragments degradiert. In dieser Arbeit wurde das Enzym der Firma New England BioLabs nach Herstelleranweisung verwendet. Anschließend wurde die DNA durch eine Ethanol-fällung gereinigt und gegebenenfalls aufkonzentriert.

2.2.1.6 Phenol- Chloroform- Extraktion

Zur Reinigung der DNA von Proteinen wurde in dieser Arbeit die DNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol- Chloroform- Lösung (Roti[®]-Phenol der Firma Roth, enthält Phenol- Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1:24) versetzt, kräftig geschüttelt und zur scharfen Phasentrennung 5min bei RT und 14000rpm (14300 x g) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Reinigung von Phenolresten mit Chloroform wie vorher beschrieben geschüttelt und zentrifugiert. Die DNA befindet sich dabei wieder in der oberen Phase.

2.2.1.7 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden bei hohen Salzkonzentrationen in Ethanol oder Isopropanol aus wässrigen Lösungen gefällt. Dafür wurden 1/10 des Volumens der DNA-Lösung an 3M Natriumacetatlösung (pH 4,8) zur DNA-Lösung gegeben, um die Salzkonzentration zu erhöhen. Gefällt wurde mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol oder 1 Volumen Isopropanol. Nach der Fällung wurde 15min bei RT und 14000rpm

(14300 x g) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 Volumen 70% (v/v) Ethanol. Das getrocknete Sediment konnte in dem gewünschten Volumen sterilen dest. Wassers oder TE-Puffer resuspendiert werden.

2.2.1.8 Ligation

Die Verknüpfung zweier DNA-Stränge erfolgt mit Hilfe von DNA-Ligasen. Das Verhältnis zwischen Vektor und Insert hat Einfluss auf die Effektivität der Ligation und sollte im Ligationsansatz einer „blunt end“- Ligation 1:3 und bei klebrigen Enden 1:2 betragen.

Ein 20 µl Ligationsansatz enthielt:	1µl T4 DNA –Ligase (MBI Fermentas)
	2µl 10x Ligationspuffer
	xµl Vektor (ca.100ng)
	xµl Insert (ca. 300ng)
	<u>xµl</u> steriles dest. Wasser
	= 20µl

Der Ansatz wurde mindestens 1h bei 22°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches für 10min auf 65°C wurde die Ligase inaktiviert.

2.2.1.9 Entsalzen eines Ligationsansatzes für Elektroporation

Um bei der Elektroporation störende Salze aus dem Ligationsansatz zu entfernen, wurde wie folgt vorgegangen:

Der Ligationsansatz wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 50µl aufgefüllt und mit 500µl n-Butanol versetzt. Nach kräftigem Schütteln des Fällungsansatzes wurde er 15min bei Raumtemperatur und 14000rpm (14300 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5µl Wasser (bidest.) gelöst.

Für einen Elektroporationsansatz wurden die gesamten 5µl verwendet.

2.2.1.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden folgende DNA- Polymerasen mit ihren spezifischen, mitgelieferten Puffern und unter den für sie optimalen Reaktionsbedingungen (jeweils laut Herstellerinformation) für PCRs verwendet:

T4 DNA Polymerase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas

Als Vorlage (Template) für die PCR diente genomische DNA aus *Candida albicans*, Plasmid-DNA aus *E. coli* und cDNA von *C. albicans* RNA. Ein typischer PCR-Ansatz in dieser Arbeit lautete:

- 0,5-1µl Template-DNA
- 5µl 10 x PCR-Reaktionspuffer
- 4µl dNTP's (8mM, d.h. jedes 2mM)
- 1µl vorwärts Primer
- 1µl rückwärts Primer
- 0,5µl DNA- Polymerase
- 0,5-2µl MgCl₂ bzw. MgSO₄
- xµl Wasser bis zu einem Endvolumen von 50µl

Ein typisches PCR-Programm lautete:

Schritt 1) 95°C für 3min (initiale Denaturierung)

Schritt 2) 95°C für 50s (DNA-Denaturierung in jedem Zyklus)

Schritt 3) primerspezifische Annealingtemperatur für 50s

Schritt 4) DNA-Synthese bei 72°C für 50s, bzw. länger in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments, anschließend weiter bei Schritt 2, bis die gewünschte Zyklenzahl durchgelaufen war

Schritt 5) Finale Extension bei 72°C für 10min

Schritt 6) Stoppen der Reaktionen durch Abkühlung auf 4°C (Pause)

Die beste Annealingtemperatur für ein Primerpaar wurde mit einer PCR im Cycler Tgradient (Biometra) ermittelt, bei der ein Temperaturgradient für den Schritt 3 über 10 verschiedene Temperaturen verwendet wurde.

Die Synthesetemperatur und –dauer wurde anhand der Herstellerinformationen angepasst, z.B. 72°C und 2min je 1kb für die *Pfu* DNA Polymerase von MBI Fermentas.

2.2.1.11 Direkte Aufreinigung eines PCR-Produktes

Ein PCR-Produkt wurde für nachfolgende Schritte aus einem Agarosegel eluiert und somit gereinigt (s. 2.2.1.2) oder direkt aus dem PCR-Ansatz heraus mit dem gleichen Kit NucleoSpin Extract 2in1 von Macherey-Nagel gereinigt.

2.2.1.12 Klonierung eines PCR-Produktes

Nachdem ein zu klonierendes PCR-Produkt mindestens durch Gelelektrophorese, meist aber auch durch Restriktionsverdauung auf Richtigkeit nach Bandengröße getestet wurde, konnte es in einen Vektor kloniert werden. Als kommerzielle Klonierungssets wurden zum einen die Systeme: TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen), pGEM[®] -T Vector System I, pGEM[®] -T Easy Vector System I (beide von Promega) verwendet für PCR-Produkte mit einem von der DNA- Polymerase verursachten Adenosinüberhang an den Enden (TA- Klonierung). Andererseits wurde mit dem Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen) für Klonierungen von Produkten mit glatten Enden (blunt end- Klonierungen) gearbeitet. Dabei wurde jeweils nach den Vorschriften der Hersteller verfahren. Anschließend konnten durch die Primer eingefügte oder im Vektor befindliche Restriktionsschnittstellen für weitere Klonierungen genutzt werden. Sofern die Lieferung keine kompetenten *E. coli* Zellen beinhaltete, wurden selbsthergestellte (s. 2.2.2.3 und 2.2.2.5) genutzt.

In einigen wenigen Fällen wurden die durch Primer eingefügten Restriktionsschnittstellen direkt genutzt, indem das gereinigte PCR-Produkt mit den entsprechenden Enzymen verdaut, nochmals gereinigt und in einen mit den gleichen Enzymen geöffneten Zielvektor ligiert wurde. Bei blunt end PCR-Produkten wurde zum Teil auch das gereinigte Produkt in einen mit einem glatte Enden verursachenden Enzym (z.B. *Eco RV*) geöffneten Zielvektor direkt eingefügt. (s. 2.2.1.8, 2.2.2.4 und 2.2.2.6)

2.2.1.13 Expressionsanalyse mittels semiquantitativer PCR

Zum Vergleich der Expressionsstärke eines Gens wurden die Zellen unter verschiedenen gewählten Bedingungen, ihre Pellets und die RNA-Isolierung möglichst gleich behandelt. Für die cDNA-Synthese wurden gleiche RNA-Mengen eingesetzt. Bei anschließenden PCRs mit den cDNAs wurden mit Hilfe von Primern

für „house keeping“ Gene (*CaACT1*, *CaEFB1*), deren Expression unter den meisten bekannten Bedingungen gleich bleibt, die Mengenverhältnisse der cDNAs in den PCR-Ansätzen bestimmt, bei denen die PCR gleich starke Banden ergibt. Dann wurden mit dem Primerpaar des zu untersuchenden Gens PCR's mit diesen cDNA-Konzentrationen durchgeführt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte semiquantitativ nach Aufnahme der DNA-Bandenfluoreszenz der PCR-Produkte (5µl pro Geltasche von 25µl PCR-Ansatz + 6µl Stopp-Puffer) im Gel mit dem Alphamager™2000 (Biozym) und dem Multimage™Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) zunächst mit bloßem Auge, für genauere Bestimmungen wurde teilweise aber auch die AIDA image analyser 2.0 Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) benutzt. Um sicherzustellen, dass die Auswertung nicht im gesättigten Bereich, sondern in der exponentiellen Phase der PCR-Produktentstehung erfolgte, wurden die PCR's mit verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt. Die Aussage eines solchen Experimentes ist der Vergleich der Expression eines Gens unter verschiedenen Bedingungen und gleicher Expressionsstärke des gewählten „house keeping“ Gens.

2.2.1.14 Southern-Blot

Für diese Art der DNA-Analyse wurde das nicht radioaktive System von Roche verwendet, das auf einer Digoxigeninmarkierung (DIG) der Sonde und spezifischen Anti-DIG-Antikörpern beruht. Gegen letztere wurden sekundäre Antikörper mit angekoppelter alkalischer Phosphatase verwendet. Die Detektion des Signals erfolgte durch Chemilumineszenz.

Genomische DNA (20µg) von *C. albicans* wurde in einem Über-Nacht-Verdau von maximal 30µl Volumen mit 1,5µl eines gewünschten Restriktionsenzym bei dessen empfohlener Inkubationstemperatur geschnitten.

Die nachfolgenden Schritte wurden nach der Anleitung „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ (Roche Molecular Biochemicals, 1995) und den Herstellerinformationen der verwendeten Produkte durchgeführt. Die Lösungsrezepturen sind dort ebenfalls enthalten.

Die zur Detektion benötigte DIG markierte DNA-Sonde wurde mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche nach deren Durchführungsanleitung hergestellt. Größenmarker waren GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas) für die Färbung mit Ethidiumbromid, sowie DIG-DNA Molecular Weight Marker II (Roche)

und DIG-DNA Molecular Weight Marker III (Roche) für die spätere Detektion mit Antikörpern auf der Membran.

2.2.1.15 Sequenzierungsreaktion

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten in Plasmiden wurden unter Verwendung des ABI BigDye Kit (Applied Biosystems) und des Sequenzierservice des Robert Koch-Instituts durchgeführt. Ein üblicher Sequenzier-PCR Ansatz beinhaltete:

700ng Plasmid-DNA

1µl Primer (1pmol/µl Ausgangskonzentration)

2µl BigDye Premix

xµl bidest. Wasser zu einem Endvolumen von 10µl.

Der PCR-Ablauf war folgender: 96°C für 2min zu Beginn, gefolgt von 24 Zyklen bestehend aus 96°C für 30s, 55°C (oder andere Primer spezifische Annealingtemperatur) für 10s und 60°C für 4min zur Synthese, gestoppt wurde das Programm bei 4°C.

Anschließend wurde das Reaktionsprodukt in der institutseigenen Sequenziereinheit weiter bearbeitet.

2.2.1.16 Vorbereitung der Glasperlen für die RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA, aber auch zum Aufschließen der *C. albicans*-Zellen für andere Zwecke, z.B. zur Extraktion löslicher Proteine, wurden vorbehandelte, sterile Glasperlen benutzt.

Die Glasperlen (Merck, 0,25-0,3mm) wurden in einer Glasflasche mit konzentrierter HCl überschichtet über Nacht inkubiert. Am anderen Tag wurde die Säure vorsichtig abpipettiert und im Gefahrstoffmüll entsorgt. (Alle Arbeiten mit der Säure fanden unter dem Abzug statt!) Die Perlen wurden anschließend unter fließendem dest. Wasser so lange gespült, bis das abgegossene Waschwasser den gleichen pH-Wert hatte, wie das frische dest. Wasser. Dann wurden sie vorsichtig und langsam in der Mikrowelle getrocknet und anschließend im Sterilisationsschrank trocken sterilisiert.

2.2.1.17 RNA-Isolierung aus *Candida albicans*-Zellen

Zellpellets für die RNA-Isolierung wurden in 50ml Zentrifugenröhrchen (Merck) abzentrifugiert (5min, 4°C, 6000 x g) und sofort nach der Überstandabnahme in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung erfolgte bei –70°C. Zur Isolation wurden die entsprechenden Röhrchen wieder in flüssigen Stickstoff überführt, von wo sie erst zum Arbeitsbeginn auf Eis gestellt wurden. Sehr zügig wurde dann pro Röhrchen ein Volumen von ca. 2,5ml vorbehandelten Glasperlen, 5ml Roti[®]-Phenol (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zur RNA- und DNA-Isolierung von Roth) und 5ml GTC-Puffer dazugegeben und die Röhrchen für 10min auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie II von PeqLab). Zur Phasentrennung wurde bei 4°C und 14000rpm (9000 x g) für 10min zentrifugiert. Die obere Phase wurde ohne Berührung der Interphase in ein neues Röhrchen pipettiert und mit 5ml Roti[®]-Phenol nochmals ausgeschüttelt, auf die gleiche Weise zentrifugiert und dann erneut die obere Phase abgenommen, jedoch auf 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt (ca. 600µl je Gefäß). Es wurde wieder Roti[®]-Phenol (400µl) dazugegeben, geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (10min, 4°C, 14000rpm [14300 x g]). Nachdem die obere Phase in neue Reaktionsgefäße überführt worden war, wurde die RNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und das Pellet durch Zentrifugation erhalten (15min, 4°C, 14000rpm [14300 x g]). Die Nukleinsäure wurde in ca. 10µl autoklaviertem Millipore[®]-Wasser gelöst.

GTC-Puffer: 4M Guanidiniumthiocyanat (Fluka, Roth)
 2% Lauroylsarconisat
 25mM Tris-HCl pH 7,5
 10mM EDTA

2.2.1.18 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die RNA- bzw. DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der zu vermessenden Nukleinsäure mit Wasser verdünnt (meist 1:100) und die Absorption bei 260nm in einer 50µl fassenden Quarzküvette bestimmt. Wasser selbst diente als Referenz für den Nullwert. Die Konzentration (µg/ml) errechnete sich dann aus dem Faktor 50 im Falle von DNA und aus dem

Faktor 40 im Falle von RNA des ermittelten Absorptionswertes. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte damit die Ausgangskonzentration bestimmt werden.

2.2.1.19 RNA-Gelelektrophorese

Die Konzentration und Güte der RNA wurde auf einem denaturierenden Gel getestet. Aufgrund des Formaldehydgehaltes wurden alle Arbeiten hierzu unter dem Abzug durchgeführt. Für ein 200ml Formaldehydgel mit 1,5% Agarose wurden 3g Agarose mit 146ml bidest. Wasser aufgekocht und nach kurzem Abkühlen 20ml 10 x MOPS-Puffer und 34ml Formaldehyd dazugegeben, vermischt und das Gel gegossen. Für die Probe wurde die gewünschte RNA-Menge in einem frischen Reaktionsgefäß mit 20µl oder 2-3 Volumen Ladepuffer versetzt, gemixt, für 10min bei 65°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis gelagert bis zum Beladen des Gels. Laufpuffer war 1 x MOPS-Puffer. Durch das Ethidiumbromid im Ladepuffer konnte die RNA im UV-Licht unter Verwendung des Alphamager™2000 (Biozym) und des MultiImage™Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) sichtbar gemacht werden.

10 x MOPS-Puffer	Ladepuffer
200mM MOPS (41,8g/l)	250µl 100% Formamid
50mM Natriumacetat	83µl 37% Formaldehyd
10mM EDTA	50µl 10 x MOPS-Puffer
pH mit 2M NaOH auf 7,0 einstellen,	50µl 100% Glycerol
autoklavieren,	10µl 2,5% Bromphenolblaulösung
vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahren	57µl Wasser
	1µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) (Sigma)
	(immer frisch ansetzen oder kurzzeitig bei -20°C lagern)

2.2.1.20 Northern-Blot

Mittels Northern-Blot lassen sich spezifische mRNA Transkripte auf Vorhandensein und Menge überprüfen. Dazu wurde 10µg Gesamt-RNA pro Geltasche in einem denaturierenden Gel aufgetrennt. Die RNA wurde dann aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N –Nylonmembran, Roche) transferiert. Dazu wurde das Gel erst 2 x 15min in 20 x SSC equilibriert und anschließend ein Kapillarblot aufgebaut, der für den Transfer über Nacht sorgte. Danach entsprach der Ablauf des Northern-Blots dem des Southern-Blots (s. 2.2.1.14), ebenso die DNA-Sondenherstellung. Nach der Fixierung der RNA an die Membran ist eine Lagerung der eingeschweißten Membran bei 2-8°C möglich, ebenso nach der Detektion. Sollte eine Membran mit verschiedenen Sonden nacheinander getestet werden, konnte die vorhergehende Sonde durch mehrmaliges spülen der Membran mit kochender 0,1% SDS Lösung entfernt werden. Anschließend wurde mit dem Prähybridisierungsschritt fortgefahren.

2.2.1.21 cDNA-Synthese

Hierfür wurde nur RNA verwendet, deren Konzentration und Güte sowohl photometrisch, als auch auf einem denaturierenden RNA-Gel (s. 2.2.1.19) getestet wurde. Die cDNA-Synthese beinhaltet zwei Reaktionen, den DNase-Verdau, um die RNA von der mitisolierten genomischen DNA zu befreien, und die reverse Transkription der RNA in cDNA. Um den vollständigen Verdau der in der RNA enthaltenen DNA zu ermöglichen, wurde versucht, durch Lithiumchloridfällung (s. 2.2.1.13) die RNA von großen Mengen DNA zu reinigen, bevor mit der cDNA-Synthese begonnen wurde. Zudem wurden mehrere Kontrollen durchgeführt. So wurde der DNase-Verdau mindestens als doppelter Ansatz ausgeführt, um davon 2 Ansätze für die reverse Transkription, einen mit und einen ohne reverse Transkriptase, pipettieren zu können. Bei späteren PCRs sollten aus letzterem Ansatz nie Banden entstehen. Desweiteren wurde auch mit 1µl des DNase-Verdaus eine PCR-Reaktion mit Primern für *CaEFB1* oder *CaACT1* und vielen Zyklen durchgeführt. Dabei auftretende Produkte zeigen ebenfalls noch vorhandene DNA an. Die Primer für das „house keeping“ Gen *CaEFB1* waren zusätzlich so gewählt, dass sie rechts und links des Introns lagen und folglich von genomischer DNA ein

größeres Produkt ergaben als von cDNA. Nur bei ausgeschlossener Verunreinigung mit genomischer DNA konnte mit der cDNA die Expression eines Gens und deren Stärke nachgewiesen werden.

Schritt 1) DNase-Verdau

Der doppelte Reaktionsansatz wurde in 250µl-Reaktionsgefäße pipettiert für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1µl STOP-Puffer (mit DNase mitgeliefert) je 10µl Reaktion und eine Inkubation bei 65°C für 15min gestoppt.

Einfacher Reaktionsansatz: x µl RNA (1-2µg)
 y µl bidest. Wasser
 1µl RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
 1µl 10 x RQ1 DNase-Puffer (Promega)
 1µl RNase OUT (Invitrogen) RNase Inhibitor
 = 10µl Endvolumen

Schritt 2) Reverse Transkription

11µl DNase behandelte RNA wurde mit 1µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (500µg/ml von Invitrogen) in ein 250µl-Reaktionsgefäß gegeben und für 10min bei 70°C denaturiert.

Auf Eis bzw. bei 4°C wurden dann folgende Substanzen dazupipettiert:

4µl 5 x Erst-Strang-Puffer (Invitrogen)
2µl 0,1M Dithiothreitol (DTT von Invitrogen)
1µl 10mM dNTP's (MBI Fermentas)
1µl RNase OUT (40U/µl von Invitrogen)

Nach einer 2minütigen Inkubation bei 42°C wurde die Superscript II Reverse Transkriptase (1µl mit 20U/µl von Invitrogen) in den Reaktionsansatz gegeben, wonach die Reaktion 1h bei 42°C ablief. Gestoppt wurde diese Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 15min. Die Lagerung der cDNA erfolgte für kürzere Zeiträume bei 4°C, für längere bei -20°C.

2.2.1.22 Microarray

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Microarrays verglichen die mRNA zweier Bedingungen, nachdem davon cDNA synthetisiert worden war und diese mit jeweils einem anderen Farbstoff markiert wurde. Verwendet wurden die Arrays der Firma Eurogentec mit ca. 300bp von 6039 ORF des *Candida albicans* Stammes SC5314 in Duplikaten darauf.

1) Lithiumchloridfällung der RNA

Nach dem oben bereits erwähnten Protokoll (s. 2.2.1.17) wurde totale RNA isoliert, die noch durch mitgefällte DNA verunreinigt war und mittels nachfolgender Fällung davon größtenteils befreit werden sollte. Die gelöste RNA wurde mit autoklaviertem bidest. Wasser auf ein Volumen von 500µl aufgefüllt und mit 500µl Lithiumchloridpuffer versetzt, gemischt und über Nacht zur Fällung der RNA bei minus 20°C gelagert. Am anderen Tag wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm (21000 x g) für 45min pelletiert und das Pellet 2mal mit 70°C Ethanol und nur 10min Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde restlos abgenommen und die RNA in autoklaviertem bidest. Wasser (ca. 30µl) gelöst. Vor weiteren Schritten wurde von der so erhaltenen RNA die Konzentration photometrisch und auf einem denaturierenden Gel bestimmt.

Lithiumchloridpuffer: 20ml 4M Lithiumchlorid
 + 4µl 1M Tris-HCl-Puffer pH 7,4
 + 4µl 0,5M EDTA

2) Präparation und Reinigung von markierter cDNA

Zu 20-50µg RNA (max. 20µl) wurden in einem 250µl Reaktionsgefäß 2µg Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (= 4µl von 500µg/ml, Invitrogen) pipettiert und das Volumen gegebenenfalls mit bidest. Wasser auf 24µl aufgefüllt. Bei 70°C erfolgte für 10min die Denaturierung, wonach das Gefäß sofort auf Eis gestellt wurde. Dann wurden 30µl des Markierungsmixes und 1µl RNase OUT (40U/µl von Invitrogen) dazupipettiert, sowie in eine der zu vergleichenden Proben 3µl Cy3 dUTP (Amersham), in die andere 3µl Cy5 dUTP (Amersham) und am Ende wieder in beide 2µl Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) gegeben. Von diesem Zeitpunkt an mussten die

Reaktionsgefäße wegen der Lichtempfindlichkeit der Cy-Farbstoffe verdunkelt transportiert und benutzt werden. Nachdem die Komponenten gemischt und durch kurzes Abzentrifugieren wieder auf dem Gefäßboden gesammelt worden waren, wurden sie 2h bei 42°C inkubiert für die Reaktion der reversen Transkriptase. Nach 1h dieser Reaktionszeit wurde nochmals je 1µl Superscript II Reverse Transkriptase zugefügt. Die Zugabe von 3µl 20mM EDTA stoppte die Reaktion und mit 3µl 500mM NaOH und einer Inkubation bei 70°C für 10min wurde die RNA degradiert. 3µl 500mM HCl neutralisierten den Reaktionsansatz wieder. Mit Hilfe der PCR-Produkt-Reinigungsfunktion des NucleoSpin Extract 2in1 Kit von Macherey-Nagel wurden die Proben durch Elution mit 2 x 50µl sterilem bidest. Wasser von Enzymen und Salzen gereinigt. 6µl jeder Probe wurden auf ein 1%iges TBE-Agarosegel aufgetragen und nach Elektrophorese mit einem Phospho Imager (Amersham Bioscience) bei 633nm die Cy5-markierte Probe sichtbar gemacht. Sie sollte dabei einen Schmier der cDNA von ca. 5kb bis 100bp zeigen. Zum Schluss wurden die beiden Proben zusammengegeben und mit Microcon-Säulchen (Millipore) auf ein Volumen von 27µl eingengt, sofort weiterbenutzt zur Hybridisierung des Microarrays oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -70°C gelagert.

Für 300µl Markierungsmix 110,4µl steriles bidest. Wasser, 120µl 5 x Erst-Strang-Puffer der reversen Transkriptase (Invitrogen), 60µl 5mM DTT (Invitrogen), 3µl von je 100mM dATP, dCTP, dGTP und 0,6µl 100mM dTTP (alle von MBI Fermentas) zusammenpipettieren, mischen und bei -20°C lagern.

3) Hybridisierung des Microarray- Glasobjektträgers

Zur Vorbereitung wurde der Glasobjektträger 45min bei 42°C in einem Gefäß stehend mit Prähybridisierungsmix inkubiert, 5mal kräftig in frischem bidest. Wasser und einmal in Isopropanol gespült. Mit Druckluft wurde er getrocknet. 27µl Hybridisierungsmix und 27µl Cy-markierter cDNA-Mix wurden vermischt und 3min bei 95°C denaturiert. Zum Sammeln der Mischung wurde kurz abzentrifugiert im Anschluss. Auf den Glasobjektträger wurde ein 22mm x 50mm Deckgläschen über den „bedruckten“ Bereich gelegt, unter das langsam von einer Ecke die denaturierte Probe mit Hilfe einer Pipette gegeben wurde. Das ganze wurde dann in eine Microarrayhybridisierungskammer gelegt und im 42°C warmen Wasserbad über Nacht (16h) zur Hybridisierung inkubiert. Am anderen Tag wurde der Objektträger

unter leichter Bewegung bei RT 15min in 2 x SSC+ 1% SDS, 8min in 1 x SSC + 0,2% SDS und 5min in 0,1 x SSC + 0,2% SDS gewaschen. Abschließend wurde er in bidest. Wasser gespült und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen (Merck) 5min bei RT und 1500rpm (960 x g) zum Entfernen der restlichen Flüssigkeit zentrifugiert. Darauf wurde er mit dem Axon 4000B Scanner eingelesen. Zur Auswertung wurde folgende Software genutzt: GeneSpring® 6.0, GenePix 4.1.

Prähybridisierungsmix	Hybridisierungsmix
5 x SSC	50% Formamid
0,1% SDS	10 x SSC
1% (w/v) BSA (Sigma)	0,2% SDS

2.2.2 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (*E. coli*)

2.2.2.1 Medien für die Anzucht von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung	Komponente bezogen von
LB (flüssig)	LB Broth, Fertigmedium	BD
LB (fest)	LB Agar, Fertigmedium	BD
SOC (flüssig)	950ml Wasser + 20g Trypton +5g Hefe-Extrakt 0,5g NaCl lösen und anschließend + 10ml 250mM KCl-Lösung mit 5N NaOH pH 7,0 einstellen und nach dem Autoklavieren + 5ml 2M MgCl ₂ - Lösung und 20ml 1M Glukoselösung (sterilfiltriert)	BD BD Roth Merck Merck Merck Merck

2.2.2.2 Die Selektion der Bakterien mittels Antibiotika

Abhängig vom Resistenzgen des entsprechenden Plasmides wurden die transformierten Bakterien im Rahmen dieser Arbeit mit 3 verschiedenen, im folgenden aufgelisteten Antibiotika selektiert und im Falle eines positiven Klones

ständig unter diesem Selektionsdruck kultiviert, um gegebenenfalls den Verlust des Plasmides zu bemerken.

Name (Firma)	Stoffklasse	Wirkung	Stammlösung in 50% Ethanol	Endkonzentration
Ampicillin (Sigma)	Penicillin	Hemmung der bakt. Zellwandbiosynthese	100mg/ml	100 mg/l
Kanamycin (Sigma)	Amino- glykosid	Bindung ans Ribosom	50 mg/ml	50 mg/l
Tetracyclin (Sigma)	Tetracyclin	Hemmung der 30S ribosomalen UE	10 mg/ml	10 mg/l

2.2.2.3 Herstellen kompetenter Zellen von *E. coli* für die Hitzeschocktransformation

(nach Hanahan, 1985)

Eine 3ml Über-Nacht-Kultur in LB-Medium (bei 37°C schüttelnd) von einer *E. coli* Einzelkolonie wurde 1:100 in ca. 300ml LB-Medium angeimpft und 2-3h bei 37°C schüttelnd (160U/min) kultiviert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis: Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 4000rpm (4080 x g) für 5min bei 4°C pelletiert. Die gleiche Zentrifugation wiederholte sich nach der Resuspension des Pellets in ¹/₁₀ Ausgangsvolumen in eiskaltem Puffer TFB I. Es folgte die Resuspension des Pellets in nur noch ¹/₂₀ des Ausgangsvolumens mit eiskaltem Puffer TFB II und die Aliquotierung zu 100µl in Reaktionsgefäße auf einem Ethanol-Trockeneis-Bad. Lagerung bei -70°C.

TFB I	TFB II
30mM Kaliumacetat 50mM MnCl ₂ x 2 H ₂ O 100mM RbCl 10mM CaCl ₂ 15% Glycerol Der pH- Wert des Puffers wurde mit verdünnter Essigsäure auf 5,8 eingestellt.	10mM MOPS 75mM CaCl ₂ 10mM RbCl 15% Glycerol Der pH- Wert des Puffers wurde mit KOH auf 7 eingestellt.

2.2.2.4 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

(nach Hanahan, 1983)

Zu den aufgetauten 100µl kompetenten Zellen wurden 10ng bis 1µg Plasmid-DNA oder bis zu max. 10µl eines Ligationsansatzes gegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Nach einer 30min Inkubation auf Eis erfolgte ein 30s langer Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad. 1-2min kühlten die Zellen dann wiederum auf Eis ab, bevor 1ml LB-Medium hinzupipettiert wurde und sie sich für 1h im 37°C warmen Schüttler (180rpm) regenerierten und wachsen konnten. Anschließend wurden etwa 50µl der Kultur auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C zum Heranwachsen von Einzelkolonien inkubiert.

2.2.2.5 Herstellen kompetenter Zellen für die Elektroporation

(nach dem Handbuch des verwendeten Elektroporators, GenePulserSystem EquiBio von BIORAD)

Von einer nicht stationären *E. coli* – Kultur wurden 4ml in 200ml frisches LB-Medium überführt wurden. Bei 37°C wurde die neue Kultur schüttelnd kultiviert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde auf 50ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) verteilt und 5min bei 4°C und 4000 rpm (4080 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25ml sterilem, eiskaltem Millipore®-Wasser resuspendiert und für 10min bei 4°C und 5000rpm (5100 x g) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das so entstandene Pellet wurde in 400µl steriler 10%iger Glycerinlösung (aus 100%igem, nicht 87%igem, Glycerin in Millipore®-Wasser) resuspendiert, sofort verwendet oder in 100µl Aliquots sehr zügig in flüssigem N₂ eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei –70 °C gelagert.

2.2.2.6 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

(nach dem Handbuch des verwendeten Elektroporators, GenePulserSystem EquiBio von BIORAD)

Zu 40µl kompetenter Zellen auf Eis wurden 1-5µl DNA (entsalzter Ligationsansatz) gegeben. Bei der verwendeten 2 mm Elektroporationsküvette lauteten die Werte des verwendeten Programms folgendermaßen: Spannung 2500V, Elektrodenkapazität

25µF und Ableitungswiderstand 201R. Die Zell- DNA- Mischung wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und der Stromimpuls ausgelöst. Nun wurde sofort 1ml SOC-Medium in die Küvette pipettiert, die so aufgenommenen Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden etwa 50µl Aliquots des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bis zur Entstehung von Bakterienkolonien inkubiert.

2.2.2.7 Minipräparation von Plasmid- DNA aus *E. coli*

(nach Sambrook *et al.* 1989)

Aus einer gepickten Einzelkolonie wurde eine 3-4ml Über-Nacht-Kultur bei 37°C herangezogen. 1,5ml dieser Kultur, überführt in ein Reaktionsgefäß, wurde bei RT 10s bei 14000rpm (14300 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100µl eiskaltem Mix I resuspendiert und 5min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200µl von Mix II und 150µl Mix III wurde ebenfalls 5 min inkubiert. Zur Trennung des Niederschlags vom Überstand mit der Plasmid-DNA wurde 10min bei 14000rpm (14300 x g) und RT zentrifugiert. Aus dem in ein neues Reaktionsgefäß pipettierten Überstand wurden die Nukleinsäuren mit 1 Volumen (500µl) Isopropanol (5min, RT) und einer 15min- Zentrifugation bei 14000rpm (14300 x g) und 4°C gefällt. Das Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen. Dann wurde nochmals zentrifugiert (5min, 14000rpm, RT) und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet in 50µl TE-Puffer + 1µl RNAase A-Lösung resuspendiert.

RNAase A: Für eine Stammlösung der Ribonuklease A (Sigma) wurden 10mg/ml in 0,01M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst und die Lösung 15min bei 100°C erhitzt, um eventuelle Verunreinigungen mit DNAasen zu zerstören. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit 0,1 Volumen 1M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) eingestellt. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. → RNAase fällt in konzentrierten Lösungen aus, wenn sie bei neutralem pH-Wert auf 100 °C erhitzt wird. (Sambrook *et al.* 1989)

Mix I	Mix II	Mix III	TE-Puffer
25 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 10 mM EDTA, pH 8 50 mM Glukose	0,2 N NaOH 1% SDS	5 M Kaliumacetat mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen	10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8 1 mM EDTA, pH 8 endgültiger pH 8

2.2.2.8 Maxipräparation von Plasmid- DNA aus *E. coli*

Das NUCLEOBOND® AX 100 oder 500 Kit von Macherey-Nagel wurde verwendet, um größere Mengen Plasmid- DNA aus *E. coli* mit entsprechend größeren Ausgangskulturen zu isolieren. Das Prinzip und der Ablauf entsprechen annähernd dem bei der Minipräparation von Plasmid- DNA aus *E. coli*. Die Präparation wurde nach der Herstellerbeschreibung durchgeführt.

2.2.2.9 Koloniehybridisierung

Um nach der Transformation von *E. coli* mit einem neu konstruierten Plasmid mehr Klone auf das richtige Plasmid testen zu können als mit der Minipräparation von Plasmid- DNA, wurde die Koloniehybridisierung verwendet. Sie entspricht in groben Zügen einer Southern-Blot Analyse, nur geht man hierbei nicht von isolierter DNA aus, sondern von ganzen Zellen, deren Inhalt inkl. DNA nach Plasmolyse auf einer Membran fixiert und für die Sonde zugänglich gemacht wird.

Dazu wurden Bakterienplatten mit nicht zu dicht gewachsenen Kolonien oder in Ausstrichen vereinzelte Kolonien verwendet. Positiv geladene Nylonmembranen (Roche) in der Größe der verwendeten Petrischalen wurden markiert, um die Lage auf der Platte und die DNA-Seite später nachvollziehen zu können. Die Membranen wurden auf die bewachsenen Platten gelegt. Danach wurden die Membranen mit den anheftenden Kolonien nach oben auf eine frische Platte gelegt und sowohl die bewachsenen Originalplatten, als auch die „Membran“-Platten bei 37°C inkubiert, erstere bis die *E. coli* wieder gut gewachsen waren und letztere ca. 1 ½ -3h. Nach der Inkubation bei 37°C wurden die Membranen nacheinander mit der Bakterien- bzw. DNA-Seite nach oben jeweils 10min auf mit Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung bzw. 2 x SSC befeuchtetes Whatman 3MM-Papier gelegt. Die DNA wurde mit der Autocrosslinker-Funktion des 1200mJ Stratalinker (Stratagene) auf den nur leicht feuchten Membranen fixiert. Danach wurde dem Southern-Blot Protokoll der Anleitung „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“ (Roche Molecular Biochemicals, 1995) (s. 2.2.1.14) gefolgt, beginnend mit der Prähybridisierung. Während der u. a. die Bakterienzellreste und Proteine abgespült werden, wodurch sich der in Koloniehybridisierungen übliche Schritt des Proteinase K - Verdaus erübrigt. Teilweise wurde die Detektion der mit DIG markierter Sonde hybridisierten Klone nicht mit Chemilumineszenz sondern colorimetrisch mit einer

Farbreaktion mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid, Roche) und BCIP 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, 4-Toluidin-Salz, Roche) vorgenommen. Die Verwendung erfolgte nach Produktbeilage.

Als positiv detektierte Klone wurden dann weiteren Tests unterzogen, z.B. der Minipräparation von Plasmid- DNA aus *E. coli* und der näheren Untersuchung des Plasmids.

2.2.2.10 Glycerolstocks

Zur Lagerung sowohl von Bakterien, als auch von *C. albicans* für einen längeren Zeitraum wurden diese folgendermaßen eingefroren. Die so genannten „Glycerolstocks“ wurden aus Flüssigkulturen (2-3ml) hergestellt. 1,5ml der jeweiligen Kultur wurden abzentrifugiert (Bakterien: 10s bei 14000rpm/ 14300 x g, *C. albicans*: 5min bei 5000rpm/ 5100 x g) und die Zellen in 1ml einer 1:1 Lösung aus Glycerol (87%iges) und dem jeweiligen Anzuchtmedium resuspendiert. Vor der Lagerung bei –20 oder –80°C wurden die Glycerolstocks ca. 1h auf Eis inkubiert.

2.2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden (*C. albicans*)

2.2.3.1 Anzucht und Bestimmung der Zellzahl von *Candida albicans*

Die Anzucht von *Candida albicans* Kulturen erfolgte bei 37°C oder 30°C, was jeweils bei den entsprechenden Experimenten angegeben wurde, ebenso wie Stresstemperaturen. Verwendete Medien für die Flüssig- und Plattenkultur werden im folgenden Abschnitt beschrieben und sind ebenfalls bei jedem Experiment angegeben. Flüssigkulturen wurden bei 160rpm im Inkubator geschüttelt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer Flüssigkultur 1:10 in Wasser verdünnt und unter dem Mikroskop in der Fuchs-Rosenthal Kammer (Hämocytometer von Roth) nach deren Bedienungsanleitung ausgezählt und die Zellzahl/ml unter Beachtung der Verdünnung berechnet.

2.2.3.2 Medien für die Anzucht und die Phänotypisierung von *Candida albicans*

Medium	Zusammensetzung	Komponente bezogen von
YPD (Vollmedium)	2% (w/v) Glukose 1% (w/v) BactoPepton 1% (w/v) Hefe-Extrakt 2% (w/v) Agar (Flüssigmedium ohne Agar)	Merck BD (Difco) BD (Difco) BD (Difco)
SD (Minimalmedium)	2% (w/v) Glukose 1,7g/l YNB ohne Amino- säuren und Ammonium-sulfat (Yeast Nitrogen Base) 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (w/v) Select-Agar (Flüssigmedium ohne Agar)	Merck BD Roth BD
2% Sabouraud-Glukose- Medium	1% (w/v) BactoPepton 2% (w/v) Glukose	BD Merck
Sabouraud-Medium	10g/l Neopepton 40g/l Glukose 58,44g/l NaCl 0,74g/l CaCl ₂ pH 6,5 (15g/l Agar für Festmedium)	BD Merck Roth Merck BD
Sabouraud-Eigelb-Agar (Price <i>et al.</i> 1982)	100ml steriles Eigelb (Eier 3h in 70% Ethanol legen, Eigelb mit 100ml 0,9% (w/v) NaCl und bei 50°C in 1l Sabouraud-Medium rühren)	
Spider- Medium	1% (w/v) Mannitol 1% (w/v) nutrient broth 0,2% (w/v) K ₂ HPO ₄ 1,35% (w/v) Agar (Flüssigmedium ohne Agar)	Merck BD Merck BD
SLAD-Medium	6,7g/l YNB ohne Amino- säuren und Ammonium-sulfat 0,05mM (NH ₄) ₂ SO ₄	BD Roth

Glycerol-Acetat-Medium (SGlycAc)	2% (w/v) Kaliumacetat 3% (v/v) Glycerol 1,7g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (w/v) Agar (Flüssigmedium ohne Agar)	Merck Roth BD Roth BD
Glycerol-Medium (SGlyc)	2% (w/v) Glycerol 1,7g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	Roth BD Roth
M199-Medium (Staab <i>et al.</i> 1999)	pH 6,8 Ansetzen nach Beipackzettel	Sigma
Lee's Medium (Lee <i>et al.</i> 1975)	definiertes, synthetisches Medium mit pH 4,5 zum Wachstum in Hefeform oder pH 6,5 zur Hypheninduktion	Komponenten von Merck und Roth
5% FCS-Medium	5% (v/v) FCS fötales Kalbsserum für Festmedium 2% (w/v) Agar (Flüssigmedium ohne Agar)	Sigma BD
YCB-BSA-Medium	1,17% YCB (= yeast carbon base) (enthält 1% Glukose) 1% Glukose (Endkonz. 2%) beides autoklavieren anschließend 0,5% BSA (hitzeempfindlich) von einer 10%igen sterilfiltrierten Stammlösung dazugeben	BD Merck Sigma
Blut-Agar	1000ml Bouillon 15g Agar autoklavieren und bei 55°C 50ml Schüttelblut vom Schaf dazugeben <u>für 5l Bouillon:</u> 15g NaCl	BD Roth

	15g Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O 50g Pepton 70g Lab-Lemco Puder (Fleischextrakt) pH 7,3	Merck Merck Oxoid
CAA-Medium (Leuker <i>et al.</i> 1997; Stoldt <i>et al.</i> 1997)	1,7g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (w/v) Select-Agar 2% (w/v) Casaminoacids	BD Roth BD BD
B-Medium (Leuker <i>et al.</i> 1997; Stoldt <i>et al.</i> 1997)	1,7g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat 5g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% (w/v) Select-Agar 2% (w/v) Natriumsuccinat	BD Roth BD Sigma
ArgD-Medium (Bechet <i>et al.</i> 1970)	2% (w/v) Glukose 1,7g/l YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat 1g/l Arginin 2% (w/v) Select-Agar	Merck BD Roth BD

Die Inhibition der Transkription über den *MET3* –Promotor erfolgte durch Einsatz von 2,5mM Methionin (Merck) und 2,5mM Cystein (Merck) im entsprechenden Medium.

Für die Hypheninduktion wurde Spider-Medium und M199-Medium verwendet oder die Induktion durch Zugabe von fötalem Kalbsserum (FCS) zu YPD-Medium bzw. Wasser genutzt. Mit dem Lee's Medium erfolgte die Hypheninduktion durch pH- und Temperaturwechsel (Lee *et al.* 1975).

2.2.3.3 Auszählen von Hyphen- und Hefezellen unter dem Mikroskop

Das mikroskopische Auszählen der *Candida*-Zellen erfolgte meist bei 40facher Vergrößerung. Zum Vereinzeln von verklumpten Hyphenzellen wurde die Kultur oder ein Aliquot dieser abzentrifugiert bei RT und 5000rpm (5100 x g) für 5min und in einer Lösung von 10% SDS und 10% Formaldehyd resuspendiert, danach im Ultraschallbad behandelt bis die Klumpen verschwanden.

Zu Beachten ist dabei, dass im Falle von Pseudomycel die abzweigenden Seitenzellen ebenfalls abgetrennt werden können und den Hefeanteil in der Kultur verfälschen. Als Hefezellen wurden einzelne Hefezellen. In kleinen Gruppen aneinanderheftende Hefezellen wurden alle einzeln gezählt, sofern die Tochterzellen mindestens halb so groß waren wie die Mutterzelle. Hyphen und Pseudohyphen wurden als solche gezählt, unabhängig von der Länge und der Anzahl der Verzweigungen. Die am Beginn einer langgestreckten Mycelzelle sitzende Hefezelle wurde dabei nicht einzeln als Hefezelle mitgezählt.

Jeder Wert wurde durch dreifache Wiederholung des Experimentes bzw. durch drei Zählproben abgesichert.

2.2.3.4 Gezielte Mutagenese von *Candida albicans*

Es gibt mittlerweile mehrere Möglichkeiten, *C. albicans* genetisch zu manipulieren und ein Gen auszuschalten. Für die hier beschriebenen Disruptionsmutanten wurde das Markergen *CaURA3* in der mehrmals nutzbaren Disruptionskassette in pMB7 verwendet (Fonzi und Irwin 1993). Transformiert wurde der *URA3*-auxotrophe *Candida* Stamm CAI-4, der anschließend auf SD-Medium selektiert wird. Von diesen heterozygoten Mutanten werden durch die FOA-Behandlung Klone selektiert, die durch intrachromosomale Rekombination der beiden *hisG* Sequenzen das *URA3* Gen verloren haben. Alle Schritte wurden mittels PCR und Southern-Blot auf Richtigkeit überprüft. Neben einer solchen genspezifischen Disruptionskassette in einem Plasmid wurde auch die Methode von Wilson *et al.* 1999 angewandt. Dabei wird die Disruptionskassette während einer PCR regeneriert und amplifiziert. Sie ist nicht wieder verwertbar. Nähere Informationen und weitere Strategien für Mutationen in *C. albicans* sind z. B. beschrieben und zusammengefasst bei De Backer *et al.* (2000) und Berman *et al.* (2002).

2.2.3.5 Transformation von *Candida albicans*

In dieser Arbeit wurden nachfolgende Transformationsprotokolle genutzt. Dabei handelt es sich um zwei Varianten der Transformation nach Lithiumacetatbehandlung und um ein Elektroporationsprotokoll.

1) Transformation durch Lithiumacetatbehandlung I

(nach Sanglard *et al.* 1996)

Von einer Über-Nacht-Kultur in YPD-Medium wurde 1:100 eine frische 50ml YPD-Flüssigkultur angeimpft und schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 kultiviert. Die Zellen wurde abzentrifugiert (5min, 4°C, 5300 x g) und 2mal mit 10ml TE-Puffer gewaschen bei gleicher Zentrifugation, anschließend 1mal mit 10ml TE-LiAc und danach in nur 200µl TE-LiAc resuspendiert, sowie kurz auf Eis gelagert. Aus den 200µl wurden Aliquots von 50µl in Reaktionsgefäße pipettiert und jeweils 300µl PLATE-Puffer, 5µl Yeast Maker Carrier DNA (Clontech) und max. 10µl mit ca. 4µg DNA (linearisiertes Disruptionsfragment oder Plasmid) dazugegeben. Der durchmischte Ansatz wurde zuerst 30min bei 30°C und dann 20min bei 42°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren auf SD-Platten wurden die Zellen durch Zentrifugation bei RT und 600 x g für 5min sedimentiert und in 200µl TE-Puffer resuspendiert. Die Platten wurden 3-4d bei 30°C kultiviert.

TE-Puffer	TE-LiAc	PLATE-Puffer
10mM Tris-HCl-Puffer 1mM EDTA pH 7,5	TE-Puffer pH 7,5 mit 0,1M Lithiumacetat	TE-LiAc mit 40% (w/v) PEG 4000

2) Transformation durch Lithiumacetatbehandlung II

(in Abwandlung nach Sanglard, persönliche Kommunikation)

Hierbei wurden 200µl Zellen aus der stationären Phase verwendet, d.h. aus einer 1-5d alten Flüssigkultur, und abzentrifugiert (5min, RT, 5000rpm/ 5100 x g). Sie wurden in 100µl OSB-Mix resuspendiert und die Disruptionskassetten-DNA (ca. 4µg) dazupipettiert. Nach dem Mischen des ganzen Ansatzes erfolgte eine Inkubation bei 43,5°C für 30-60min, wonach die Zellen sofort auf SD-Platten ausplattiert und wie oben erwähnt bei 30°C inkubiert wurden.

OSB-Mix: 0,2ml 1M Lithiumacetat
 0,8ml 50% (w/v) PEG 8000
 15mg Dithiotreitol (DTT) (z.B. 25µ von 4M Stocklösung)
 25µl Yeast Maker Carrier DNA (10mg/ml von Clontech)
 Den Mix frisch vor der Transformation zubereiten.

3) Transformation durch Elektroporation

(nach De Backer *et al.* 1999)

Von einer Vorkultur in YPD wurde 1:1000 eine 100ml YPD-Kultur neu angeimpft und über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie bei einer OD₆₀₀ von ca. 1,3 (max. 1,6-2,2) abzentrifugiert (10min, RT, 3500rpm/ 3600 x g) und in 25ml TE-Puffer pH 7,5 mit 100mM Lithiumacetat und 10mM Dithiotreitol (DTT) resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 30°C für 1h wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert (5min, 4°C, 3500rpm/ 3600 x g), in 25ml eiskaltem, sterilem, bidest. Wasser resuspendiert, auf die gleiche Weise zentrifugiert und in 10ml 1M eiskaltem Sorbitol resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in nur 100µl 1M eiskaltem Sorbitol aufgenommen und bis zur Elektroporation auf Eis gelassen. Für die Transformation wurden 40µl Zellen mit 1µg für die Elektroporation gereinigte DNA (max. 2µl und entsalzt wie s. 2.2.1.9) in eine vorgekühlte 0,2cm Elektroporationsküvette (Biozym) gegeben. Der Elektropuls wurde am verwendeten EquiBio Elektroporator bei folgenden Einstellungen gegeben: 1,5kV Spannung, 25µF Elektrodenkapazität, 201Ω Ableitungswiderstand und 1 Puls. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1ml eiskaltem 1M Sorbitol aufgenommen, auf SD-Platten mit 1M Sorbitol ausplattiert und bei 30°C für 3-5d inkubiert.

2.2.3.6 FOA-Behandlung von *Candida albicans* Transformanden

Bei dieser Behandlung werden Klone selektiert, die durch *cis*- Rekombination der beiden *hisG* Gene der Disruptionskassette das *URA3* Gen und eine *hisG* Kopie verloren haben, weil *URA3*⁺ Klone auf Medium mit 5-Fluor-uracil (FOA) ein giftiges Intermediat bilden. Für die Transformation der so erhaltenen *URA3*⁻ Klone konnte wiederum das *URA3* Gen als Selektionsmarker verwendet werden.

Vorgehensweise:

Die positiv getesteten *URA3*⁺ Klone wurden so auf SD-Platten ausgestrichen, dass Einzelkolonien wuchsen. Eine einzelne Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 1ml sterilem Wasser resuspendiert. 10µl dieser Zellsuspension wurden mit 90µl sterilem Wasser verdünnt und auf einer SD-FOA-Uridin-Platte ausplattiert. Die nach einer Inkubation von 3-4 Tagen bei 30°C gewachsenen Kolonien wurden einzeln auf YPD-Platten ausgestrichen und ihre genomische DNA im Southern-Blot analysiert.

Herstellung von ca. 5 SD-FOA-Uridine-Platten:

- 1) 0,1g FOA und 2g Glukose wurden in 50ml Wasser auf etwa 55°C erwärmt zum Lösen und dann sterilfiltriert.
 - 2) 0,67g YNB (ohne Aminosäuren) und 2g Agar wurden mit 50ml Wasser autoklaviert.
 - 3) Bei ca. 60°C wurden die Ansätze aus 1) und 2) zusammengegeben, 168µl der Uridin-Stocklösung dazupipettiert und die Platten gegossen.
- Die Uridin-Stocklösung enthielt 15mg/ ml in Wasser und ist bei 4°C lagerbar.

2.2.3.7 Minipräparation genomischer DNA aus *Candida albicans*

Der gewünschte Klon wird von einer Einzelkolonie in einer 2-3ml Über-Nacht-Kultur bei 37°C in YPD-Medium angezogen. Am anderen Tag werden 1,5ml in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert (5min, RT, 5000rpm/ 5100 x g). Das Zellpellet wird in 200µl Lösung 1 resuspendiert und 30-90min bei 37°C inkubiert, um durch enzymatischen Zellwandabbau Protoplasten zu generieren. Diese werden ebenfalls durch Zentrifugation sedimentiert (5min, RT, 5000rpm/ 5100 x g) und dann in 250µl Lösung 2 resuspendiert. Die Inkubation erfolgte nun bei 70°C für 30-90min, um die Protoplasten aufzuschließen. Anschließend wurden mit 50µl 5M Kaliumacetat die Proteine gefällt und bei 13000rpm (13400 x g) und RT für 10min pelletiert. Aus dem Überstand wurde mit 1 Volumen Isopropanol die Nukleinsäuren gefällt. Die Zentrifugation dazu erfolgte für 15min bei 4°C und 13000rpm (13400 x g). Es folgte noch ein Waschschriff des Nukleinsäurepellets mit 70% Ethanol bevor das Pellet möglichst trocken pipettiert in 50µl TE-Puffer +1µl RNase gelöst wurde. Für größere benötigte Mengen genomischer DNA wurde die Ausbeute mehrerer Minipräparationen zusammengeführt.

Lösung 1	Lösung 2	TE-Puffer	RNAase -Lösung
0,9M Sorbitol 0,1M EDTA winzige Spatelspitze Lyticase (Sigma) 2µg/ml frisch dazu	50mM EDTA 80mM Trisbase 0,4% (w/v) SDS	s. 2.2.2.7	s. 2.2.2.7

2.2.3.8 Phänotypscreen bei *Candida albicans*

Das Screening nach Phänotypen der Mutanten von *C. albicans* im Vergleich zum Wildtyp wurde in Form eines seriellen Verdünnungstropftests durchgeführt.

Dazu wurden die entsprechenden Klone in SD-Medium mehrmals (mindestens 2mal) über Nacht in Flüssigkultur angezogen und am Tage in gleicher Weise verdünnt (z.B. 1:100), um stabile, annähernd synchrone Kulturen für den Tropftest zu erhalten. Die Temperatur der Vorkulturen unterschied sich bei den zu testenden Mutanten. Standard war eine Temperatur von 37°C, jedoch bei Versuchen mit der *CaDOA1*-Mutante betrug sie 30°C. Am Tag des Tropftests wurde die Zellkonzentration der Kulturen durch Zählen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Roth) bestimmt. Anschließend wurde von jeder Kultur 1ml mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ ml hergestellt. Von dieser Konzentration wurden in 1:10 Verdünnungsschritten alle weiteren Konzentrationen bis hin zu 10^3 oder gegebenenfalls 10^2 Zellen/ ml erzielt. Die Verdünnungen wurden jeweils mit steriler 0,9% NaCl-Lösung vorgenommen. Beim Tropftest wurden jeweils 5µl der Verdünnungen einer Kultur in einer absteigenden Konzentrationsreihe nebeneinander auf das Testmedium getropft. Wichtig ist das Vortexen der Reaktionsgefäße vor jedem Verdünnungs- oder Tropfschritt, damit immer eine gleichmäßige Zellverteilung in der Lösung gewährleistet ist. Als Kontrolle für richtiges Verdünnen und gleichmäßiges Tropfen wurden bei jedem Test jeweils Platten mit SD- bzw. YPD-Medium, auf denen keine Wachstumsunterschiede der hier getesteten Mutanten zum Wildtyp vorhanden waren, mitgeführt. Als „Wildtyp“-Vergleich wurde sehr oft der *C. albicans* Stamm CAF2-1 mit noch einem funktionsfähigem *URA3*-Allel verwendet, da die Mutanten auch nur ein funktionelles *URA3* Gen hatten, wenn auch nicht am natürlichen Genlokus.

2.2.3.9 Zusatzstoffe im Medium beim Phänotypscreen

Substanz	Wirkung	Verwendete Endkonzentration	Bemerkungen/ Stocklösungen
Amorolfin	Hemmung der Ergosterolsynthese	3µg/ml	1,5mg/ml DMSO
Amphotericin B	bindet Ergosterol in der Zellmembran	0,2µg/ml	0,25mg/ml DMSO

Benomyl	unterbricht Mikrotubuli	100µg/ml und 10mg/ml	0,01g/ml DMSO
Butanol	PLD-Inhibitor	0,5% - 5%	direkt ins Medium
Calciumchlorid	Interaktion mit Signaltransduktion	300mM	6M
Calcofluor	Hemmung der Mikrofibrillenbildung bei Chitinbildung	800µg/ml	80mg/ml (Wasser mit 1M NaOH 10:1)
Cadmiumsulfat	Schwermetall, in Proteinen Zinksubstituent	15µM – 100µM	30mM
Ciclopirox	Antimykotikum, Eisenchelator	2µg/ml	2mg/ml DMSO
Coffein	hemmt cAMP- Phosphodiesterase	10mM und 20mM	0,5M in heißem Wasser
Congo Red	stört Zellwandfunktionalität	100mg/ml	0,1g/ml DMSO
Cycloheximid	hemmt Proteinsynthese	1µg/ml	1mg/ml 50% Ethanol
Cyclosporin A	Calcineurin A Hemmer	50µg/ml und 100µg/ml	10mg/ml Ethanol
2,2' - Dipyridyl	Eisenchelator	100µM	
EDTA	Chelator für: Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	1mM und 10mM	0,1M
Galaktose	andere Kohlenhydratquelle, „Glukoseersatz“, osmotischer Stress bei höheren Konzentrationen	2% 5%	direkt ins Medium eingewogen
5-Flucytosin	stört Nukleotidsynthese Antimykotikum	0,01µg/ml	0,01mg/ml (Ancotil- Infusionslösung)
Hygromycin B	Hemmung d. Proteinsynthese durch Störung der ribosoma- len Translokation u. Aminoacyl-tRNA-Erkennung	400µg/ml	25mg/ml
Inositol	Ausgangssubstanz für Phosphoinositide (in Anlehnung an Fankhauser <i>et al.</i> 1995)	75µM	300mM
Isofluran	Flüchtiges Anästhetikum	100-500µl	flüssige Form
Itraconazol	Hemmung der Ergosterolsynthese	1µg/ml	2mg/ml
Lithiumchlorid	Ionenstress, Interaktion mit Signaltransduktion und aktiven Zentren	240mM und 300mM	6M

Manganchlorid	Ionenstress, Interaktion mit Signaltransduktion und aktiven Zentren	10mM	1M
Natriumchlorid	Osmotischer Stress	0,5M – 1,25M	direkt ins Medium eingewogen
Nocodazol	M-Phasenerhalt, Hemmung d. Mikrotubuli u. Chromosomen-segregation (hemmt Mitose)	4µg/ml	4mg/ml DMSO
Propranolol	PLD-Hemmung	50µM – 500µM	1mM
SDS	Test auf Zellmembran-integrität	0,001%-0,01%	20%
Sorbitol	Osmotischer Stress	6% und 7%	direkt ins Medium eingewogen
Saccharose (Sucrose)	andere Kohlenhydratquelle, „Glukoseersatz“, osmotischer Stress bei höheren Konzentrationen	2%	direkt ins Medium eingewogen
Tetracyclin	Komplexbildung mit mehrwertigen Metallionen, in Bakterien: Proteinbiosynthesehemmung durch Hemmung der 30S ribosomalen UE	10µg/ml	10mg/ml
Wasserstoffperoxid	Oxidativer Stress	0,88mM 0,44mM	30%ige Lösung = 8,8M (Sigma)

Die Konzentration von Isofluran kann aufgrund des experimentellen Aufbaus nur als Volumen angegeben werden, das in eine im Medium steckende Pipettenspitze pipettiert wurde. Während des Versuchs verflüchtigte es sich in dem fest verschlossenen Schraubglas, das als Kulturgefäß verwendet wurde.

2.2.3.10 Platten mit verschiedenen pH-Werten für den Phänotypscreen

Um den Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Mutanten zu untersuchen, wurden Platten mit SD-Medium in unterschiedlichen pH-Werten mit Hilfe von 0,1M Kaliumphosphatpuffer hergestellt. Dazu wurde je eine 0,2M Lösung Kaliumdihydrogenphosphat und di-Kaliumhydrogenphosphat angesetzt und wie in nachstehender Tabelle für die entsprechenden pH-Werte zu einem Gesamtvolumen

von 50ml gemischt. Diese 50ml wurden mit 50ml doppelt konzentriertem, ca. 65°C warmem SD-Medium vermischt und sofort die Platten gegossen.

pH	ml 0,2M KH ₂ PO ₄	ml 0,2M K ₂ HPO ₄
5,7	46,75	3,25
6,0	43,85	6,15
6,5	34,25	15,75
7,0	19,5	30,5
7,5	8	42
8,0	2,65	47,35

Für 500ml doppelt konzentriertes SD-Medium wurden 20g Glukose und 20g Select-Agar in 400ml dest. Wasser autoklaviert und in noch heißem Zustand mit 1,7g YNB (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat) und 5g (NH₄)₂SO₄, die in 100ml dest. Wasser sterilfiltriert worden waren, zusammengegossen.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Assay zur Bestimmung der freien Fettsäuren

Dieser Assay wurde mit Hilfe des NEFA C Kit der Firma WAKO durchgeführt und diente der Bestimmung der entstandenen freien Fettsäuren durch Phospholipaseaktivität verschiedener Extrakte nach Zugabe von Phosphatidylcholin (PC) oder Lysophosphatidylcholin (LPC) als Substrate. Es wurde so die Phospholipaseaktivität in Kulturüberständen aus verschiedenen Medien und von den löslichen Proteinen der Zellaufschlüsse dieser Kulturen untersucht. Durch 2 verwendete pH-Werte (pH 6,0 und 7,5), sowie das Vorhandensein oder Fehlen von zusätzlichem Calcium während der Reaktion wurde noch eine höhere Assay-variabilität im Hinblick auf mögliche Enzymspezifitäten erreicht.

2.2.4.1.1 Herstellen der Proben für den Assay

Als Proben wurden Kulturüberstände oder Zelllysate verwendet, die wie folgt gewonnen wurden: Von einer 10ml Über-Nacht-Kultur in SD-Medium bei 30°C der entsprechenden *Candida*-Stämme (z. B. CAF2-1 als Wildtypkontrolle und isogene

CaDOA1-Mutanten) wurden neue Über-Nacht-Kulturen in Lee's Medium (pH 4,5) 1:200 angeimpft und bei 25°C schüttelnd inkubiert. Am anderen Tag wurde die Zellzahl in der Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) bestimmt und 10ml Kulturen in den frischen, gewünschten Medien mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml angeimpft und bei den entsprechenden Temperaturen für 15h geschüttelt. Pro Kultur wurde 1ml verwendet, um sofort oder später (nach zwischenzeitlichem Einfrieren) eine mikroskopische Charakterisierung (Hefe/ Hyphen) vorzunehmen. 1 weiterer ml wurde 5min bei 14000rpm (14300 x g), RT, zentrifugiert und 800µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von diesem wurden dann Aliquots für den Enzymassay und die Proteinbestimmung benutzt (Kulturüberstand). Die restlichen ca. 200µl Überstand wurden vorsichtig abgenommen und verworfen, während zum Zellpellet 1ml Tris-HCl-Puffer (40mM, pH 7,5) und Glasperlen gegeben wurden. Für die Extraktion der löslichen intrazellulären Proteine wurden die Pellets dann 40min gevortext und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15min, 14000rpm (14300 x g), RT) abgetrennt. Danach wurden abermals 800µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und davon Aliquots für die Proteinbestimmung und den Enzymassay verwendet (im Folgenden bezeichnet als löslicher Zellextrakt bzw. Zellysate).

2.2.4.1.2 Bestimmung der freien Fettsäuren

(in Anlehnung an die Arbeitsanleitung des NEFA C Kit)

25µl der Probenlösung wurden mit 25µl 2 x Phospholipidmix in einer 96er Mikrotiterplatte zusammengegeben und bei 37°C sacht schüttelnd (100rpm) inkubiert. Die Platten wurden dazu mit einer Klebefolie (SealPlate™ von EXCEL Scientific) verschlossen, um das Vermischen von Kondenswasser unterschiedlicher Ansätze zu vermeiden. Als Nullkontrollen wurden für diese Reaktion und die spätere Fettsäurebestimmung 25µl des Mediums im Falle von Kulturüberständen und 25µl 40mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) im Falle von Zellysaten verwendet. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde die Enzymreaktion unterbrochen und entweder der ganze Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder 10µl der Reaktion in eine neue Mikrotiterplatte überführt und diese weggefroren, während der restliche Ansatz weiter inkubiert wurde. Nach dem Auftauen zum Fortsetzen des Assays wurden in jede Mikrotiterplatte ebenfalls je 10µl von einer Standardreihe mit

Ölsäure (Konzentrationen 0mM, 0,2mM, 0,4mM und 1mM) pipettiert, 2mal zur Doppelwertbestimmung.

Für die eigentliche Farbreaktion wurden die 10µl der Standardreihe bzw. der Enzymreaktion mit 50µl Lösung A versetzt und 15min bei RT schüttelnd (100rpm) inkubiert. Danach wurden 100µl Lösung B dazupipettiert, gefolgt von einer erneuten Inkubation bei RT für 15min und 100rpm. Die Absorption wurde bei 550nm im TECAN SPEKTRA Fluor Elisa Reader vermessen und die Konzentration der freien Fettsäuren anhand der doppelten Standardreihe auf jeder Mikrotiterplatte mit der Software easyWIN6.1 (TECAN) berechnet.

2 x Phospholipidmix enthielt 13,4mM PC oder LPC (polar lipids von Avanti) in 40mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) oder in 0,1M Zitronensäurepuffer (pH 6,0), 6mM Natriumazid und 1% (v/v) Triton X-100, gegebenenfalls 8mM CaCl₂ (Endkonzentration 4mM in der Enzymreaktion). Zum Lösen der Phospholipide wurde die Lösung gevortext, 10min bei RT stehen gelassen und mindestens 15min bei 37°C geschüttelt. Zum Schluss wurde sie 3 x 15s bei Zyklus 4 und 65% Intensität mit Ultraschall behandelt (Gerät UW2070 von BANDELIN electronic).

Ölsäure und die Zutaten für Lösung A und B sind im Kit vorhanden und wurden nach Kit-Anleitung präpariert.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Extrakten, die eingesetzt wurden beim Fettsäure-Assay wurde das BCA Protein Assay Reagent Kit der Firma PIERCE verwendet. Hierbei wird das bei der Biuret-Reaktion entstehende, reduzierte Kupfer (Cu¹⁺) mit einem Reagenz, das Bicinchoninsäure enthält, colorimetrisch nachgewiesen. Es wurde die in der Anleitung des Kits beschriebene Mikrotiterplattenprozedur gewählt und befolgt. In einer 96-Kammer-Platte wurden 25µl der Probe (Kulturüberstand bzw. löslicher Zellaufschluss) und 200µl Reagenz vermischt und die Platte für die Reaktion 30min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 550nm im Elisa-Reader TECAN SPEKTRA Flour (TECAN) vermessen. Für den Nullabgleich wurde bei den Proben aus den Kulturüberschüssen Wasser verwendet, da die Absorption der Medien bei einigen Medien allein höher war als die des Kulturüberstandes durch die Stoffwechselfvorgänge während der Kultur. Bei den

Zellpelletextrakten wurde dafür Tris-HCl-Puffer verwendet. Für die Berechnung der Proteinmengen wurde eine Standardkurve aus Verdünnungen einer 2mg/ml BSA-Stammlösung mit den Konzentrationsstufen 0 mg/ml, 0,0625mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml auf jeder Mikrotiterplatte vermessen. Jeder Wert wurde in Dreifachbestimmung ermittelt und daraus anschließend der Mittelwert gebildet.

2.2.5 Mikroskopische Färbemethoden

2.2.5.1 Quinacrine-Färbung

Augsten *et al.* 2002 und Harrison *et al.* 2002

Quinacrine ist eine fluoreszierende schwache Base, die in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums in der Vakuole der Zelle akkumuliert und in der sauren Umgebung protoniert wird. Für die Substanzaufnahme ist ein pH Gradient nötig und je niedriger der pH-Wert des Mediums oder Puffers ist, umso geringer ist die Aufnahme.

In Anlehnung an o. g. Referenzen wurden 500µl einer Über-Nacht-Kultur in YPD- oder SD-Medium abzentrifugiert (RT, 5min, 3800 x g) und in YPD mit dem pH 7,6 resuspendiert, wozu 2,5µl Quinacrinlösung (20mg/ml, Sigma) pipettiert wurden. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf die gleiche Weise abzentrifugiert und in YPD resuspendiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop (Fotomikroskop II und cLSM510, beide Carl Zeiss) mit den entsprechenden Filtereinstellungen betrachtet (Anregungsfilter 450-490nm, Emissionsfilter 515-565nm).

2.2.5.2 Färbung lebender Zellen (viability stain)

Für diese Färbung wurde das LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit von Molecular Probes nach der Bedienungsanleitung verwendet. Dazu wurden zu 50µl einer Zellkultur in der späten exponentiellen Phase und der Farbstoff FUN1 des Kits verwendet. Die Betrachtung am Mikroskop erfolgte bei Fluorescein Filtereinstellungen (Anregung um 480nm und Emission bei = 530nm). FUN1 färbt Nukleinsäuren und erzeugt eine diffuse Grün- bis Grüngelb-Färbung des Zytoplasmas lebender Zellen und toter Zellen mit unvollständiger Zellmembranstruktur. Metabolisch aktive Zellen

produzieren orangerote CIVS (cylindrische intravakuoläre Strukturen), die sich innerhalb der Vakuole bewegend unter dem Mikroskop darstellen.

2.2.5.3 Calcofluor-Färbung

Calcofluor ist ein ultraviolett anregbarer, blau fluoreszierender Farbstoff, der die Pilzzellwand markiert. Im Falle von Hyphenbildung lassen sich mit seiner Hilfe Pseudohyphen und echte Hyphen leichter unterscheiden, da er die Septen im Hyphenschlauch ebenfalls deutlich anfärbt und sowohl ihre Lage, als auch Anzahl erkennbar werden. In dieser Arbeit wurden zwei Möglichkeiten der Färbung genutzt:

a) *in Anlehnung an Botstein Lab PROTOCOLS*

[http:// genome-www.stanford.edu/group/botlab/protocols.html](http://genome-www.stanford.edu/group/botlab/protocols.html)

Die zu färbenden Zellen wurden in diesem Falle vor dem Färben fixiert. Zu dem Zellkulturaliquot wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 4% gegeben und die Zellen 10min inkubiert, anschließend abzentrifugiert (5min, RT, 5000rpm). In PBS mit 4% Formaldehyd wurden die Zellen resuspendiert und 1h bei RT fixiert. Es folgte ein wiederholter Wasch- und Zentrifugierschritt mit PBS nach dem die Zellen im gewünschten Endvolumen PBS aufgenommen wurden und Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28 von Sigma) in einer Endkonzentration von 20µg/ml hinzugefügt wurde. Nach einer Inkubation von 1h bei RT wurden die Zellen 5mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation wie oben) und unter dem Mikroskop betrachtet.

10 x PBS: 8g NaCl
 0,2g KCl
 2,68g Na₂HPO₄ * 7H₂O
 0,24g KH₂PO₄

in 80ml bidest. Wasser lösen und den pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen, dann das Volumen auf 100ml auffüllen, den Puffer autoklavieren und bei RT lagern.

Calcofluor White Lösung: 160mg wurden in 1,8ml Wasser und 0,2ml 1N NaOH gelöst und bei 4°C gelagert (= 80mg/ml). Daraus wurde mit Wasser eine Stammlösung von einer Konzentration von 1mg/ml hergestellt und für die Färbung eingesetzt.

b) *unter Verwendung des LIVE/DEAD[®] Yeast Viability Kit von Molecular Probes*

Mit der in dem bereits oben erwähnten Kit enthaltenen Calcofluor White M2R-Lösung wurden ebenfalls Zellwände angefärbt, entweder von Zellen direkt aus der Flüssigkultur oder von vorher wie unter a) beschrieben fixierten Zellen. Dazu wurde zu dem entsprechenden Zellvolumen Calcofluor in einer Endkonzentration von 25µM gegeben und die Probe 30min bis 1h im Dunkeln inkubiert.

3 ERGEBNISSE

Innerhalb dieser Arbeit wurden 4 Gene, *CaPLC1*, *CaPLC2*, *CaPLC3* und *CaDOA1*, von *Candida albicans* untersucht, um Aufschlüsse über ihre Funktion innerhalb der Zelle zu bekommen.

Die Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Gene begann immer mit einer Untersuchung der Gen- bzw. abgeleiteten Proteinsequenz mittels Sequenzvergleichen und Motivsuchen, um erste Hinweise auf mögliche Funktionen und die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle zu bekommen. Es schloss sich dann das Ausschalten des Gens und eine phänotypische Untersuchung der entstandenen Mutante an.

3.1 Die Phospholipasen der Klasse C

3.1.1 Eine putative Kernlokalisierungssequenz im *CaPLC1* Gen

Das Phospholipase C1 Gen von *Candida albicans* wurde 1998 von Bennett *et al.* beschrieben (Bennett *et al.* 1998). Der offene Leserahmen von *CaPLC1* ist 3297bp lang, befindet sich auf Chromosom 7 und kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 124,6 kDa. Aufgrund von Sequenzhomologien mit dem *PLC1* Genprodukt von *Saccharomyces cerevisiae* (Yoko-o *et al.* 1993; Flick *et al.* 1993; Payne *et al.* 1993), aber auch durch das Vorhandensein typischer Sequenzstrukturen, wie einer X- (Aminosäure 565-727) und einer Y-Domäne (Aminosäure 795-912) (Rhee 2001; Okada *et al.* 2002; Ochocka *et al.* 2003) kann gefolgert werden, dass *CaPLC1* für eine PI-spezifische Phospholipase C des Typ d kodiert. Eine Sequenzanalyse des abgeleiteten Proteins ergab weder Hinweise auf ein N-terminales Signalpeptid, noch andere Hinweise darauf, dass das Protein den sekretorischen Weg durchläuft bzw. in den Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Auch genomweite Ansätze zur Suche von Zellwandproteinen (Monteoliva *et al.* 2002) identifizierten das *CaPLC1* Genprodukt nicht als Zellwandprotein. Dagegen gibt es Hinweise auf eine mögliche Kernlokalisation von CaPlc1. Okada *et al.* (2002) zeigten beim Säugerprotein PLC d₁, dass eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) aus positiv geladenen Aminosäuren am C-Terminus der X-Domäne und der Verbindungssequenz zwischen den beiden Domänen essentiell für den Proteinimport in den Zellkern ist. Eine ähnliche Sequenz ist auch in CaPlc1 vorhanden. Zwischen der X und Y-Domäne (Aminosäuren 718-790) treten wiederholt Arginin und Lysin auf. Das

Motiv ist zweiteilig, wie es in Proteinen verschiedenster Spezies (Huhn, Drosophila, Mensch, Maus, Kaninchen, Pute, Hefe, Frosch) vorkommt (Dingwall und Laskey, 1991). Obwohl keine klare Konsensussequenz zwischen den Kernlokalisationssequenzen existiert, ist doch eine deutliche Ähnlichkeit der analogen Sequenz von CaPlc1 zu den Regionen in anderen Phospholipasen C vorhanden. (s. Abbildung 3.1.1-1).

Abbildung 3.1.1-1: Putative Kernlokalisierungssequenz (NLS) in CaPlc1 von *C. albicans* (in Anlehnung an Okada *et al.* 2002). Der C-Terminus der X-Domäne und die XY-Verbindung verschiedener PI-PLC Sequenzen mit NLS-Charakter im Vergleich mit CaPlc1. Die entsprechenden Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) sind fett und kursiv markiert. Ratte - PLC-d₁, *Schizosaccharomyces pombe* - SpPlc1, *T. cruzi* - TzPlc1; *Dictyostelium discoideum* – DdPLC

CaPlc1 ⁷¹⁸***KHKFIIKVKK*** (42) ***K*** (14) ***KNKSPKIINE***⁷⁹⁴
 PLC-d₁ ⁴³²***KGKILLKGKK*** (38) ***KPKEDKLK***⁴⁸⁷
 SpPlc1 ⁵⁷⁶***LNKILLKVK*** (38) ***RKGKRRMK*** (7)⁶³⁷
 TzPlc1 ³⁸⁴***KRKILVKSQR*** (49) ***KKKEEKKKEK***⁴⁵⁸
 DdPLC ⁴⁵⁷***KYKILLKG*** (61) ***KKKKITKIK*** (7)⁵⁴²

3.1.2 Versuche zur Disruption des *CaPLC1* Gens

Bereits vor dieser Arbeit wurde in zwei Arbeitsgruppen (Universität Dublin, Universität Hamburg) versucht, eine *CaPLC1*-Disruptionsmutante herzustellen. Dazu wurde eine Disruptionskassette verwendet, die in das Plasmid pDB104 integriert war (hergestellt von D sir e Bennett, Universität Dublin). Diese Disruptionskassette besteht aus den Regionen 1043 bp bis 1759 bp und 2668 bp bis 3445 bp nach dem ATG Startcodon des *CaPLC1* Gens, die durch PCR generiert und vor bzw. nach der *hisG-URA3-hisG* Kassette in das Plasmid pMB7 (Fonzi und Irwin, 1993) ligiert wurden. Zur Transformation und Genomintegration wurde das Plasmid mit *PvuII* linearisiert. Nach Integration am *CaPLC1* Locus wurden somit innerhalb des Gens ca. 900 bp deletiert. Eine heterozygote *Caplc1/CaPLC1* Mutante konnte problemlos mit pDB104 hergestellt werden. Für die Disruption des zweiten Allels wurde die *URA3*-negative heterozygote Mutante erneut transformiert und 190 Transformanten dieser zweiten Runde isoliert und untersucht. In allen untersuchten Transformanten war das zweite Allel nicht disruptiert.

Da die Disruption des zweiten Allels in den bisherigen Ansätzen erfolglos blieb, wurden im Rahmen dieser Arbeit beim Versuch, eine homozygote *Caplc1/Caplc1*

Mutante herzustellen, 3 weitere Kassetten verwendet. Eine Kasette, integriert in Plasmid pDS952, wurde von der Arbeitsgruppe von Dominique Sanglard (Lausanne) zur Verfügung gestellt (Anmerkung: Auch in dieser Arbeitsgruppe blieben Versuche, eine homozygote *Caplc1/Caplc1* Mutante herzustellen, erfolglos (Sanglard, persönliche Mitteilung)). Die Plasmidkarte inklusive Beschreibung befindet sich im Anhang. Homologe Regionen dieser Kasette waren etwa je 500 bp flankierend zum Gen.

Ohne das vorherige Klonieren einer Disruptionskasette kommt die Methode von Wilson *et al.* (1999) aus (s. 2.2.3.4). Mit den Primern *plc-ura fwd.* und *plc-ura rev.*, bei denen 58 bzw. 57 Nukleotide identisch zu *CaPLC1* und 22 bzw. 23 Nukleotide identisch zu dem *URA3* Gen waren, wurde mit pGEM-URA3 als Template die Kasette während einer PCR amplifiziert. Für die Transformation wurde das PCR-Produkt als Disruptionskasette verwendet.

Bei allen vorherigen Möglichkeiten zur Disruption wurden Kassetten verwendet, die theoretisch sowohl in das bereits disruptierte als auch in das intakte Allel integrieren konnten, vorausgesetzt, dass beide Allele identisch sind. Allerdings ist bekannt, dass durch Heterozygotität von Allelen eines Gens die Integration einer bestimmten Kasette auch allelspezifisch erfolgen kann (Yesland und Fonzi, 2000). Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche, allelspezifische Kasette kloniert.

Die allelspezifische Kasette wurde in Plasmid pDK-4 (Plasmidkarte und Beschreibung siehe Anhang) integriert. Plasmid pDK-4 wurde aus einem PCR-Produkt des nicht disruptierten Allels in der heterozygoten Mutante erstellt. In dieses Fragment wurde anschließend das *CaURA3* Gen ligiert. Eine genomische Integration dieser Kasette in den *CaPLC1* Locus hätte folglich keinen Verlust von Gensequenzen zur Folge, sondern würde das *CaPLC1* Gen lediglich durch Unterbrechung mit dem *CaURA3* Markergen inaktivieren.

Abbildung 3.1.2-2 zeigt eine graphische Darstellung der Lage der identischen Regionen in den verschiedenen Disruptionskassetten zueinander und zum *CaPLC1* Gen.

Auch unter Verwendung dieser drei weiteren Disruptionskassetten wurde, trotz gleichzeitiger Optimierung der Transformationsprotokolle keine Disruption des zweiten *CaPLC1* Allels erreicht.

Insgesamt wurden zusätzlich weitere 500 Klone getestet, die aus mehr als 28 Transformationsereignissen hervorgingen. Am häufigsten erfolgte die Integration in

das erste, bereits disruptierte Allel. Aber auch zufällige Integrationen im Genom wurden, insbesondere nach Einsatz der allelspezifischen Kassetten, in Southern-Blot Analysen gezeigt. Bei sieben Klonen erfolgte die Integration der Kassetten zwar in das zweite Allel, doch wurden hier im Southern-Blot zusätzliche DNA-Fragmente nachgewiesen, die ein nicht disruptiertes *CaPLC1* Allel enthielten. Das lässt vermuten, dass vor der Integration der Disruptionskassette in das zweite Allel eine Duplikation der Region erfolgte, so dass eine dritte *CaPLC1* Kopie entstanden ist.

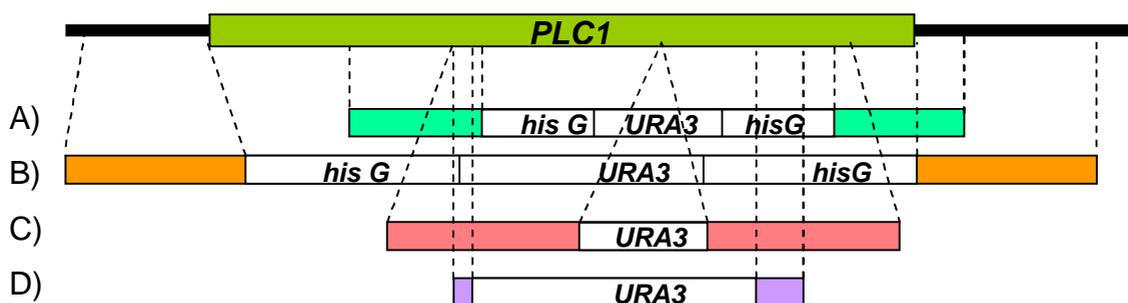


Abbildung 3.1.2-2: Die Lage der identischen Regionen der *CaPLC1*-Disruptionskassetten zueinander.

A) Bennett-Kassette: bp 1043 bis 1759 und bp 2668 bis 3445 (bereits 145 bp nach dem STOP-Codon)

B) Sanglard-Kassette: 495 bp vor ATG und 501 bp nach dem STOP-Codon

C) Allelspezifische Kassette: bp 1459 bis 2776

D) Oligomertransformation: bp 1639-1696 und bp 2290-2346

3.1.3 Herstellung einer konditionalen *CaPLC1*-Mutante mit dem *MET3*-Promotor

Da alle Versuche zur Herstellung einer homozygoten knock out-Mutante erfolglos verliefen und eine Disruption des zweiten Allels von *CaPLC1* nur möglich war, wenn gleichzeitig eine Duplikation der Region stattfand, musste davon ausgegangen werden, dass *CaPLC1* ein essentielles Gen ist. Um dies experimentell zu zeigen, wurde daher eine konditionelle Mutante hergestellt. Dazu wurde der regulierbare *MET3* Promotor von *C. albicans* vor das *CaPLC1* Gen des nicht disruptierten Allels integriert. Bisherige, in der Literatur beschriebene Versuche, zeigten, dass der *MET3* Promotor durch Zugabe von je 2,5 mM Methionin und Cystein nahezu komplett blockiert wird (Care *et al.* 1999). Dementsprechend wurde der *MET3* Promotor bereits mehrmals für die Untersuchung und den Nachweis essentieller Gene

verwendet (Roig und Gozalbo, 2002; Nishikawa *et al.* 2002; Sousa *et al.* 2002). Für die Klonierung und Transformation wurde die Vorgehensweise von Care *et al.* (1999) und das Plasmid pCaDis gewählt. Ein 1350 bp großes *CaPLC1*-Fragment beginnend mit dem ATG-Codon wurde durch PCR amplifiziert und die über Primer eingefügten Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*II genutzt, um es in den Vektor pCaDis einzufügen. Das so erhaltene Plasmid pIM-17 und die Mutante Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1* (M226) wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit von Inga Melzer in der Arbeitsgruppe hergestellt. Nach Transformation der heterozygoten *CaPLC1*-Mutante wurde die Integration von pIM-17 mittels Southern-Blot und PCR überprüft. Detaillierte Untersuchungen der Mutante fanden im Rahmen dieser Arbeit statt.

3.1.4 Die konditionelle *CaPLC1*-Mutante im Δ *Capld1/\Delta*Capld1 Hintergrund

Das intrazelluläre Signalmolekül Diacylglycerol (DAG) entsteht als Produkt der Aktivität von Phospholipase C, als auch von Phospholipase D. *CaPLD1* ist nicht essentiell (Hube *et al.* 2001). Durch Disruption von *CaPLC1*, bzw. durch eine Reduktion der *CaPLC1* Transkripte in der *Capld1/Capld1* Mutante sollte eine mögliche Verbindung der Funktionen der Enzyme *CaPlc1* und *CaPld1* untersucht werden. Deshalb wurde in der *CaPLD1*-Mutante ein Allel von *CaPLC1* disruptiert (Δ *Capld1/\Delta*Capld1 *CaPLC1/\Delta*Caplc1; M220 und M221) und das zweite Allel ebenfalls unter die Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors gestellt. Dazu wurde analog, wie bei der Herstellung der konditionellen *CaPLC1*-Mutante (Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1*), nach Care *et al.* (1999) unter Verwendung von Plasmid pIM-17 vorgegangen.

3.1.5 Überprüfung der Regulation des *MET3*-Promotors

Obwohl alle oben aufgeführten Experimente nahe legten, dass *CaPLC1* ein essentielles Gen ist, war das Wachstum der konditionellen Mutante (Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1*) auch bei Anwesenheit von je 2,5 mM Methionin und Cystein ungehemmt. Um die Regulation des *MET3*-Promotors unter den gewählten Bedingungen zu untersuchen, wurde die Expression von *CaPLC1* Transkripten in der Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1* Mutante mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Von einer Vorkultur mit der Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1* Mutante in SD-Medium bei 37°C

wurden 120 ml frisches SD-Medium mit 10^8 Zellen/ml angeimpft und mit oder ohne Zusatz von Methionin und Cystein (je 2,5 mM) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C oder 37°C. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Für die semiquantitative RT-PCR wurde das Gen *CaEFB1* als Standard verwendet und jeweils verschiedene PCR Zyklenzahlen durchgeführt. Abbildung 3.1.5-1 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Trotz Repression des *MET3* Promotors waren unter den gewählten Bedingungen noch *CaPLC1*-Transkripte detektierbar. Da das Transkriptionsniveau von *CaPLC1* ohnehin viel geringer war als das von Vergleichsgenen wie *CaACT1* oder *CaEFB1* (vergleiche Zyklenzahl in der RT-PCR), reichte wahrscheinlich die nochmals reduzierte Transkriptmenge nach Repression des *MET3*-Promotors immer noch aus, um das Überleben der Mutanten zu sichern.

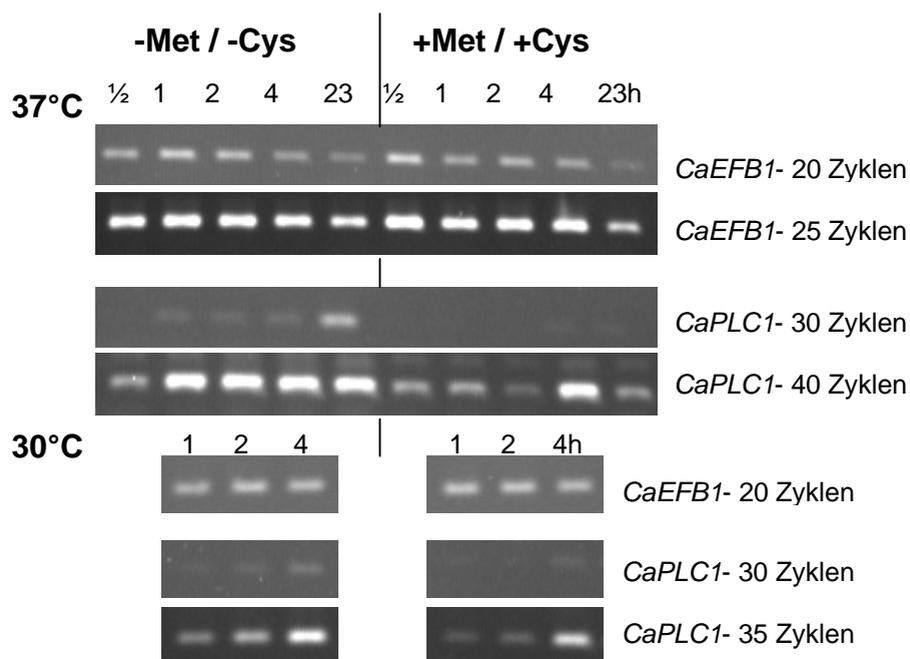


Abbildung 3.1.5-1: Überprüfung der Regulation des *MET3*-Promotors mit semiquantitativer RT-PCR. Durch die Zugabe von Methionin und Cystein wurde die *CaPLC1*-Transkriptmenge deutlich reduziert, jedoch wurde die Transkription nicht komplett blockiert.

3.1.6 Phänotyp der konditionellen *CaPLC1*-Mutante ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$)

Obwohl bei Repression des *MET3* Promotors in der $\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Mutante noch *CaPLC1*-Transkripte nachweisbar waren, war doch die Transkriptmenge deutlich reduziert. Um den möglichen Einfluss der reduzierten Transkriptmenge auf das Wachstum der konditionellen *CaPLC1*-Mutante zu untersuchen, wurden mit der konditionellen Mutante Tropftests mit serieller Verdünnung zu Phänotypuntersuchungen durchgeführt. Die getesteten Bedingungen orientierten sich an den bei *S. cerevisiae* beobachteten Phänotypen der *ScPLC1*-Mutante von Yoko-o *et al.* (1993), Payne *et al.* (1993) und Flick *et al.* (1993). Ähnlich wie in *S. cerevisiae* wurde bei der konditionellen *CaPLC1*-Mutante eine Temperatursensitivität bei 18°C und 42°C beobachtet. Abgeschwächter, jedoch ebenfalls nachweisbar, war eine erhöhte Osmosensitivität bei 5% Sorbitol bzw. 1 M NaCl gegenüber der nicht reprimierten Kontrolle, sowie eine Wachstumshemmung mit Galaktose anstelle von Glukose als Kohlenhydratquelle. Odom *et al.* (2000) zeigten, dass in *S. cerevisiae* eine Plc1-Aktivität für die Transkriptionskontrolle des auf Arginin reagierenden ArgR-Mcm1 Komplexes auf Medium mit Arginin als alleinige Stickstoffquelle notwendig ist. (Anmerkung nach Odom *et al.* (2000): Der ArgR-Mcm1 Komplex besteht in *S. cerevisiae* aus 4 Proteinen (ScArg80, ScArg81, ScArg82 und ScMcm1), die alle für die vollständige Transkriptionskontrolle notwendig sind. ScArg80 und ScArg81 sind Arginin-spezifische Transkriptionsfaktoren und ScArg82 und ScMcm1 pleiotrope Regulatoren.)

Ein Medium mit Arginin als alleinige Stickstoffquelle (ArgD-Medium) verursachte auch bei der $\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Mutante einen Wachstumsdefekt.

Beispiele der veränderten Phänotypen bei reduzierter Expression von *CaPLC1* sind in Abbildung 3.1.6-1 dargestellt.

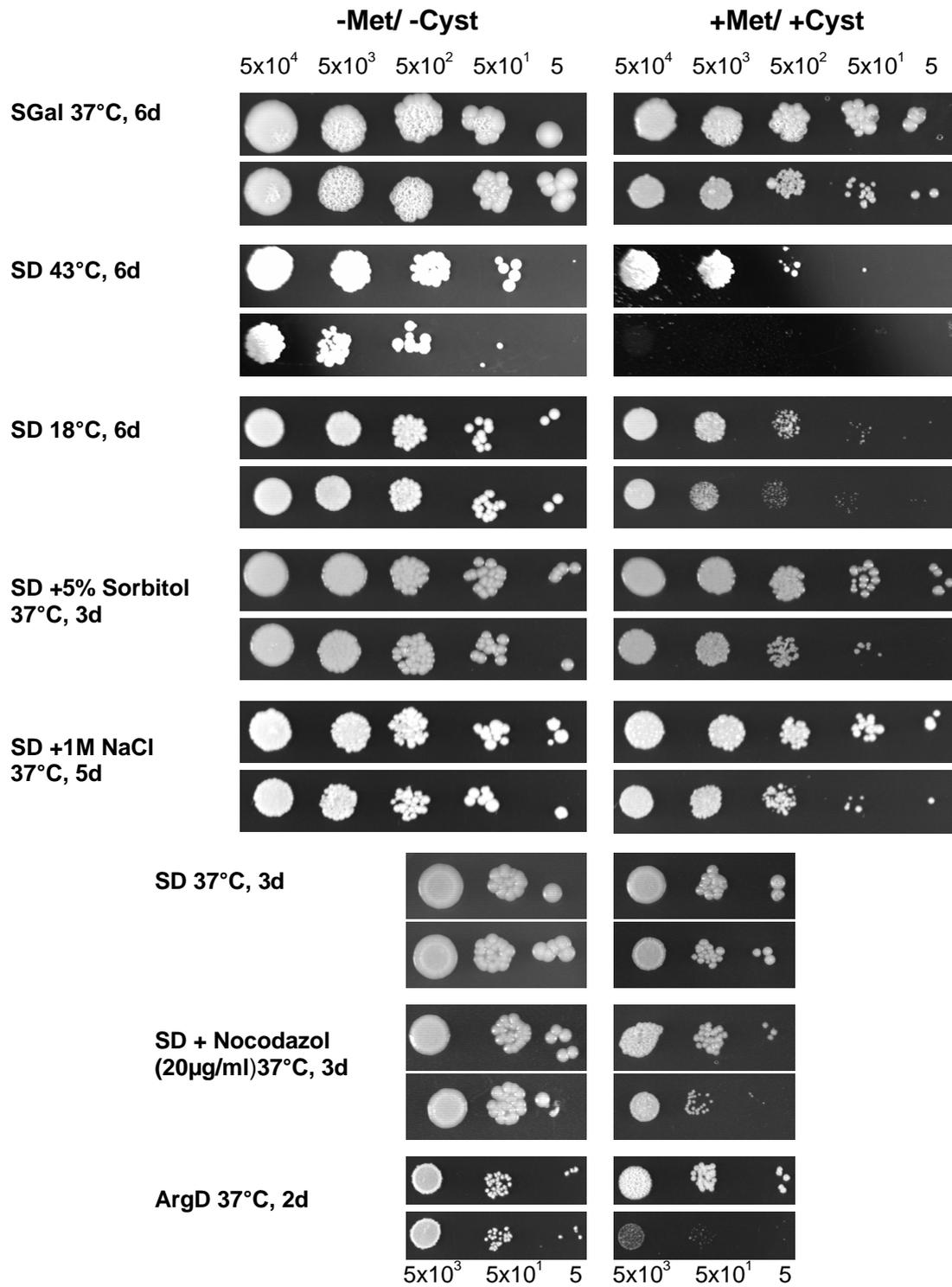


Abbildung 3.1.6-1: Veränderte Phänotypen der konditionellen Mutante ($\Delta Caplc1/ pMET3-CaPLC1$) bei Blockierung des *MET3* Promotors. Die obere Reihe jedes Paares zeigt den Wildtyp (CAF2-1), die untere die Mutante. Zur Anzucht wurden die Zellen 1 Tag in SD Flüssigmedium mit Methionin und Cystein (je 2,5 mM) kultiviert. Nach dem Zählen und Verdünnen wurden abnehmend von links nach rechts 5 µl mit 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 und 5 Zellen auf Medien mit und ohne Methionin und Cystein getropft.

3.1.7 Phänotyp der $\Delta Capld1/\Delta Capld1 \Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Doppelmutante

Die $\Delta Capld1/\Delta Capld1 \Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Mutante wurde der gleichen Phänotypsuche unterzogen und auf den gleichen Medien untersucht wie bei den Untersuchungen der konditionellen *CaPLC1*-Mutante ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$) und zeigte die gleichen Phänotypen. Allein eine erhöhte Osmosensitivität bei 1 N NaCl und 5% Sorbitol wurde zusätzlich gefunden. Sie ist auf die Disruption von *CaPLD1* und *CaPLC1* zurückzuführen (Abbildung 3.1.7-1).

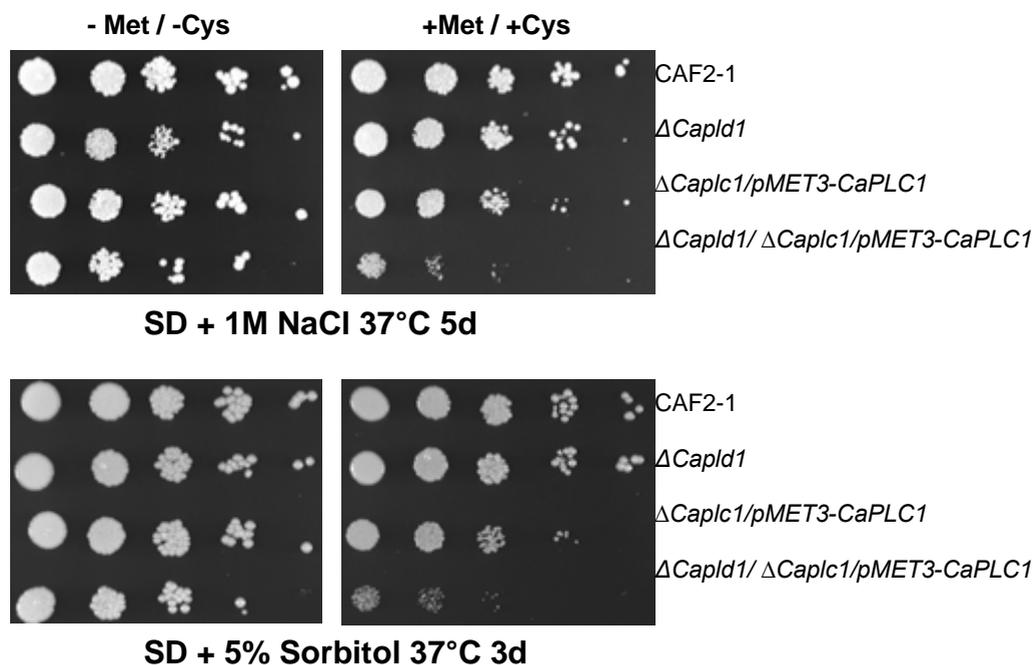


Abbildung 3.1.7-1: Phänotyp der konditionellen *CaPLC1*-Mutante im *Capld1/Capld1* Hintergrund. Lediglich die Osmosensitivität bei Zugabe von Sorbitol und NaCl war bei der *Capld1/Capld1* $\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Doppelmutante bei Blockierung des *MET3* Promotors weiter verstärkt. Technische Durchführung und Beschriftung wie in Abb. 3.1.6-1.

3.1.8 Phänotypische Analyse der heterozygoten *CaPLC1*-Mutante ($\Delta Caplc1/CaPLC1$)

Da sich das phänotypische Verhalten der konditionellen *CaPLC1*-Mutante ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$) trotz nachweislich vorhandener, *CaPLC1*-Transkripte änderte (s. 3.1.5), wurde ein Gendosiseffekt angenommen. Demnach wurde postuliert, dass die reduzierte Menge an *CaPLC1* Transkripten bereits zelluläre Veränderungen hervorruft. Daraus konnte gefolgert werden, dass auch die heterozygote $\Delta Caplc1/CaPLC1$ Mutante auf Grund eines fehlenden Allels bereits phänotypische Unterschiede aufweisen könnte, die gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Funktion von *CaPlc1* zulassen könnte. Untersuchungen der $\Delta Caplc1/CaPLC1$ Mutante hatten darüber hinaus den Vorteil, dass auch Bedingungen untersucht werden konnten, bei denen der Zusatz von Methionin oder Cystein störend waren. Dazu gehören auch hypheninduzierende Bedingungen.

Wie auch die konditionelle Mutante zeigte die heterozygote eine Temperatursensitivität bei 43°C. Des Weiteren wurde sie bei 30°C und 37°C durch Nocodazol (20 µg/ml), Itraconazol (1 µg/ml) und Wasserstoffperoxid (880 µM) gehemmt. Auf Medien mit Glycerol und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle wuchs die $\Delta Caplc1/CaPLC1$ Mutante schlechter. Die Hyphenbildung war bei 37°C auf Blutagar, Serumagar und Spider-Medium im Vergleich zum Kontrollstamm CAF2-1 verlangsamt. Die Hyphen und der typische weiße Hof um die Kolonien bei Wachstum auf YCB-BSA Medium (Protein als einzige Stickstoffquelle) waren ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle verzögert. Abbildung 3.1.8-1 zeigt einige Beispiele der beeinträchtigten Hyphenbildung.

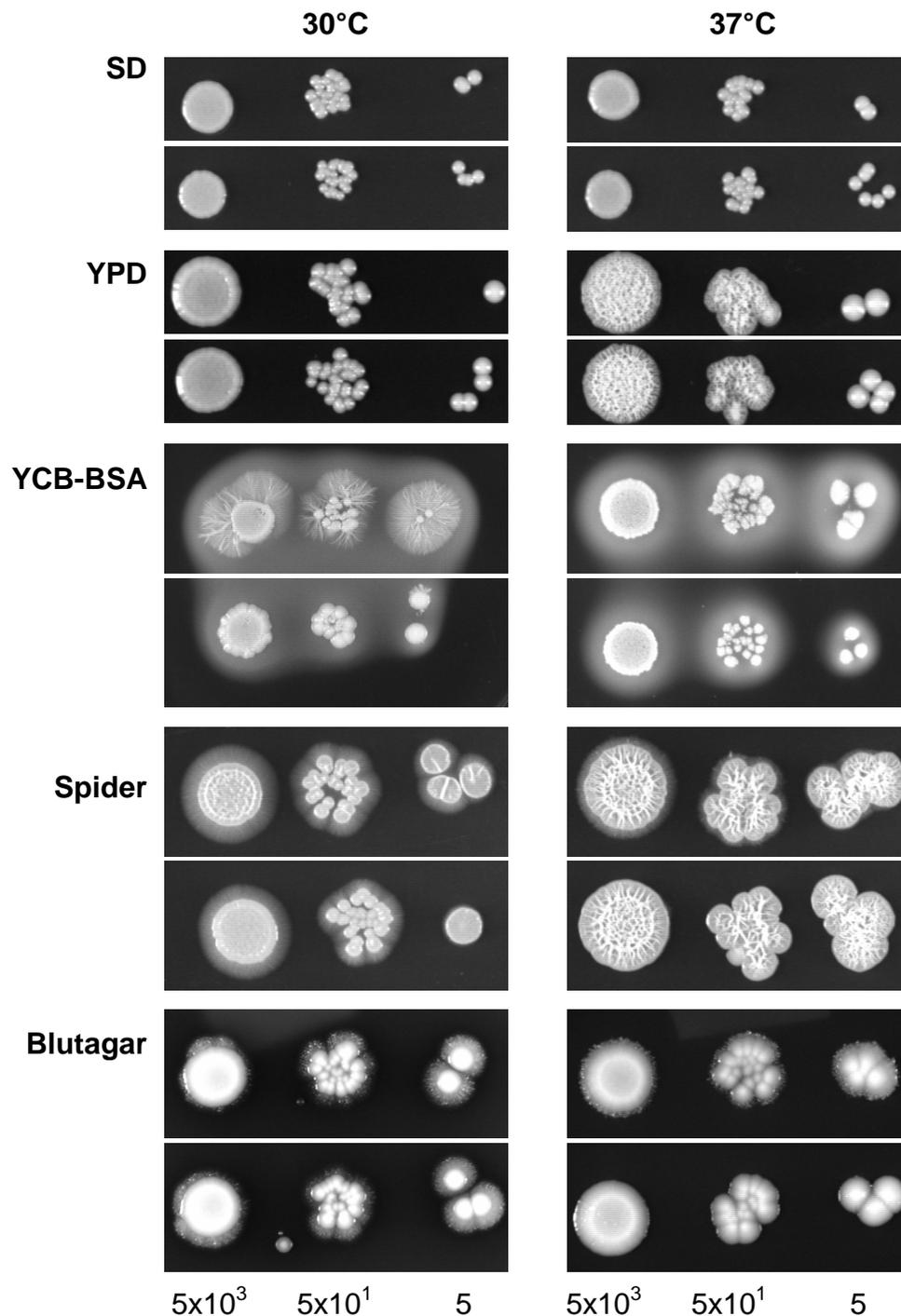


Abbildung 3.1.8-1: Phänotypen der heterozygoten $\Delta Caplc1/CaPLC1$ Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen. Gezeigt ist das Ergebnis eines Tropftests mit serieller Verdünnung einer SD Über-Nacht-Flüssigkultur (5×10^3 , 5×10^1 und 5 Zellen/ Tropfen). Die obere Reihe des Paares zeigt zum Vergleich den Wildtyp (CAF2-1), die untere die $\Delta Caplc1/CaPLC1$ Mutante. Die Inkubation erfolgte auf SD und YPD bei 30°C und 37°C für 2 Tage, auf YCB-BSA bei 30°C für 8 und für 4 Tage bei 37°C, auf Spider-Medium bei beiden Temperaturen für 5 Tage, sowie 8 Tage lang auf Blutagar.

3.1.9 Expression von *CaPLC1* unter ausgewählten *in vitro* Bedingungen

Die in dieser Arbeit beobachteten modifizierten Phänotypen bei reduzierter *CaPLC1* Transkriptmenge bestehen oft in einer erhöhten Sensitivität bei verschiedenen Umweltbedingungen. Um zu untersuchen, ob im Wildtyp unter solchen Bedingungen normalerweise eine erhöhte *CaPLC1* Transkriptmenge vorliegt, wurde die Transkription von *CaPLC1* unter einigen Stressbedingungen mit semiquantitativer RT-PCR untersucht. Einige Phänotypen in *C. albicans* waren mit den Phänotypen der *PLC1*-Mutante von *S. cerevisiae* vergleichbar, z. B. die Thermosensitivität bei 42°C. Bei *S. cerevisiae* konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Genprodukte von *ScGLE1*, *ScIPK1*, *ScIPK2* (= *ARG82*), und *ScPLC1* beim nukleären mRNA Export involviert sind (York *et al.* 1999 und 2001). Um mögliche Parallelen in *C. albicans* zu untersuchen, wurden die entsprechenden homologen Gene von *C. albicans* ebenfalls mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Für jedes dieser Gene wurde bei *C. albicans* ein orthologes Gen gefunden: *CaGLE1* = CA2378, *CaIPK1* = IPF10566 = CA0280, *CaIPK2* = IPF16498 = CA2312. Als Wachstumsbedingungen zur RNA-Isolierung wurde ein Hitzeschock bei 42°C in SD-Medium, Wachstum in SGlyc-Medium (Glycerol als einzige Kohlenstoffquelle), sowie Wachstum in Gegenwart von Cadmiumionen bei 37°C gewählt. Das SGlyc-Medium wurde gewählt, da die *Caplc1/CaPLC1* heterozygote Mutante auf diesem Medium schlechter wuchs. Der Zusatz von Cadmiumionen wurde gewählt, da Cadmium mit den Thiolgruppen von Proteinen reagiert und Zinkionen ersetzt. Dadurch werden nicht mehr funktionstüchtige Proteine abgebaut und müssen neu synthetisiert werden, was die gesamte Transkriptionsmaschinerie benötigt. Da die oben genannten Gene an dem nukleären mRNA Export beteiligt sind, wurde angenommen, dass diese Gene bei Zusatz von Cadmiumionen stärker exprimiert werden.

Keines der untersuchten Gene zeigte jedoch eine erwartete deutliche Regulation unter den gewählten Bedingungen. Während des Hitzeschocks war *CaIPK1* nicht nennenswert heraufreguliert und nur das *CaPLC1*-Transkript war im Cadmium-Medium leicht herunterreguliert. Die Abbildung 3.1.9-1 zeigt die PCR-Ergebnisse im Agarosegel.

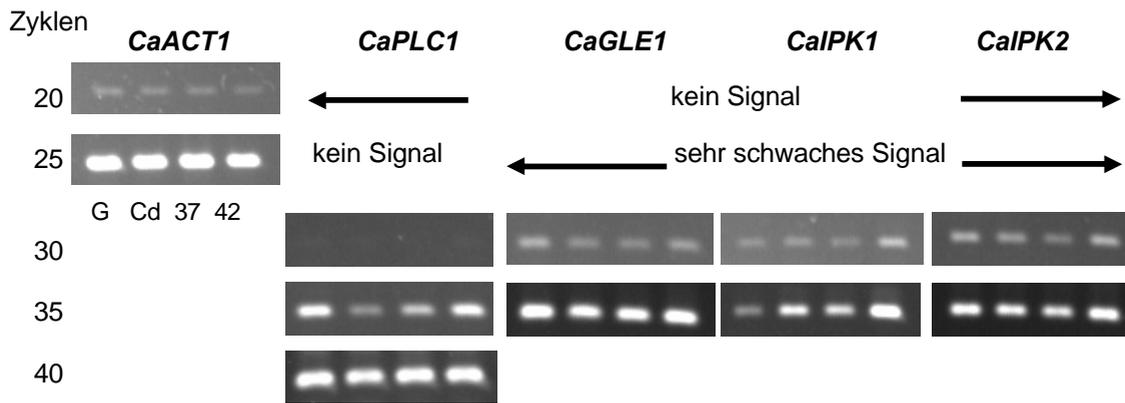


Abbildung 3.1.9-1: Expressionsprofile von *CaPLC1* und anderen Genen, die möglicherweise mit nukleären mRNA Export assoziiert sind, mittels RT-PCR. Die Bedingungen wurden gewählt um zu untersuchen, ob *CaPLC1* ähnliche Funktionen hat, wie *PLC1* von *S. cerevisiae*. *CaACT1* wurde als interner Standard zur Kontrolle der Verwendung gleicher cDNA Mengen genutzt. Verschiedene Zyklenzahlen wurden wie angegeben durchgeführt. Bedingungen: G= SGlyc Medium bei 37°C, Cd= SD+ Cadmium bei 37°C, 37= SD bei 37°C, 42= SD bei 42°C.

3.1.10 Genomweite Expressionsanalyse der $\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Mutante im Microarray-Experiment

Für eine genomweite Untersuchung des Transkriptionsprofils von Mutanten mit *CaPLC1* Deletionen wurde die konditionelle Mutante ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$) in einer Microarray-Analyse untersucht. Dabei wurden Wachstumsbedingungen mit Hitzeschock gewählt, weil die konditionelle Mutante bei Promotorrepression unter diesen Bedingungen die deutlichsten phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Als Vorkulturen wurden der Wildtyp CAF2-1 und die Mutante über Nacht in SD-Medium bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen in SD-Medium, versetzt mit je 2,5 mM Methionin und Cystein, in einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml überführt und für 3 h bei 43°C inkubiert, anschließend für die RNA-Extraktion genutzt.

45 Gene wurden als unterschiedlich exprimiert gefunden. Davon waren nur 4 Gene herunterreguliert (*CaGDH3*, *CaMET18*, *IPF12399*, *CaCDC46*). Sie gehören alle zu verschiedenen funktionellen Gruppen. Eingeteilt in Gruppen mit ähnlicher Funktion fallen bei den hochregulierten Genen 8 Gene ohne Funktion auf. Immerhin 7 Gene kodieren für bekannte und vermutete Transporter (*CaCTR1*, *CaCDR1*, *CaHOL4*, *CaGAP6*, *CaGAP7*, *CaCOX19*, *IPF8642*). Die relativ weit gefasste funktionelle

Gruppe mit Verbindung zu Inositol, Phospholipiden, Glycerol, Vakuolen und Membranen beinhaltet 5 Gene (*CaRTA2*, *CaGUT2*, *CaMSS4*, *IPF14981*, *IPF10262*). In der Gruppe der Transkriptionsregulatoren/DNA-Bindeproteine mit 7 Genen ist *CaNRG1* besonders stark hochreguliert. Weiterhin umfasst die Gruppe der Oxidoreduktasen und Reduktasen 7 Gene. Das am stärksten regulierte Gen ist *CaDDR48*, das ein potentiell hyphenassoziiertes Stressprotein ist. Bei keinem der Gene, von denen in *S. cerevisiae* eine Beteiligung an der Hitzeschockregulation bekannt war (*GLE1*, *IPK1*, *IPK2*), wurde in diesem Experiment eine stärkere Expression gemessen (Tabelle 3.1.10-T1 und 3.1.10-T2).

Tabelle 3.1.10-T1: Die differenziell regulierten Gene in der konditionellen Mutante ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$) bei 43°C in Anwesenheit von 2,5 mM Methionin und Cystein im Vergleich zum Wildtyp unter diesen Bedingungen. Normalisierte Werte über 1 geben die -fache Hochregulation wieder. Werte unter 1 bedeuten eine reduzierte Expression.

Allg. Name	Systemat. Name	Normalisiert	t-test P-Wert	Bekannte oder vermutete Funktion
<i>SFT1</i>	CA5433	1,89	0,100	vSNARE-Aktivität (Homologie)
<i>CTR1</i>	CA1496	1,63	0,099	Kupfertransporter
<i>IPF12399</i>	CA0648	0,31	0,098	Unbekannt
<i>IPF15013</i>	CA2761	1,52	0,097	Pyruvatdecarboxylaseregulator (Homologie)
<i>IPF5830</i>	CA4855	1,54	0,095	Unbekannt
<i>NBN1</i>	CA4688	1,72	0,094	DNA-Bindung-Transkriptionsregulation (Homologie)
<i>NRG1</i>	CA5289	1,71	0,094	Transkriptionsrepressor
<i>GUT2</i>	CA3566	1,79	0,086	Glycerol-3-phosphatdehydrogenase (Homologie)
<i>IPF10564</i>	CA3328	1,55	0,086	Oxidoreduktase, Disulfid-Oxidoreduktase
<i>IPF17676</i>	CA0411	1,70	0,084	ähnlich ScCst13, Chromosomenstabilität
<i>RTA2</i>	CA3607	2,45	0,077	Phospholipidtranslozierende ATPase Aktivität
<i>IPF3092</i>	CA4658	1,55	0,077	Unbekannt
<i>CRH11</i>	CA0375	2,17	0,076	Endopeptidase, Hydrolase (Homologie)
<i>GAP7</i>	CA0757	1,52	0,072	generelle Aminosäurepermease
<i>CDR1</i>	CA6066	1,78	0,072	ABC-Transporter
<i>CDC46</i>	CA2324	0,48	0,069	DNA-Bindung, ATP-Bindung
<i>MSS4</i>	CA0623	1,91	0,068	1-Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase (Homologie)
<i>MET18</i>	CA1560	0,47	0,068	RNA Polymerase II Transkriptionsfaktor
<i>IFM3</i>	CA3742	1,98	0,066	Oxidoreduktase
<i>GDH3</i>	CA1579	0,46	0,062	Oxidoreduktase, Glutamat-Dehydrogenase
<i>SCW1</i>	CA0156	1,53	0,061	Glucanase (Homologie)
<i>RBT2</i>	CA3957	1,92	0,059	(repressed by TUP1 protein 2) Eisenreduktase (Homologie)
<i>HOL4</i>	CA4204	1,68	0,058	Transporter (multidrug resistance protein, major facilitator) (Homologie)
<i>ECM331</i>	CA2181	2,23	0,056	beteiligt an Zellwandbiogenese (Homologie)
<i>IPF11167</i>	CA0759	1,57	0,054	Oxysterol-Bindung
<i>FRE7</i>	CA5621	2,42	0,048	Oxidoreduktase, Eisenchelatreduktase (Homologie)
<i>IPF4999</i>	CA2874	2,23	0,046	DNA-Bindung, 2-Komponenten-Response-Regulator
<i>COX19</i>	CA0768	1,53	0,043	Metallionentransporter, Cytochrom c Oxidase (Homologie)
<i>IPF630</i>	CA6016	1,75	0,041	Nukleinsäurebindung, Chaperon
<i>RPL28</i>	CA1662	2,26	0,040	Strukturbestandteil von Ribosomen (Proteinbiosynthese)
<i>IPF19688</i>	CA0301	2,11	0,039	Unbekannt

<i>IPF12942</i>	CA3604	1,51	0,038	Oxidoreduktase, Δ -12 Fettsäuresaturase (Homologie)
<i>IPF19968</i>	CA3030	1,66	0,037	Zellwandstrukturbestandteil
<i>MXR1</i>	CA0123	1,58	0,032	Methionin-Sulfoxid-Reduktase
<i>GAP6</i>	CA4265	1,55	0,030	generelle Aminosäurepermease (Homologie)
<i>IPF8336</i>	CA2839	1,62	0,030	Unbekannt
<i>IPF407</i>	CA5848	2,10	0,027	Unbekannt
<i>IPF19977</i>	CA3211	1,69	0,025	Unbekannt
<i>RPL18</i>	CA6079	1,56	0,025	Ribosomenbestandteil, Rezeptor, Transporter (Homologie)
<i>IFA14</i>	CA5961	1,59	0,024	Unbekannt
<i>IPF10262</i>	CA1160	1,65	0,023	Prozess: PE-Biosynthese, Vakuolenorganisation, Actincytoskelettorganisation
<i>IPF14981</i>	CA2896	1,59	0,023	Glycerophosphodiesterase-Phosphodiesterase
<i>IPF8642</i>	CA1308	2,88	0,022	ABC-Transporter, ATP-Bindung, ATPase Aktivität
<i>IPF3912</i>	CA4960	2,69	0,002	Transkriptionsfaktor
<i>DDR48</i>	CA4336	4,50	0,001	Stressprotein (Homologie)

Tabelle 3.1.10-T2: Die Gene aus Tabelle 3.1.10-T1 in funktionelle Gruppen zusammengefasst.

	Oxidoreduktase/ Reduktase (7)	Transkriptionsregulation DNA-Bindung (7)	Phospholipide/ Glycerol/ Inositol Vakuolen/ Membran (5)
Transporter (7) <i>CTR1, GAP6, CDR1, HOL4, GAP7, IPF8642, COX19</i>	<i>MXR1, IPF12942, FRE7, GDH3, IFM3, IPF10564, RBT2</i>	<i>NBN1, IPF3912, MET18, CDC46, NRG1, IPF4999, IPF630,</i>	<i>RTA2, GUT2, MSS4, IPF14981, IPF10262</i>
Ribosomen (2) <i>RPL28, RPL18</i>	Funktionen ohne Gruppierung (9) <i>SCW1, SFT1, IPF15013, IPF17676, CRH11, ECM331, IPF11167, IPF19968, DDR48</i>	Unbekannte Funktion (8) <i>IFA14, IPF19977, IPF407, IPF8336, IPF19688, IPF3092, IPF5830, IPF12399</i>	

3.1.11 Weitere Phospholipase C Gene in *Candida albicans* - CaPLC2 und CaPLC3

Zusätzlich zu dem von Bennett *et al.* (1998) beschriebenen *CaPLC1* Gen haben Andaluz *et al.* (2001) noch ein Phospholipase C Gen (*CaPI-PLC*) und ein um 145bp verkürztes homologes Gen in *C. albicans* beschrieben. Auch diese Gene waren hinsichtlich möglicher überlappender und/oder unterschiedlicher Funktionen innerhalb der Zelle Gegenstand dieser Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit werden die Gene im Folgenden mit *CaPLC2* (Stanford-ORF 6.6631, Contig 6-2467) und mit *CaPLC3* (Stanford-ORF 6.5334, Contig 6-2402) bezeichnet. [Assembly 6 des Stanford Genome Technology Center ([http://www-sequence.Stanford.edu/group/candida](http://www.sequence.Stanford.edu/group/candida))] Im Assembly 19 der CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>) entspricht dies CA4152/ORF19.5797 und CA3159/ORF19.1586.

Die Sequenzierung dieser beiden Gene für diese Arbeit ergab keinen Längenunterschied. In der Sequenz von Andaluz *et al.* (2001) ist in Position 111 ein zusätzliches Adenosin im Unterschied zur Sequenz dieser Arbeit, in der dadurch ein STOP-Codon bei 140 bp entsteht. Die eigentliche Gensequenz beginnt am folgenden ATG-Codon in einem anderen Leserahmen. Beide Gene sind 888 bp lang.

Die Sequenzdaten der vorliegenden Arbeit stimmen mit denen der *C. albicans* Genomsequenz des European Consortium Galar Fungail überein (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>). Beide abgeleiteten Plc Proteine sind gleich groß und unterscheiden sich nur in 2 Aminosäuren, in Position 91 und 93, der 295 Aminosäuren langen Proteine. In den 3' und 5' untranslatierten Regionen unterscheiden sich die Gene jedoch sehr.

Die Sequenzen von *CaPlc2* und *CaPlc3* unterscheiden sich sehr von der *CaPlc1* und besitzen stattdessen mehr Ähnlichkeit mit bakteriellen PI-spezifischen Phospholipasen (Andaluz *et al.* 2001; Knechtle *et al.* 2005). Sie bestehen nur aus der X-Domäne, während *CaPlc1*, wie für Phospholipasen der Klasse C bei Eukaryoten typisch, eine X- und eine Y- Domäne aufweist. Ein Sequenzvergleich zwischen der *CaPlc1*- X-Domäne und *CaPlc2* oder *CaPlc3* ergibt jedoch ebenso wie ein Vergleich mit der gesamten *CaPlc1* nur eine Identität von 8,5%. (Abbildung 3.1.11-1) Es gibt kein vergleichbares Gen in *S. cerevisiae*.

a)

ATG AAG CTC CAT TAC TCG CAT GTT GAA TTT CAT TTC TAT ATA TAC TTT CGT
 TTA ATT CTT CAA AAT CTT TTT TTT ATC TTT TCT TTC TTC ATT CCT TCT TTT
 TTT TAT CAT CGA TTG GTT TCT ATT TCA ATT ATT TGT TAA AT ATG GTC GAC
 TAC AAA ACT TGG TTA AAG GAT ATT GAC

b)

BtPLCMSNKKLILKLFICSTIFIT <u>F</u> VFALHDKRVVAASS...VNELENWS
LmPLC-AMYK <u>N</u> YLQRTLVLVLCFILCF <u>F</u> TFPLGGKAYSLNNWNKPIKNSVTTK
CaPLC3MVDYK
CaPLC1-x-	MLLNKELLAGDNGNVDG <u>N</u> EVDIRKSHKHVREFLS <u>F</u> NDILKYSKRLNINVN..TNHLQQIF
BtPLC	KWMQPIPDNIPLARI <u>S</u> IPGTHDSGTFKLQN..PIKQVWGMT <u>Q</u> EYDFRY <u>Q</u> MDHG...ARIF
LmPLC-A	QWMSALPDTTSLAAL <u>S</u> IPGTHDTMSYNGDMTWTTLTKPLAQT <u>Q</u> TMSLY <u>Q</u> LEAG...IRYI
CaPLC3	TWLKDIDNNTRISKL <u>S</u> IPGTHNSAACH.....TALPSVQC <u>Q</u> GASVTE <u>Q</u> LEHG...VRFL
CaPLC1-x-	DQVLLLSATTEKPV <u>S</u> TPLFEKGLNFEQFK..QFVSILKDRKDLQEIWDS <u>L</u> A <u>Q</u> GKEVLQFD
BtPLC	<u>D</u> IRG...RLTDDNTIVLH <u>H</u> G...PLYLYVTLHEFINEAK <u>Q</u> FLKDN <u>P</u> SE <u>T</u> I <u>I</u> MSL <u>K</u> KEY
LmPLC-A	<u>D</u> IRA.....KDNLKIY <u>H</u> G...PIFLNASL <u>S</u> GVLETIT <u>Q</u> FLKKN <u>P</u> K <u>E</u> T <u>I</u> IMRL <u>K</u> DE
CaPLC3	<u>D</u> IRVGKLFVGNVDKDLQVI <u>H</u> GKFPVKIPFPLK <u>L</u> ND <u>S</u> LEEVYK <u>F</u> LAHNS <u>E</u> T <u>V</u> I <u>V</u> SIK <u>Q</u> EG
CaPLC1-x-	<u>E</u> IKN..FIINIQKENFSDDDD...NSTINLIFQKYCSNDNGWNKESL <u>N</u> EYLL <u>S</u> SYSTPY
BtPLC	.EDMKGAE <u>G</u> S <u>F</u> SSTFEK... <u>N</u> YFVD <u>P</u> IFLK.....TEGNIK <u>L</u> G <u>D</u> AR <u>G</u> KI <u>V</u> LL <u>K</u> R.....
LmPLC-A	...QNSNDS <u>F</u> DYRIQP.LINIY <u>K</u> DYFYTTPRTDTSNKIPT <u>L</u> K <u>D</u> V <u>R</u> G <u>K</u> ILL <u>L</u> LS.....
CaPLC3	SDDWDNSQDE <u>F</u> GKLIWDRYV <u>N</u> PNKDRWYLN.....TDIPK <u>L</u> G <u>D</u> AR <u>G</u> KAI <u>L</u> FR <u>R</u>
CaPLC1-x-	REITQTQTNYYDYPLNEYFISSSHNTYLTG.....RQVAGDSSVE <u>G</u> Y <u>I</u> RT <u>L</u> Q <u>R</u> GRCRVE
BtPLCYSGSNESGGYNNFYWPDN. <u>E</u> T <u>F</u> TTT <u>V</u> NQ <u>N</u>
LmPLC-AENHT <u>K</u> K <u>P</u> L..VINS.HK <u>F</u> G <u>M</u> Q <u>F</u> GAS.....
CaPLC3FGVQDEQL <u>K</u> K <u>Q</u> F <u>G</u> FSASS.W <u>T</u> YNT <u>T</u> ND <u>D</u> R.....
CaPLC1-x-	IDIWNGDSNTTTTTVIGTKDDDD <u>K</u> NEYEPVNHGR <u>T</u> F <u>T</u> K <u>P</u> ISFANVIRAIK <u>K</u> F <u>A</u> F <u>I</u> VSPW
BtPLC	.VNVTV <u>Q</u> DKYKVNYDE <u>K</u> VKS... <u>I</u> K <u>D</u> T <u>M</u> DE <u>T</u> M <u>N</u> . <u>N</u> SEDLNHLY <u>I</u> N <u>F</u> T <u>S</u> L <u>S</u> SG..GTAWN
LmPLC-A	.NQVI <u>Q</u> DDYNGPSVK <u>T</u> K <u>F</u> <u>K</u> E <u>I</u> VQ <u>T</u> AY <u>Q</u> . <u>A</u> SKADNK <u>L</u> F <u>L</u> N <u>H</u> I <u>S</u> ATS...LTFT
CaPLC3	.GQFVV <u>Q</u> DFCEVNTADDLPKKIDYV <u>K</u> D <u>L</u> AKRAQDY <u>T</u> SKGDDKV <u>F</u> L <u>N</u> F <u>T</u> S <u>A</u> SN...F.FD
CaPLC1-x-	PLILSLEIHCSPECQI <u>K</u> VVN...IL <u>K</u> D <u>I</u> LGENMIIAPIDIDSVI <u>L</u> P <u>S</u> PAELKHK <u>F</u> I <u>I</u> KV
BtPLC	SPYYYASYINPEIAN..DIKQKNP <u>T</u> R <u>V</u> G <u>W</u> VI <u>Q</u> DYINEKWSPLLYQE <u>V</u> IRANKSLIKE.
LmPLC-A	PRQYAAALNNKVEQFVLNLTSEKVRGL <u>G</u> ILIM <u>D</u> F <u>P</u> E <u>K</u> Q...TIKNIKNNKFN...
CaPLC2	QSCWPQPIAEAMIKG..NIQET <u>F</u> H <u>K</u> G <u>V</u> GI <u>L</u> IVL <u>D</u> YA <u>E</u> T <u>D</u> N..WKLPEALID <u>T</u> N <u>F</u>
CaPLC1-x-	KTTSFQNL <u>I</u> ETENG <u>S</u> F <u>T</u> TSTTTTTTTTTTTTTTATSLSEDNENNKSNSSSTSSFI <u>I</u> RR

Abbildung 3.1.11-1:

- a) Die Gene *CaPLC2* und *CaPLC3* sind, anders als in der Literatur beschrieben, gleich lang. Dargestellt ist die 5' untranslatierte Region von *CaPLC2*. Änderungen nach der Sequenzierung dieser Arbeit im Vergleich zu *PI-PLC* nach PubMed AJ277538 sind wie folgt markiert: dünn und unterstrichen sind 3 unterschiedlich sequenzierte Basen, fett und unterstrichen ist ein CAT Codon, dass in der Literatur als CAAT angegeben wurde. Letzterer Unterschied führte zu einer Verschiebung des Leserahmens (frame shift) und zu einem STOP codon (*TAA*), dadurch ist das ATG von *CaPLC2* erst an Position 145.
- b) Proteinsequenzvergleich abgeleiteter bakterieller *PLC*-Gene (BtPLC *Bacillus thuringiensis*- Accession: P08954, LmPLC-A *Listeria monocytogenes*- Accession: AAA69526) mit Plc2 von *C. albicans* und dem X-Domänenteil (Aminosäure 386 bis 785) des Genprodukts von *CaPLC1*. Kursiv = konserviert in mind. 3 Sequenzen, fett und unterstrichen = konserviert in allen 4 Sequenzen, mit * markiert sind die Positionen der beiden Aminosäuren, in denen sich CaPlc2 und CaPlc3 unterscheiden.

3.1.12 Nachweis des CaPLC2/3 Gens in anderen *Candida* - Arten

In der nicht pathogenen Hefe *S. cerevisiae* ist kein Gen des prokaryotischen PLC-Typs von *PLC2/3* aus *C. albicans* vorhanden. Damit könnten CaPlc2 und 3 eine Rolle bei der Virulenz von *C. albicans* spielen. Deshalb wurde mittels Southern-Blot zunächst untersucht, ob ähnliche Proteine in anderen pathogenen *Candida* – Arten auftreten.

Genomische DNA von 6 verschiedenen *Candida* – Arten wurde in drei verschiedenen Weisen verdaut: mit *EcoRI*, *BamHI* oder *Sall*. Die Hybridisierungsprobe entsprach dem ganzen Gen *CaPLC2/3*. Es trat kein Signal bei der DNA von *C. krusei* und *C. glabrata* auf. Bei der DNA von *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* waren sehr schwache Banden zu beobachten. Jeweils zwei Banden in allen Restriktionen erschienen bei der genomischen DNA von *C. albicans* und *C. dublinensis*. Somit haben nur genetisch nah mit *C. albicans* verwandte *Candida* – Arten ein oder mehrere ähnliche Gene für Proteine dieses prokaryotischen Phospholipasetyps . In Abbildung 3.1.12 sind die Signale im Southern-Blot für *C. albicans* und *C. dublinensis* anhand von 2 Beispielen gezeigt.

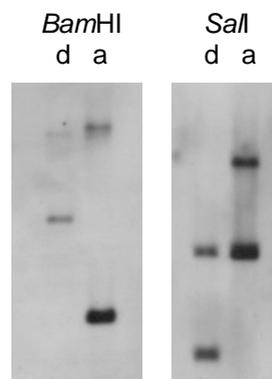


Abbildung 3.1.12: *CaPLC2/3* homologe Gene treten auch in anderen *Candida*-Arten auf. 20 µg genomische DNA von *C. dublinensis* (d) und *C. albicans* (a) wurden mit *BamHI* oder *Sall* verdaut. Für diesen Southern-Blot wurde ein Sondengemisch aus den PCR-Produkten mit den Primerpaaren *piplc2-1/ piplc2-3* und *piplc2-1/piplc2-D2* verwendet. Beide Male zeigen die Proben 2 Banden, jedoch mit unterschiedlichen Größen. Für *C. albicans* entsprechen die Banden jeweils *CaPLC2* und *CaPLC3*.

3.1.13 Die *in vitro* Expression von *CaPLC2* und *CaPLC3* ist ähnlich

Gene mit hoher Sequenzähnlichkeit und ähnlicher Funktion können dennoch sehr unterschiedlich exprimiert werden. Beispiele solcher unterschiedlich exprimierten Gene innerhalb von Genfamilien gibt es bereits für *C. albicans* (Hube *et al.* 2000; d'Enfert *et al.* 2005). Da *CaPLC2* und *CaPLC3* sehr ähnlich sind, die Promotorregionen jedoch sehr unterschiedlich sind, war eine unterschiedliche Expression denkbar und wurde untersucht. Dazu wurden mehrere *in vitro* Bedingungen für Hefe oder Myzelwachstum gewählt, in denen der Stamm SC5314 angezogen wurde (SD, YPD, YPD+5% FCS, SLAD und Sabouraud Glukose Medium). RNA wurde aus Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. optischen Dichten der Kulturen isoliert und die Expression von *CaPLC2* und *CaPLC3* mittels RT-PCR untersucht. Durch die Wahl von 5'-Primern vor dem ATG (36 bzw. 37bp davor) und nur eines Primers in umgekehrter Richtung für beide Gene entstanden genspezifische PCR-Produkte.

Beide Gene wurden unter allen gewählten Bedingungen exprimiert, wobei die Expressionsstärke von *CaPLC2* immer höher erschien. *CaPLC3* zeigte bei gleicher PCR-Zykluszahl und gleicher Annealing-Temperatur schwächere Signale. Zwischen den verschiedenen Kulturmedien stieg die Expression in folgender Weise: YPD+5% FCS < YPD < SLAD < Sabouraud Glukose Medium. Im Unterschied dazu wurde bei sonst gleichem Expressionsmuster für *CaPLC3* das stärkste Signal in SLAD Medium gemessen. Das SLAD Festmedium ist ein Hyphen induzierendes Medium, doch bei den hier verwendeten Proben aus Flüssigkultur lagen nur Hefezellen vor. Diese RT-PCR Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.13-1 dargestellt.

Nicht dargestellt ist das Ergebnis der Expression in Lee's Medium bei pH 4,5 (Hefewachstum) oder 6,5 (Hyphenwachstum). Auch hier war das Signal von *CaPLC2* stärker als von *CaPLC3* und bei beiden war die Expression in der Hefeform höher als in der Hyphenform.

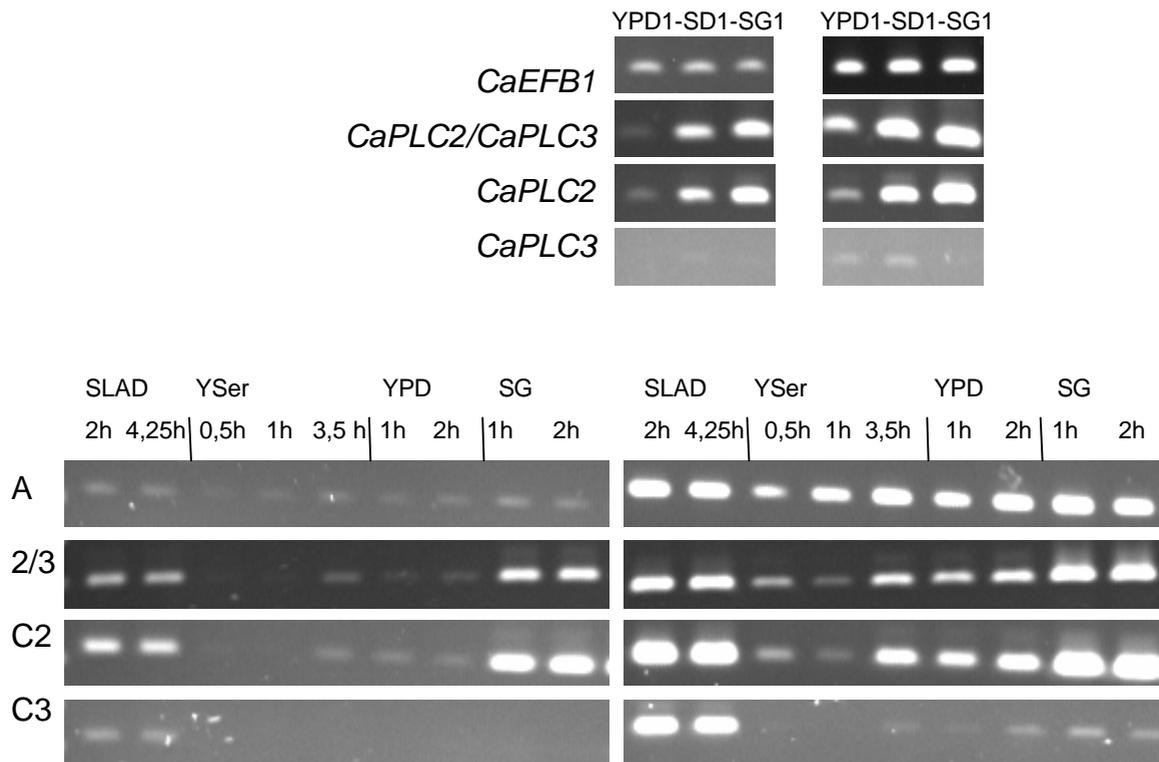


Abbildung 3.1.13-1:

Transkriptionsprofil von *CaPLC2* und *CaPLC3* im Stamm SC5314 bei verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht durch semiquantitative RT-PCR. Das Wachstum der Kulturen erfolgte in SD, YPD, SLAD, SG (Sabouraud Glukose), YSer (YPD + 5% Serum). Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (untere Abbildung, Angaben in h) oder unterschiedlichen optischen Dichten (OD_{600} bei YPD: 1 = 0,8; 2 = 1,7, bei SD: 1 = 0,7; 2 = 1,4; SG: 1 = 1,0; 2 = 1,6) genommen. Die Wahl der Primer ermöglichte die Detektion von Transkripten beider Gene (2/3) oder jeweils eines Gens (C2=*CaPLC2*, C3=*CaPLC3*). Primer für Transkripte von *CaEFB1* und *CaACT1* (A) wurden als interne Kontrollen in den Zyklenzahlen 20 und 25 verwendet. Die anderen Reaktionen wurden für 30 (links) und 35 (rechts) Zyklen durchgeführt.

3.1.14 Die Disruption von *CaPLC2* und *CaPLC3* in einer Doppelmutante

Für eine spätere phänotypische Analyse, die eventuell Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine zulassen könnte, wurden die Gene ausgeschaltet.

Klonierung einer *CaPLC2* und *CaPLC3* Disruptionskassette

Als ersten Schritt zur Herstellung einer *CaPLC2/3*-Disruptionskassette wurde ein mit den Primern *piplc2-D1* (fwd.) und *piplc2-D2* (rev.) generiertes PCR-Fragment in das Plasmid pGEM-T Easy ligiert. Dadurch entstand das Plasmid pDK-6 mit einem 1025 bp großen Insert. Als Template wurde genomische DNA von SC5314 verwendet.

Anschließend wurde im Plasmid pDK-6 die *HindIII* Restriktionsschnittstelle am Ende des Inserts durch eine Mungbohnen-Nuklease-Behandlung des *HindIII* geöffneten Plasmids deletiert und das Plasmid religiert. Das so veränderte Plasmid wurde pDK-7 genannt.

Das Plasmid pDK-7 wurde mit den Primern *pipIc-inv1* (fwd.) und *pipIc-inv2* (rev.) mittels inverser PCR so amplifiziert, dass eine 135 bp große Region innerhalb des *CaPLC2*-Inserts nicht erfasst wurde. Durch die Verwendung oben genannter Primer wurden entsprechend die Schnittstellen *KpnI* und *HindIII* an die Enden des PCR-Produktes angefügt. Nach der PCR wurde das Produkt mit diesen Enzymen verdaut und das *hisG-URA3-hisG*-Fragment, das mit denselben Enzymen aus pMB7 (Fonzi und Irwin, 1993) herausgeschnitten worden war, unter Ringschluss in das Plasmid ligiert. Dadurch ist Plasmid pDK-8 entstanden, das die Disruptionskassette enthält (Plasmidkarten s. Anhang).

Die gezielte Mutation der *CaPLC2/CaPLC3* - Genloci

Plasmid pDK-8 wurde für die gezielte Mutation der Gene *CaPLC2* und *CaPLC3* eingesetzt. Für die Transformation wurde pDK-8 mit *NotI* verdaut, um die Disruptionskassette (5 kb) freizugeben. Ausgangsstamm für die Disruption war der Stamm CAI-4. Nach erfolgter Disruption waren 135 bp von *CaPLC2* oder *CaPLC3* in einem Allel deletiert und durch das *hisG-URA3-hisG* Fragment ersetzt worden. Mit der gleichen Kassette wurden dann, jeweils nach erfolgreicher FOA-Behandlung, alle weiteren 3 Allele schrittweise disruptiert. Alle Teilschritte wurden mittels Southern-Blot überprüft; ein Beispiel ist in Abbildung 3.1.14-1 dargestellt. Bei den Transformanden zeigte sich, dass alle möglichen Kombinationen von disruptierten und nicht disruptierten Allelen während dieser Prozedur entstanden sind. Während der Generation der Doppelmutante wurden daher auch Einzelmutanten von *CaPLC2* bzw. *CaPLC3* hergestellt und isoliert. Für die anschließenden Experimente wurden unabhängige, isogene Mutanten verwendet.

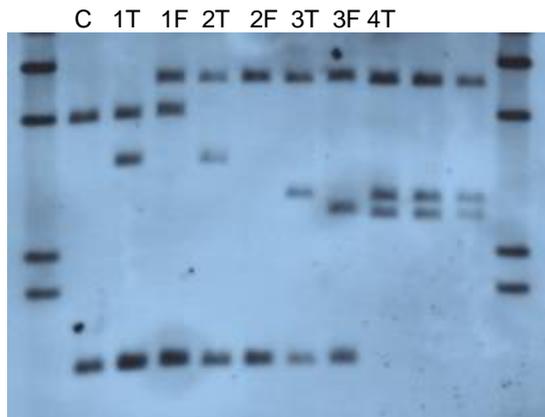


Abbildung 3.1.14-1:

Southern-Blot Analyse der Disruption von *CaPLC2* und *CaPLC3*.

C = CAI-4, 1T = erste Transformation mit der Disruptionskassette, 1F = erste FOA-Behandlung, 2T = zweite Transformation, 2F = zweite FOA-Behandlung usw...

Es wurden je 20 µg DNA der Transformanten mit *EcoRI* verdaut und aufgetragen. Als Sonde wurde ein PCR-Fragment verwendet, das mit den Primern *piplc2-1* und *piplc2-3* amplifiziert wurde. Beidseitig wurde der DIG-Marker II aufgetragen.

DNA des Wildtyps zeigte 2 Banden mit *CaPLC2* (4249 bp) und mit *CaPLC3* (1544 bp).

Durch Integration der Kassette mit *hisG-URA-hisG* entstanden Banden der Größe 3284 bp (*CaPLC2*) und 2813 bp (*CaPLC3*). Daraus entstehen nach FOA-Behandlung *hisG* enthaltende Fragmente einer Größe von 5275 bp (*CaPLC2*) und 2570 bp (*CaPLC3*).

3.1.15 Phänotypische Analyse der *CaPLC2/3* - Doppelmutante

Die entstandenen Einzel- und Doppelmutanten wurden zu ihrer Charakterisierung weiteren Tests unterzogen. Weder bei den Einzelmutanten, noch der Doppelmutante zeigten sich Wachstumsdefizite in Minimal- und Vollmedien im Vergleich zu dem parentalen Stamm. Weder *CaPLC2*, noch *CaPLC3* sind folglich essentiell für das *in vitro* Wachstum.

Mit den Mutanten wurde eine breite Phänotypsuche in Form eines Tropftests mit serieller Verdünnung durchgeführt. Zum Vergleich wurden der parentale Stamm CAF2-1 und die Einzelmutanten von *CaPLC2* und *CaPLC3* aufgetragen. Viele getestete Bedingungen ergaben keine Veränderungen im Phänotyp durch die Gendisruption. So zeigten die Mutanten keinen modifizierten Phänotyp bei verschiedenen Kulturtemperaturen (25°C, 30°C, 37°C und 43°C), verschiedenen Kohlenhydratquellen (Glukose, Galaktose, Sucrose, Succinat, CAA-Medium), unter anaerobischen Bedingungen, bei osmotischem Stress, verursacht durch hohe NaCl-

oder Kohlenhydratkonzentrationen und bei verschiedenen pH-Werten (pH5,7 - 8,0). Darüber hinaus wurde SD-Medium mit verschiedenen Chemikalien versetzt, die unterschiedlichste Auswirkungen auf die Zelle haben, um mögliche Wachstumsunterschiede der Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp zu finden. Diese Verbindungen waren beispielsweise: Benomyl, Calcofluor, Congo Red, Nocodazol, Hygromycin B, Cycloheximid, EDTA, 5-Flucytosin, Tetracyclin, Amorolfin, SDS, Butanol und Isofluran, Ciclopirox, Amphotericin B, Cyclosporin A, CaCl₂, MnSO₄, LiCl, 2,2-Bipyridyl. Die verwendeten Konzentrationen sind unter 2.2.3.9 angegeben. Auch in diesen Tropftests wurden keine modifizierten Phänotypen gefunden. Medien zum Testen von extrazellulärer lipolytischer und proteolytischer Aktivität wie Blutagar und Eigelbagar zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten. Das galt auch für die Fähigkeit der Hyphenbildung auf festen Medien mit 5% und 10% FCS (fötalem Kälberserum).

Dennoch wurden wenige, zwar schwache, doch reproduzierbare Phänotypveränderungen gefunden. Bei 30°C wurde die Doppelmutante durch 20mM Coffein stärker inhibiert als der Wildtyp (CAF2-1) und bildete verzögert Hyphen auf CAA-Medium. Eine Wachstumsinhibition der Doppelmutante wurde ebenfalls bei 37°C durch Itraconazol (1µg/ml) und schwach durch Wasserstoffperoxid (80µM) beobachtet. Auf M199 Medium wurden bei 37°C weniger Hyphen gebildet und auf Spider-Medium erfolgte die Hyphenbildung verzögert. Auf YCB-BSA Platten waren die weißen Höfe um die gewachsenen Kolonien und die Hyphen bei der Doppelmutante später sichtbar. Beispiele der Phänotypcharakterisierung sind in Abbildung 3.1.15-1A gezeigt. Keiner dieser veränderten Phänotypen war bei den Einzelmutanten sichtbar.

Da pathogene Prokaryoten Phospholipasen als Virulenzfaktoren besitzen, die homolog zu CaPlc2 und CaPlc3 sind und *C. albicans* im Unterschied zu der apathogenen Hefe *S. cerevisiae*, die keine CaPlc2 oder CaPlc3-ähnlichen Proteine besitzt, wurde die *CaPLC2/3* Doppelmutante im Mausmodell für systemische Infektionen getestet. Diese Experimente wurden vom Labor von Frank C. Odds (Universität Aberdeen) durchgeführt. Als Vergleichsstamm diente CAF2-1. Sowohl in der Überlebensrate der Mäuse, als auch im Befall von Niere und Gehirn wurden keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante gemessen.

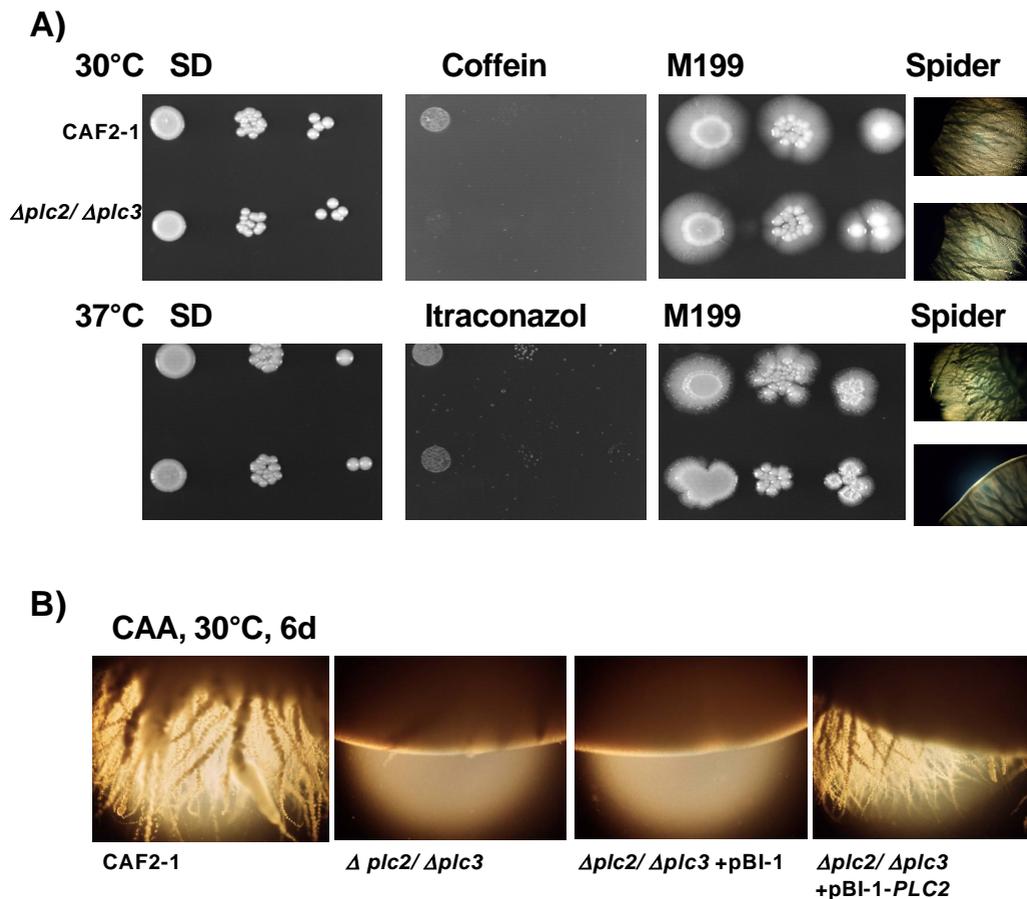


Abbildung 3.1.15-1:

A) Phänotypen der Doppelmutante ($\Delta Caplc2/\Delta Caplc3$).

B) Die verzögerte Hyphenbildung der Mutante ($\Delta plc2/\Delta plc3 = \Delta Caplc2/\Delta Caplc3$) kann durch ein extrachromosomales *CaPLC2* Gen in pBI-1 (*PCK1*-Promotor) aufgehoben werden.

Zellen einer Über-Nacht-Kultur wurden gezählt, verdünnt und in den Konzentrationen von 5×10^3 , 5×10^1 and 5 Zellen pro Tropfen aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug für M199, CAA und Spider Medium 6 d und 3 d für die anderen Medien. Vom Spider und CAA Medium wurde der Kolonierand der Kolonie mit der höchsten Inokulationskonzentration unter dem Mikroskop fotografiert.

3.1.16 Aufhebung der Phänotypen durch ein extrachromosomal exprimiertes *CaPLC2* Gen

Zur Erfüllung der Koch'schen Postulate wurde der Phänotyp der *CaPLC2/3* Doppelmutante in einer konditionell retransformierten Mutante wieder aufgehoben. *CaPLC2* und *CaPLC3* wurden für mögliche Überexpressionsversuche in das Plasmid pBI-1 (Stoldt *et al.* 1997 und Leuker *et al.* 1997) hinter den *CaPCK1*-Promotor ligiert (pDK-14, pDK-16, pDK-18, Plasmidkarten s. Anhang). Das Plasmid pDK-16 wurde außerdem zur Aufhebung des Phänotyps in die *CaPLC2/3* - Doppelmutante

transformiert. Transformanden wurden mittels Southern-Blot Analyse überprüft, indem unverdaute und verdaute genomische DNA aufgetrennt wurde und Sonden für *CaPLC2* und *CaPLC3*, das Ampicillinresistenzgen und den *CaPCK1*-Promotor für aufeinander folgende Hybridisierungen verwendet wurden. Die so entstandenen konditionell retransformierten Mutanten zeigten bei 30°C auf CAA-Medium die gleiche Hyphenbildungsfrequenz wie der Wildtyp. In Abbildung 3.1.15-1B ist ein Tropftest gezeigt.

3.2 Das *CaDOA1*-Gen

Neben dem ersten großen Teil dieser Arbeit zu den Phospholipase C - Genen beschäftigte sich der zweite große Abschnitt mit einem Gen, dessen, anhand von Sequenzvergleichen, vermutete Funktion nur in Zusammenhang mit Phospholipasen stand, selbst aber keine Phospholipase war. Für das Protein des mit *CaDOA1* bezeichneten Gens war eine Funktion als Phospholipase A₂ aktivierendes Protein möglich. Da für *C. albicans* zwar eine Phospholipase A₂ – Aktivität beschrieben wurde (Price und Cawson 1977; Mago und Khuller 1990), jedoch noch kein Phospholipase A Gen bekannt ist, sollten die Experimente dieser Arbeit diese Möglichkeit der vermuteten *CaDoa1*-Funktion näher untersuchen. Die Herangehensweise war wie bei den Genen im ersten Teil der Arbeit die Sequenzanalyse, das Ausschalten des Gens und die Untersuchung der Mutante hinsichtlich des Phänotyps, des Expressionsprofils und der Enzymaktivität.

3.2.1 Analyse der Sequenzdaten von *CaDOA1* (IPF4477; ORF 6.7382; ORF 19.4829)

Bei der genomweiten Suche nach Genen, die im Zusammenhang mit der Aktivität von Phospholipasen stehen, fiel das noch mit IPF 4477 bezeichnete Gen auf. IPF4477 (ORF 6.7382 auf Contig 6.2491) der *C. albicans* Genomsequenz (Assembly 6) des Stanford Genome Technology Center (<http://www-sequence.Stanford.edu/group/candida>) entspricht CA4750 und ORF 19.4829 des Assembly 19 der CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>) und umfasst 2268 Basenpaare, die für 762 Aminosäuren kodieren. Beim Vergleich der Proteinsequenz mit anderen Proteinsequenzen durch die BLAST Funktion des NCBI

zeigte sich eine große Ähnlichkeit zu dem Phospholipase A₂ aktivierenden Protein (PLAP) bei Säugern, wie z. B. der Maus (GI 2507097/ P 27612) und der Ratte (GI 2007098/ P 54319). Die *C. albicans* Proteinsequenz ist zu 29% identisch mit der Sequenz des Säugerproteins PLAP und zu 35,5% mit der von ScDoa1 (=Zzz4=Ufd3) aus *S. cerevisiae* (Tzermia *et al.* 1994). Aus diesem Grunde wurde IPF4477 in *CaDOA1* umbenannt und wurden weitere Sequenzanalysen vorgenommen:

WD repeats

Die große Ähnlichkeit zu ScDoa1 und PLAP basiert auf sogenannten WD Wiederholungen (WD repeats) in diesen Proteinen. Sie bestehen aus sich wiederholenden Aminosäuresequenzen mit konservierten Positionen für GH (Gly-His) und WD (Trp-Asp). Die Konsensussequenz solcher Wiederholungen lautet $\{X_{6-94}[\text{GH-X}_{23-41}\text{-WD}]\}^{N4-8}$ nach Neer *et al.* (1994), wobei mit X die variablen Regionen bezeichnet sind. PLAP besitzt nach einer kurzen N-terminalen Sequenz 4 solcher WD Wiederholungen, an die eine längere funktionale Sequenz am C-Terminus anschließt (s. Abb. 3.2.1-1-A). Unter Nutzung der Motivsuche von Pfam-site/ InterPro (Falquet *et al.* 2002) wurden bei CaDoa1 7 WD Wiederholungen gefunden. Sie beginnen direkt am N-Terminus und erstrecken sich über das erste Drittel des Proteins. Die einzelnen Wiederholungen befinden sich an folgenden Positionen in der Sequenz:

1) Aminosäure 3 bis 40, **2)** 49-84, **3)** 87-123, **4)** 127-164, **5)** 166-204, **6)** 208-245, **7)** 249-286. Dabei ist die zweite und siebte WD Sequenzwiederholung weniger deutlich wegen schlechterer Sequenzhomologien mit der Konsensussequenz.

Mellitinähnliche Sequenz

Die Phospholipase A₂ Aktivierung durch PLAP wird durch eine mellitinähnliche, funktionale Sequenz am C-Terminus bewirkt (Clark *et al.* 1991). Ein Vergleich zweier Mellitinsequenzen aus der NCBI Sequenzdatenbank mit der mellitinähnlichen Sequenz von PLAP bei Clark *et al.* (1991) ergab, dass zwischen diesen drei Sequenzen ein zentrales Element mit den Aminosäuren KVL und mit nur wenigen gemeinsamen Aminosäuren beiderseits davon konserviert ist. Sowohl CaDoa1, als auch ScDoa1 besitzen jeweils einmal die Aminosäurenabfolge KVL, wobei nur die Sequenz von CaDoa1 aus *C. albicans* noch weitere gemeinsame Aminosäuren mit Mellitin aufweist (Abbildung 3.2.1-1-B). Das bedeutet, dass CaDoa1 ebenfalls C-

terminal eine mellitinähnliche Sequenz besitzt, die eine PLA₂ aktivierende Wirkung haben könnte. Innerhalb des CaDoa1 Proteins liegt diese Sequenz auch weiter am C-terminalen Ende des Proteins als das KVL Motiv bei ScDoa1 aus *S. cerevisiae*. Beim Alignment der gesamten Doa1 Proteinsequenzen von *C. albicans* und *S. cerevisiae* werden diese Sequenzabschnitte auch nicht zueinander ausgerichtet, da die umgebenden Aminosäuren mit jeweils anderen Sequenzabschnitten ähnlicher sind und zu einer anderen Anordnung der Sequenzen zueinander führen.

A)



B)

	1	33
Mellitin-x	GIGAILKVL S..TGLPALISWIKRKRQE.....	
Mellitin-y	GIGAVLKVLT..TGLPALISWIKRKRQQ.....	
Maus-PLAP-TEIL	ESPLIAKVL T..T.EPPIITPVRR.....	
CaDoa1-TEIL	.LMMILKVLN NNLVGTTLFVQLYIDPCGT.....	
ScDoa1-TEIL	.KTSVMKVL P..VKQYLIMENYNPDTIFNGIVK	

Abbildung 3.2.1-1:

A) Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Säugerproteins PLAP (oben) und CaDoa1 (unten). PLAP besteht aus einer kurzen N-terminalen Sequenz, gefolgt von 4 WD Wiederholungen und einer Mellitinsequenz am C-Terminus (Peitsch *et al.* 1993). CaDoa1 besitzt dagegen beginnend am N-Terminus 7 WD Wiederholungen und am C-Terminus eine mellitinähnliche Sequenz. WD Wiederholung 2 und 7 besitzen eine geringere Sequenzähnlichkeit mit dem Konsensuschema.

B) Alignment zweier Mellitinsequenzen (x - PubMed Accession P01502 [*Apis dorsata*] und y - nach Clark *et al.* 1991) mit mellitinähnlichen Sequenzabschnitten der Proteine PLAP aus der Maus (nach Clark *et al.* 1991), Doa1 aus *C. albicans* (CaDoa1) und Doa1 aus *S. cerevisiae* (ScDoa1) (Blau: in allen 5 Sequenzen vorhanden, Rot: in 3 der Sequenzen)

Lokalisation in der Zelle

Nach der TargetP V1.0 Lokalisationsvorhersage (Emanuelsson *et al.* 2000) ist CaDoa1 ein cytosolisches Protein.

Mögliche O-Glycosylierungen

Mit NetOGlyc 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-2.0) wurden 3 mögliche O-Glycosylierungsstellen, namentlich Threonin in Position 50 und 576 und Serin in Position 661 ermittelt.

Mögliche Phosphorylierungen

Mit Hilfe von NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos) konnten 47 mögliche Phosphorylierungsstellen in der Proteinsequenz gefunden werden. Dazu gehören 27 Serinreste in den Positionen 31, 40, 55, 83, 114, 134, 234, 309, 314, 356, 369, 370, 372, 417, 424, 441, 445, 495, 505, 506, 509, 514, 526, 707, 708, 709, 734, sowie 12 Tyrosinreste in den Positionen 43, 91, 131, 151, 326, 409, 461, 465, 491, 621, 632, 743 und 8 Threoninreste in den Positionen 22, 35, 45, 207, 286, 569, 574, 732.

Motiv für die Interaktion mit Kernrezeptoren

Mitglieder der WD repeat Proteinfamilie WIPI (**WD**-repeat protein Interacting with Phospho-Inositides) besitzen das Motiv LXXLL in der Proteinsequenz zur Interaktion mit nukleären Rezeptoren (Proikas-Cezanne *et al.* 2004). Dieses Motiv ist in der Proteinsequenz von CaDoa1 nicht vorhanden.

PFU-Sequenz

Zu der von Mullally *et al.* (2006) in ScDoa1 beschriebenen Ubiquitin-Bindedomäne (PFU) ist eine ähnliche Sequenz in CaDoa1 zu finden. Sie befindet sich im Bereich von Aminosäure 354 bis 448.

Die Promotorregion

Gene, die bei Stickstoffmangel verstärkt transkribiert und beim Stickstoffkatabolismus reprimiert werden, haben mindestens zwei UAS_{NTR} Sequenzen vor (upstream) der TATA-Box, deren Kernsequenz in *S. cerevisiae* GATAA ist (Watt und Piper 1997). In den 999 Nukleotiden vor dem ATG Codon von *CaDOA1* ist die Sequenz GATAA dreimal vorhanden: bei -507, -561 und bei -991 bp.

Die Bindung des HAP2/3/4 Komplexes an einen Promotor führt in *S. cerevisiae* zur Derepression des Kohlenstoffkatabolismus (Roig und Gozalbo 2002). Eine solche

Bindesequenz, z.B. ACCAATCA (Watt und Piper 1997), ist in der *CaDOA1* Promotorregion als ACCAATTTA bei bp -78 zum ATG nicht vollständig identisch vorhanden. Sie enthält aber die CCAATT Box, an die der entsprechende Faktor auch bindet. Nach Roig *et al.* (2002) lautet die HAP2/3/4 Konsensusbindesequenz $TN^A/GTTGGT$. Dieser Sequenz ist die bei *CaDOA1* bei -885 bp zum ATG zu findende Sequenz TGGTTACT am ähnlichsten. Aber auch die oben erwähnte Sequenzfolge bei -78 bp ist dieser Konsensussequenz sehr ähnlich.

Hitzeschock Gene werden über das dem Stress-Antwort-Element (stress response element –STRE) ähnlichen Promotorelement aktiviert. Die Konsensussequenz AGGGG oder CCCCT reagiert dabei nicht nur auf die geringe cAMP – Proteinkinase Aktivität, sondern auch auf osmotischen Stress, oxidativen Stress und Stickstoffmangel. Abwandlungen, z.B. das AGGGA Element beim *ScSSA3* Gen, geben nur eine Antwort auf die sinkende cAMP Konzentration und nicht auf die anderen genannten Stressformen (Watt *et al.* 1997; Roig *et al.* 2002). Alle drei genannten Konsensussequenzen sind in der Region bis -999 bp vom ATG aus beim *CaDOA1* Gen nicht vorhanden.

Der Transkriptionsfaktor Efg1 bindet an die E-Box in der Promotorregion von Genen (Leng *et al.* 2001; Sohn *et al.* 2003), deren Motiv mit CANNTG beschrieben wird. Bei -170, -639, -889 und -918 bp befinden sich mit den Basenfolgen CATTTG, CATATG, CAGGTG und CAAATG dazu passende Sequenzen im *CaDOA1* Promotor.

Die Bindesequenz für den Transkriptionsfaktor Mig1 lautet G/C C/T G G G/A G (Murad *et al.* 2001) und kommt bei -481 bp zum ATG mit der Folge GTGGAG im Promotor von *CaDOA1* vor. Die für eine Regulation über den Repressor Nrg1 nicht zwingend erforderliche NRE-Sequenz (Nrg1-responsive element: A/C A/C/G C C C T) ist nicht in den 999 bp vor dem ATG von *CaDOA1* vorhanden.

Bei -207 bp vom ATG Codon von *CaDOA1* aus befindet sich eine TATA Sequenz. Die hefetypischen Transkriptionssequenzen TCAA und TTATT sind vorhanden und befinden sich stromaufwärts vom ATG an folgenden Stellen:

TCAA bei -5, -19 und -179 bp; TTATT bei -72 und -143 bp. In der Position -3 zum ATG befindet sich ein Adenin (A), wie es bei den meisten Hefegenen vorhanden ist.

An sechster Stelle ist ein Thymin (T) zu finden, wie es in stark exprimierten Hefegenen konserviert ist.

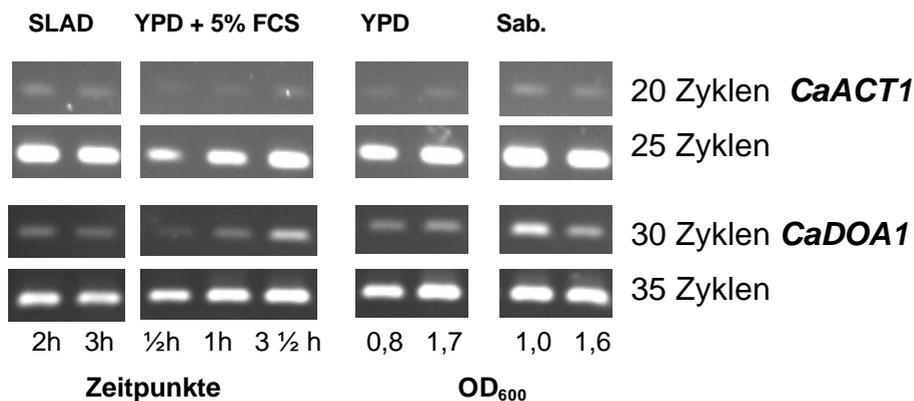
Terminationssequenzen

Von den Prototypsequenzen zur Termination der Transkription sind TATGT bei +19 bp (stromabwärts) nach dem STOP - Codon und TAGT bei +180 bp zu nennen.

3.2.2 Untersuchung der *in vitro* Transkription von *CaDOA1*

Die Analyse der Sequenzdaten von *CaDOA1* (s. 3.2.1) lassen eine starke Expression des Gens vermuten. Weitere Experimente sollten das Expressionsmuster von *CaDOA1* näher charakterisieren. Mittels semiquantitativer PCR wurde die *in vitro* Expression des Gens *CaDOA1* in Medien für die Hefeform (YPD, Sabouraud Glukose, Lee's pH 4,5) und für die Hypheninduktion (SLAD, YPD + 5% FCS, Lee's pH 6,5) untersucht. Als Wildtypstamm diente hierbei SC5314. Dabei wurden in jedem Medium mehrere Proben genommen, um eine mögliche Änderung der Expression im Wachstumsverlauf detektieren zu können. Eine Vorkultur in Lee's Medium pH 4,5 bei 25°C wurde für eine Hypheninduktion in einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml in Lee's Medium pH 6,5 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Probennahme erfolgte nach 1, 2 und 3 Stunden. Die mikroskopische Auszählung ergab eine Zunahme der Hyphen mit einem Maximum (99%) bei 3 h. Aus der gleichen Vorkultur wurde in frisches Medium (Lee's pH 4,5 bei 25°C) eine Hefezellkultur mit einer Anfangsdichte OD_{600} von 0,1 angeimpft. Die Proben für die RNA-Isolierung wurden nach 7, 10 und 13 Stunden genommen. Zu diesen Zeitpunkten hatten die Kulturen eine Zelldichte mit OD_{600} -Werten von 0,5; 1,0 und 1,7 und befanden sich in einer exponentiellen Wachstumsphase. In beiden Lee's Medien war ein Anstieg der *CaDOA1*-Transkriptmenge nachzuweisen. Für die anderen Medien wurden Zellen einer Vorkultur mit SD-Medium bei 30°C verwendet und 1:100 in YPD bzw. 1:1000 in Sabouraud Glukose Medium verdünnt angeimpft. Die Proben wurden jeweils an 2 Zeitpunkten bei fortgeschrittener exponentieller Phase entnommen. Zur Hypheninduktion wurden 2×10^7 Zellen/ml der Vorkultur in SLAD Medium und YPD mit 5% FCS angeimpft. Nach 2 und 3 Stunden erfolgte die Probennahme beim SLAD Medium und nach $\frac{1}{2}$, 1 und $3\frac{1}{2}$ Stunden bei YPD mit 5% FCS. Auch unter diesen Bedingungen wurde *CaDOA1* stets exprimiert, allerdings annähernd gleichmäßig

stark, verglichen mit den Banden des Kontrollgens *CaACT1*, das als unverändert exprimiert gilt. Damit ist *CaDOA1* unter den gewählten Konditionen *in vitro* konstitutiv exprimiert und wird nur unter wenigen Bedingungen (Lee's Medium, YPD + 5%FCS) reguliert. Die Banden der PCR-Produkte verschiedener Zyklenzahlen sind in Abbildung 3.2.2-1 gezeigt.



Lee's Medium

pH 4,5 (Hefe)

pH 6,5 (Hyphen)

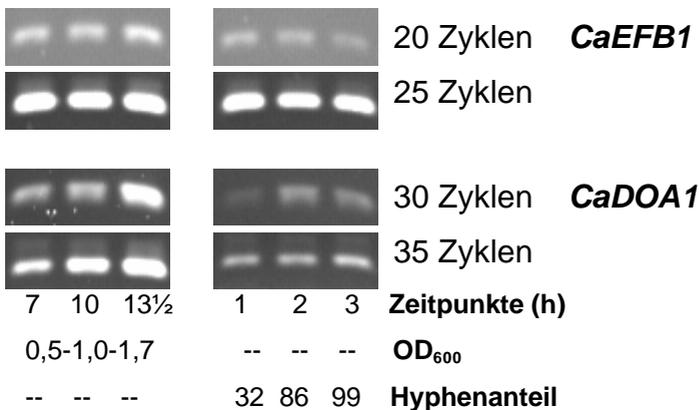


Abbildung 3.2.2-1: Die Darstellung zeigt Banden zweier Zyklenzahlen der semiquantitativen PCR mit cDNA von RNA - Proben aus verschiedenen Medien für die Hefe- und Hyphenform.

Für die Untersuchungen wurde der Stamm SC 5314 verwendet. Als Kontrolle wurde die Expression von *CaEFB1* bzw. *CaACT1* gemessen. *CaDOA1* wird unter allen Bedingungen gleichmäßig stark exprimiert und nur im Lee's Medium reguliert. (Sab. = Sabouraud Glukose).

3.2.3 Disruption des *CaDOA1* Gens

In einem nächsten Schritt sollte das Gen ausgeschaltet werden, um eventuell nach weiteren Untersuchungen der Mutante Rückschlüsse auf Funktion von *CaDoa1* ziehen zu können.

A) Klonierung der Disruptionskassette

Die Disruptionskassette wurde in 4 Schritten kloniert. Zuerst wurde mit den Primern DOA1-3 (fwd.) und DOA1-4 (rev.) ein 433 bp großes Fragment (+1181 bis +1614 zum ATG) aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO ligiert. Dabei wurde mit dem forward Primer eine *SaI* Schnittstelle für weitere Klonierungen eingefügt. Aus dem so entstandenen Plasmid pDK-9 wurde dann das *CaDOA1*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *SaI* herausgeschnitten und in den mit diesen Enzymen geöffneten Vektor pMB7 stromabwärts von der *hisG-URA3-hisG* Kassette ligiert, um Plasmid pDK-10 zu erhalten. Anschließend wurde mit den Primern DOA1-1b (fwd.) und DOA1-2a (rev.) aus genomischer DNA von SC5314 ein 745 bp großes Fragment von -274 bp bis +471 bp zum ATG amplifiziert und in pCR[®]2.1-TOPO kloniert. In dieses Plasmid, pDK-11, wurde nach dem Öffnen das *HindIII* und *KpnI*- Fragment aus pDK-10 kloniert, um die Disruptionskassette in Plasmid pDK-12 zu generieren. Alle Klonierungsschritte wurden jeweils durch mehrere Restriktionen kontrolliert, die u.a. in den Plasmidkarten im Anhang angegeben sind.

B) Die gezielte Mutation des *CaDOA1*-Genlocus'

Für die Transformation von *C. albicans* wurde pDK-12 mit *HindIII* und *XhoI* verdaut, um die Disruptionskassette als lineares Fragment zu erhalten. Der Stamm CAI-4 war Ausgangsstamm für die Mutation von *CaDOA1*. Nach erfolgter Disruption sind in dem entsprechenden *CaDOA1*-Allel 710 bp (von bp +472 bis +1180 zum ATG) in der ersten Hälfte des Gens deletiert. Nach einer FOA-Behandlung wurde mit der gleichen Kassette das zweite Allel disruptiert. Alle Schritte wurden mittels Southern-Blot überprüft, ein Beispiel zeigt Abb. 3.2.3-1. Mehrere unabhängige isogene Mutanten wurden hergestellt und in den anschließenden Experimenten verwendet.

Als Vergleichsstamm zur Mutante wurde in den Experimenten der Wildtypstamm CAF2-1 allein oder mit Stamm SC5314 herangezogen.

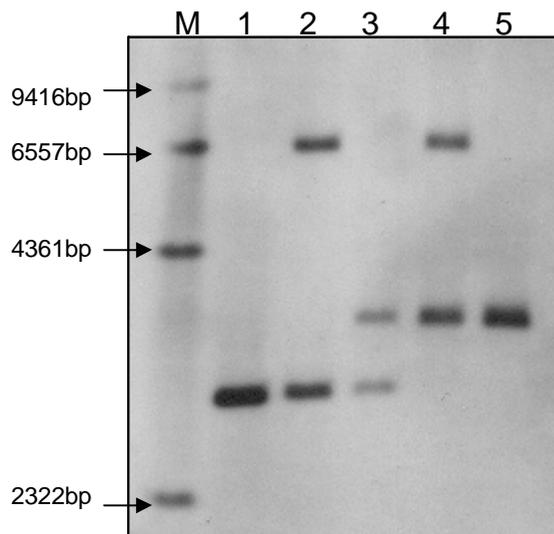


Abbildung 3.2.3-1: Southern-Blot Analyse der einzelnen Disruptionsschritte zur *CaDOA1*-Mutante. Aufgetragen wurde der *Hind*III Verdau der genomischen DNA, die Sonde wurde mit den Primern DOA1-1a und DOA1-2a generiert. Spur 1: Wildtyp (SC5314) 2923 bp, Spur 2: 1. Transformation - heterozygote Mutante mit *URA3* (2923 bp + 6891 bp), Spur 3: 1. FOA - heterozygote Mutante ohne *URA3* (2923 bp + 4077 bp), Spur 4 – 2. Transformation - homozygote Mutante mit *URA3* (4077 bp + 6891 bp), Spur 5: 2. FOA-Behandlung - homozygote Mutante ohne *URA3* (4077 bp), Spur M: DNA-Molekulargewicht-Marker II (Roche).

3.2.4 Wachstumsvergleich von Wildtyp und *CaDOA1*-Mutante in Flüssigkultur

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der *CaDOA1*- Mutante im Vergleich zum Stamm CAF2-1 in Flüssigkultur untersucht, da bereits mit bloßem Auge Wachstumsunterschiede in der Kultur sichtbar wurden. Dazu wurde der Wildtyp und isogene Mutanten in einer Vorkultur in SD-Medium bei 30°C über Nacht angezogen und anschließend in einer Dichte von 10^6 Zellen/ ml in SD- und YPD-Medium angeimpft und bei 37°C kultiviert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Bestimmung der Streuung bei 600 nm (OD_{600}) beobachtet. Abb. 3.2.4-1A zeigt einen typischen Verlauf der OD_{600} Werte. Die Zunahme der optischen Dichte der Mutantenkulturen war deutlich geringer als die der Wildtypkulturen im jeweiligen Medium. Beim Zählen der Zellen der Vorkultur (30°C, SD) für die Experimente fielen Unterschiede in der Zahl granulärer Strukturen innerhalb des Cytoplasmas auf. Die *CaDOA1*-Mutante enthält mehr granuläre Strukturen unterschiedlicher Größe als CAF2-1, wie in Abb. 3.2.4-1B zu sehen ist. Zur Abklärung der Art dieser Strukturen wurden die Zellen gefärbt und mikroskopiert. Unter Verwendung des LIVE/DEAD®

Yeast Viability Kit von Molecular Probes wurde so ausgeschlossen, dass es sich bei den in der Mutante vermehrt auftretenden Granula weder um Vakuolen, noch um Zellkerne handelt. Abb. 3.2.4-1C zeigt eine Auftragung der unter Phasenkontrasteinstellungen am confocalen Lasermikroskop gezählten Zellen, die nach der Anzahl der Granula eingeteilt wurden.

An drei Zeitpunkten der oben genannten Wachstumskurve (2, 4 und 6 h) wurden Proben zur Mikroskopie genommen. Die mikroskopischen Bilder vom Wachstum in SD-Medium bei 37°C zeigen, dass der Wildtyp vor allem in der Hefeform wuchs, während die Mutante Filamente ausbildete (Abb. 3.2.4-2). Dadurch konnte der geringere Anstieg der OD₆₀₀-Werte bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp erklärt werden, da die gebildeten Filamente Aggregate bildeten. In der YPD-Kultur bei 37°C sah es ähnlich aus (nicht dargestellt). Zum Zeitpunkt von 4 h wurden in den Proben aus SD-Medium beim Wildtyp 98% Hefezellen gezählt, während die Mutante zu 92% in Filamentform vorlag. In der YPD-Kultur lagen 96% Hefezellen beim Wildtyp vor und 48% Filamente bei der Mutante. Die von der Mutante in nicht induzierenden Medien gebildeten Filamente waren ein Gemisch aus Pseudomycel und echten Hyphen. Das zeigten sowohl ungefärbte, als auch mit Calcofluor gefärbte Proben, in denen die Lage der Septen zur Differenzierung der Filamentformen noch besser zu erkennen war (Abb. 3.2.4-3).

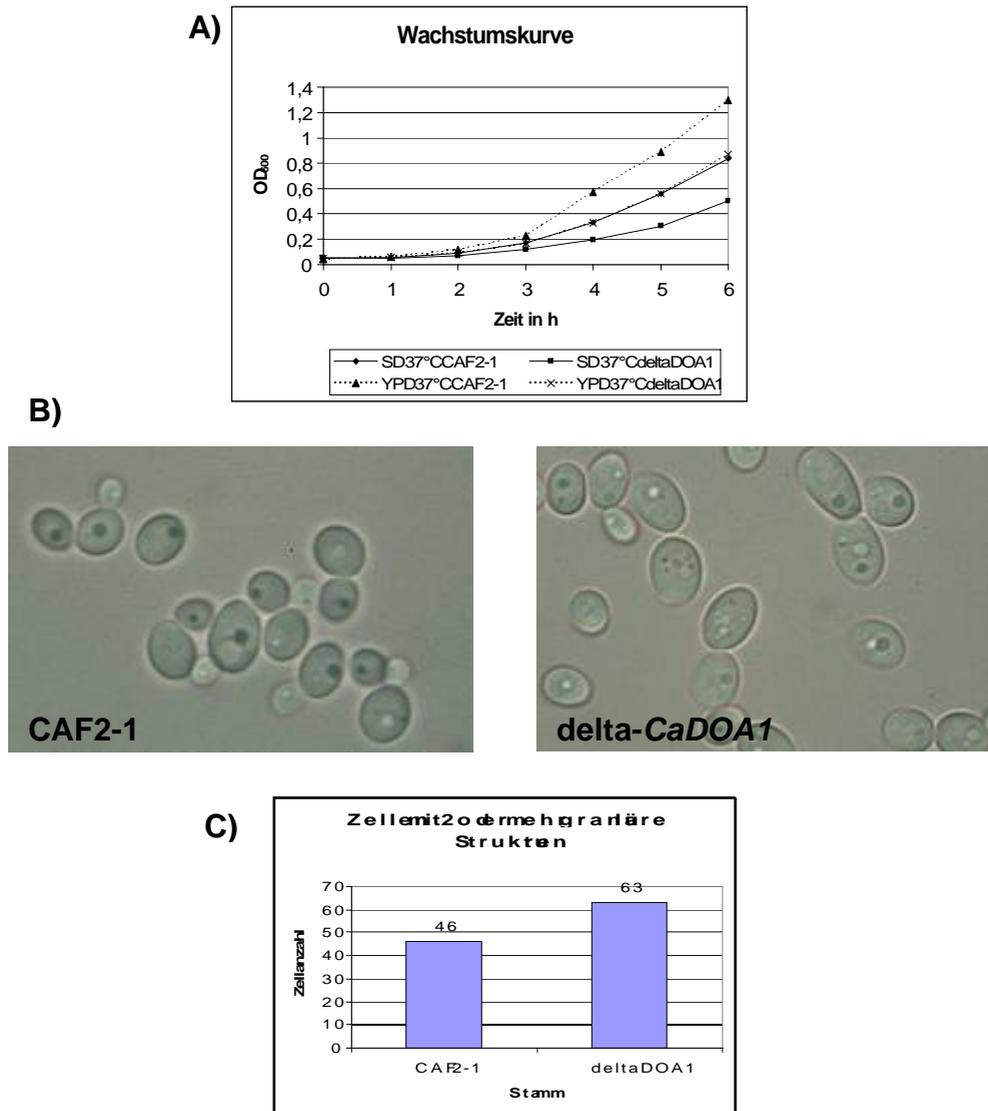


Abbildung 3.2.4-1:

- A) Darstellung typischer Wachstumskurvenverläufe von Kulturen der *CaDOA1*-Mutante und Wildtypstämmen in den Medien SD und YPD (Zunahme der OD₆₀₀ Werte). Zum Zeitpunkt 0 h- waren 10⁶ Zellen/ml in der Kultur.
- B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen des Wildtyps und der *CaDOA1*-Mutante aus einer Über-Nacht-Kultur in SD-Medium bei 30°C (Vorkultur zu allen Experimenten zur *CaDOA1*-Mutante) bei 1,25 x 100facher Vergrößerung. Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) betrug jeweils 2,3. Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Anzahl granulärer Strukturen.
- C) Graphische Darstellung der Anzahl der Zellen mit mindestens 2 granulären Strukturen/Zelle bei 100 zufällig ausgewählten Zellen beim Wildtyp und der Mutante in Vorkulturen wie in B). Die Standardabweichung beträgt in beiden Fällen 1. Der Unterschied ist nicht signifikant.

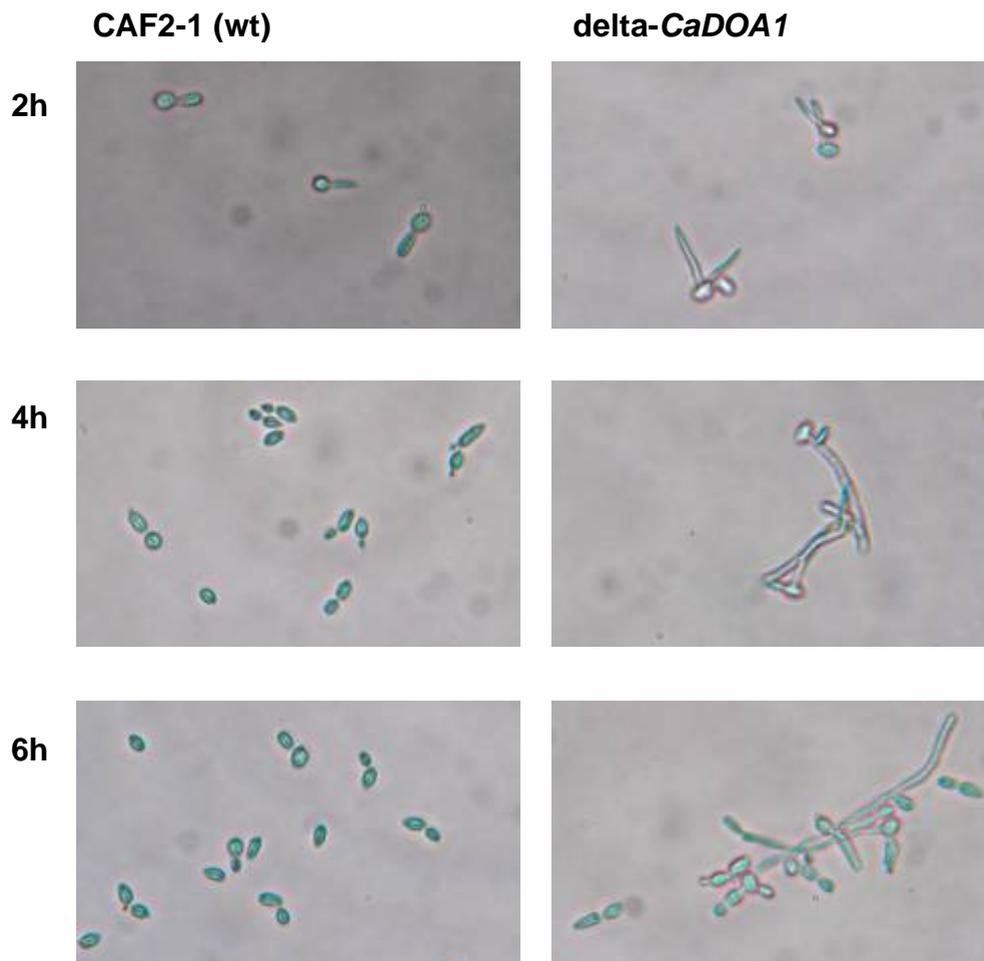
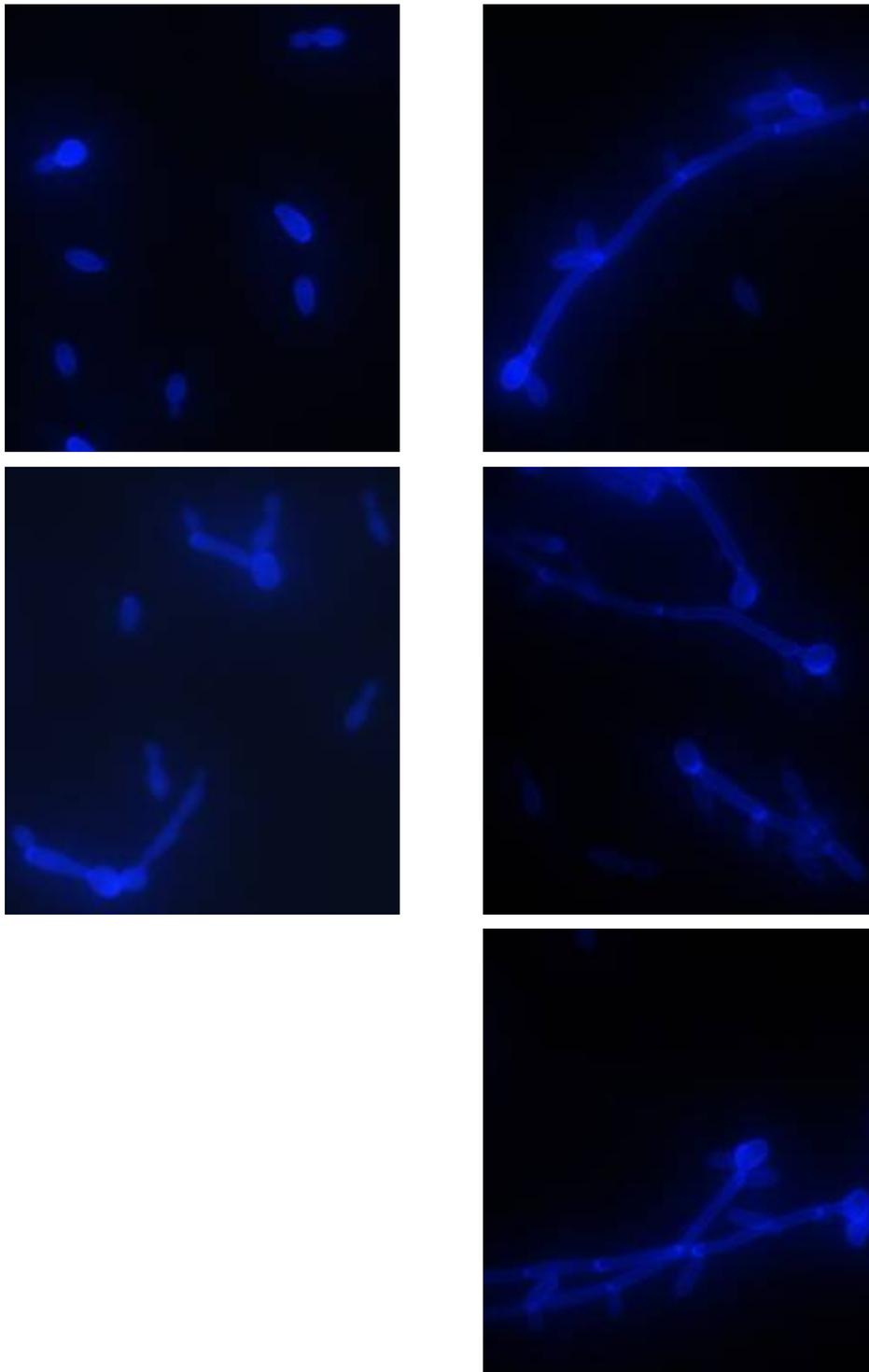


Abbildung 3.2.4-2: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen des Wildtyps und der *CaDOA1*-Mutante aus SD-Flüssigkulturen bei 37°C zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h. Die Mutante bildete Filamente, deren Anzahl und Länge zunahmen.



CAF2-1 (wt)

delta-*CaDOA1***Abbildung 3.2.4-3:**

1,5 x 60fache Vergrößerung von Zellen des Wildtyps und der *CaDOA1*-Mutante nach Calcofluor-Färbung. Die Zellen wurden einer SD-Flüssigkultur nach 7 h Inkubation bei 37°C entnommen (Start mit 10^6 Zellen/ml). Der Wildtyp (CAF2-1) lag vor allem in der Hefeform vor und bildete vereinzelt Pseudomycel. Mutante (rechte Spalte) bildete verstärkt filamentöse Zellen (echte Hyphen oder Pseudomycel).

3.2.5 Weitere phänotypische Analysen der *CaDOA1*-Mutante

Weitere phänotypische Analysen der *CaDOA1*-Mutante wurden mit Tropftests serieller Verdünnungen der Kulturen auf unterschiedlichen Medien durchgeführt. Um eine möglichst gleiche Ausgangssituation der Zellen von Wildtyp und Mutante zu haben, wurde eine mehrtägige, täglich gleichartig in frisches Medium überimpfte Vorkultur in SD-Medium bei 30°C als Ausgang für die Tropftests verwendet. Zur Absicherung der Ergebnisse der Tropftests wurden diese mindestens zweimal mit 2 isogenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (CAF2-1) und zur heterozygoten Mutante durchgeführt. Tabelle 3.2.5-T1 listet alle getesteten Medien und Bedingungen auf und bezeichnet ebenfalls das phänotypische Ergebnis. Die auffälligste phänotypische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp war die Hyperfilamentation unter nicht induzierenden Bedingungen. Die Hyperfilamentierung ging, soweit untersucht, immer mit einer veränderten, unebenen Oberfläche der Tropfkolonie einher, wobei nicht in allen Fällen einer veränderten Oberfläche makroskopisch auch Filamente zu sehen waren. Aufgrund von mikroskopischen Stichproben und da das entstandene Unebenheitsmuster auf verschiedensten Medien immer wieder gleich aussah, kann eine solche Korrelation allgemein angenommen werden.

Auf YPD-Medium bei 30°C bildete zwar auch der Wildtyp nach einigen Tagen Filamente, jedoch weniger und nur im Festmedium, nicht jedoch innerhalb der oberflächlichen Kolonien, wie Abbildung 3.2.5-1A zeigt. Beim Abkratzen der getropften Kolonien zeigte sich auch ein Unterschied in der Konsistenz. Der Wildtyp hatte eine weiche, feine Konsistenz, wohingegen die gesamte Mutantenkolonie als feste Masse abgenommen werden konnte. Dieses Phänomen rührte offensichtlich von den unterschiedlichen Zellformen her, aus denen die auf der Medienoberfläche gewachsenen Kolonien bestanden. In Abb. 3.2.5-1A ist zu sehen, dass CAF2-1 nur aus Hefezellen bestand und die Mutante aus einem Gemisch von zum Teil sehr langen Filamenten und Hefezellen. Unter Bedingungen, bei denen auch der Wildtyp filamentös auf den Kulturplatten wuchs, bildete die *CaDOA1*-Mutante schneller, mehr und meist längere Hyphen als der Wildtyp.

Die Medien SD und YPD wurden zusätzlich zu den Angaben in Tab. 3.2.5-T1 auch bei den Temperaturen 25°C und 40°C verwendet. Unter diesen Temperaturen

zeigten die Stämme das gleiche Wachstumsverhalten und den gleichen Phänotyp wie bei 30°C bzw. 37°C.

Dennoch war für die beobachteten Änderungen der Phänotypen eine deutliche Temperaturabhängigkeit zu erkennen. Beispielsweise waren für eine Wachstumsinhibition der Mutante oft höhere Konzentrationen der zugesetzten Verbindungen bei 30°C im Vergleich zu 37°C nötig. So trat die Wachstumshemmung der Mutante bei 30°C bei Konzentrationen von 120 µM Cadmiumsulfat oder 4% Butanol auf, dagegen bei 37°C schon bei Konzentrationen von 30µM CdSO₄ oder 2% Butanol.

Auch auf den Blutagar-Platten verhielt sich die Mutante bei beiden Temperaturen sehr unterschiedlich, fast gegensätzlich, denn bei 37°C war das Wachstum deutlich gehemmt und die Tropfkoloniefarbe grau-braun. Um diese Kolonien klarte das Medium allerdings auf. Bei 30°C bildete die Mutante dagegen deutlich stärker Hyphen, als der Wildtyp, und das Medium klarte, wie beim Wildtyp, nicht deutlich auf. Beim YCB-BSA-Medium erschien zusätzlich zur früheren und stärkeren Filamentbildung bei 30°C auch der typische weiße Hof früher als beim Wildtyp, klarte aber gleichschnell wieder auf. Glycerol und Acetat als Kohlenstoffquelle führten im Medium SGlycAc nur bei 37°C zu einer Hemmung des Mutantenwachstums, bei 30°C jedoch nicht. Die Zugabe von 10 µM CuCl₂ ins SGlycAc-Medium führte dagegen auch bei 30°C zu einer Hemmung.

Die Hemmung durch 1 mM EDTA (vor allem bei 30°C) konnte durch Zugabe von MnCl₂ (15 mM), ZnCl₂ (25 µM, 50 µM) oder CuCl₂ (50 µM, 100 µM) mit in genannter Reihenfolge sinkender Intensität aufgehoben werden. Die Ionenzugabe führte zu einer generellen Wachstumsverbesserung, auch beim Wildtyp, da EDTA als Chelator dieser Ionen gilt.

Beispiele der beobachteten Phänotypunterschiede sind in Abbildung 3.2.5-1A bis C gezeigt.

Tabelle 3.2.5-T1: Darstellung von Bedingungen und Ergebnis der Phänotypstests von $\Delta CaDOA1$ im Vergleich zum Wildtyp.

HF bedeutet Hyperfilamentierung und steht für mehr, frühere und/ oder längere Hyphen bei der Mutante als beim Wildtyp. Bei --- wurde kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Eine Inhibition der Mutante ist mit **IN** ausgewiesen, **K** steht für eine veränderte, unebene Kolonie-/Tropfenoberfläche. Wich der in einigen Medien übliche Hof von der Kontrolle ab, steht ein **+** in der Spalte. Bei fehlenden Daten oder nicht getesteten Bedingungen oder wenn weder Wildtyp noch Mutante wuchsen wurden keine Eintragungen in die Tabelle gemacht. Angaben in Klammern () weisen auf einen nur schwach unterschiedlichen Phänotyp hin.

Getestete Bedingung	30°C	37°C
Standardmedien		
SD	---	---
YPD	HF	K
Sabouraud	---	---
SD anaerob		---
YPD anaerob		HF
Hypheninduktion		
Spider	K	HF
M199	HF	HF
FCS 5%	HF	HF
FCS 10%	---	HF
Extrazelluläre lipolytische/ proteolytische Aktivität		
Blut	HF	IN, K+
Eigelbagar	+	---
YCB-BSA	HF+	HF
Osmotischer Stress		
Sorbitol 6%, 7%	---	---
Galaktose 5%	HF	---
NaCl (0,5 M –1,25 M)	---	---
YPD 5%Galaktose	K	K
Oxidativer Stress		
2% KAc 3%Glycerol (SGlycAc)	---	IN
2% KAc 3%Glycerol (SGlycAc) + 10 mM CuCl ₂	IN	
2% KAc 3%Glycerol (YGlycAc)	K	K
H ₂ O ₂ (0,44–0,88 mM)	IN	
pH-Sensitivität		
pH 5,7	HF	---
pH 6,0	HF	K
pH 6,5	HF	K
pH 7,0	HF	K
pH 7,5	HF	K
pH 8,0	HF	---
Chelatoren		
EDTA (1 mM)(Mn ⁺⁺ ,Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Ni ⁺⁺ , Zn ⁺⁺)	IN	IN

Ciclopirox (Fe ⁺⁺)	---	---
2,2'-Dipyridyl (Fe ⁺⁺)	---	IN
Ionenstress/ Signaltransduktion		
LiCl (0,24 M)		---
CaCl ₂ (300 mM)	---	---
MnCl ₂ (30 mM)	---	K
Coffein (10 mM)	---	IN
Schwermetallstress		
Cadmiumsulfat (15-100 µM)	---	IN
Cadmiumsulfat (120 µM)	IN	
Proteinsynthesehemmer		
Hygromycin B (400 µg/ml)	---	IN
Cycloheximid (1 µg/ml)	---	(IN)
Tetracyclin (10 µg/ml)	---	---
Mikrotubulihemmung/ störung		
Nocodazol (4 µg/ml)	---	IN
Benomyl (10 µg/ml)	---	---
Zellwandfunktionalität		
Calcoflour (800 µg/ml)	---	IN
Congo Red (100 mg/ml)	---	
Zelloberflächenintegrität (Zellmembranintegrität)		
SDS (0,005%)	IN	IN
Amphotericin B (0,2 µg/ml)	---	IN
Amorolfin (3 µg/ml)	---	IN
Itraconazol (1 µg/ml)	IN	IN
Casaminoacids+Itraconazol	IN	---
Succinat+Itraconazol	---	IN
Andere KH-Quellen		
Galaktose 2% (SGal)	---	---
Galaktose 2% (YGal)	---	---
Sucrose 2% (SSucr)	IN	
Casaminoacids	HF	K
Succinat	HF	K
Calcineurin A Hemmung		
Cyclosporin A (50-100 µg/ml)	---	---
PLD-Inhibitor		
Propranolol (50-500 µM)	---	IN
Butanol (0,5-5%)	IN	IN
Flüchtiges Anästhetikum		
Isofluran (100-500 µl)	IN	

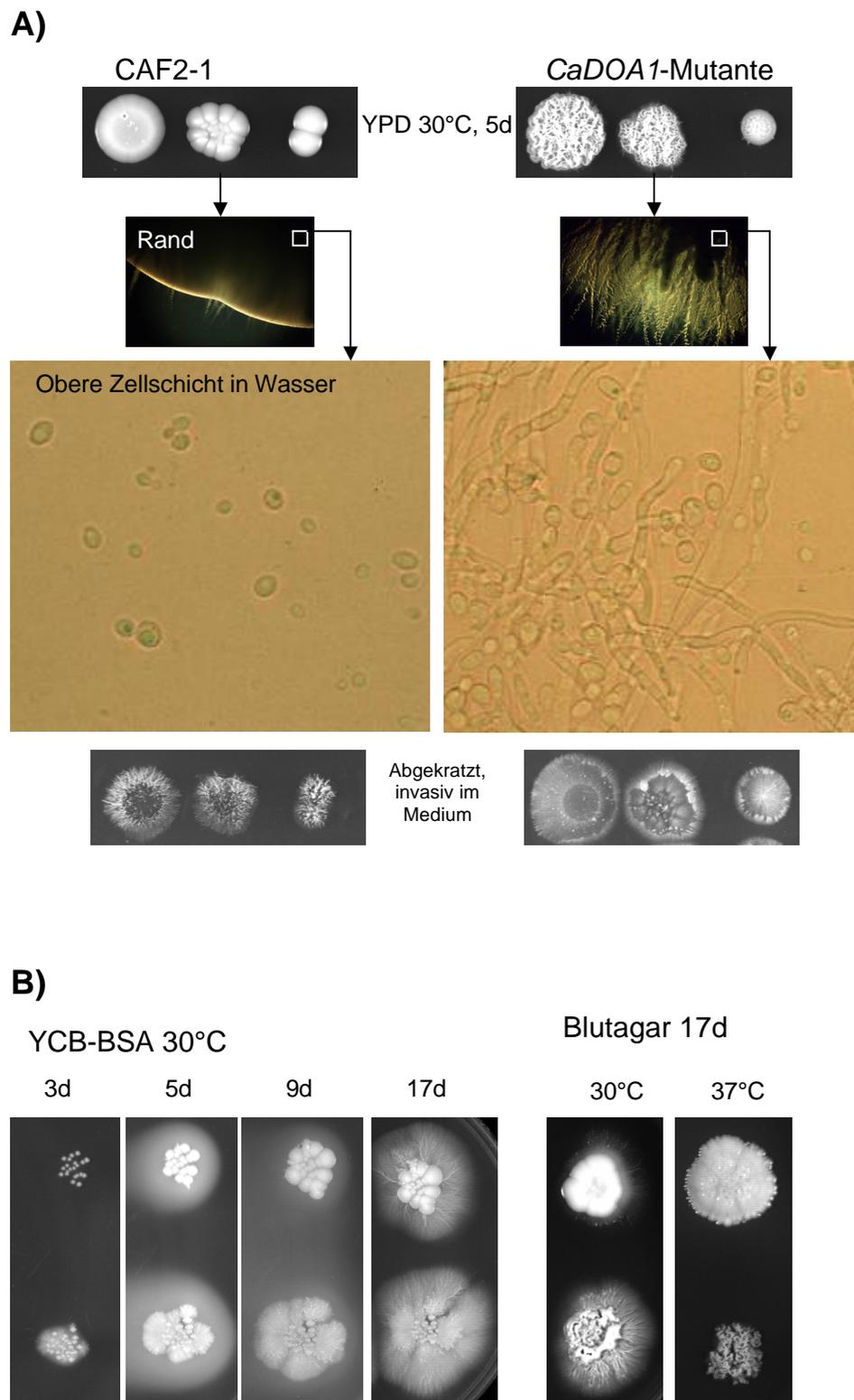


Abbildung 3.2.5-1: Beispiele von veränderten Phänotypen der *CaDOA1*-Mutante (Beschreibung s. unten)

C)

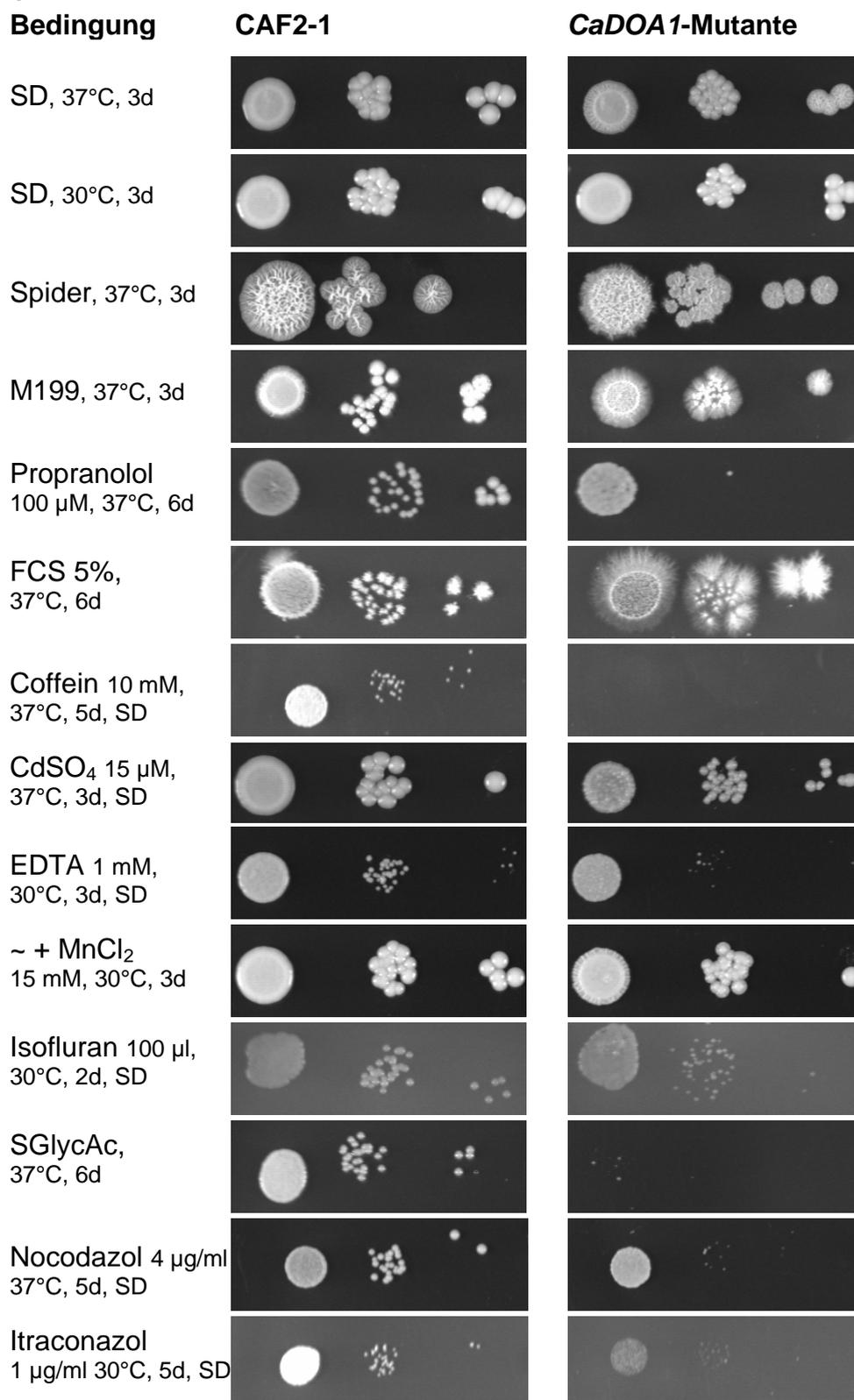


Abbildung 3.2.5-1: Beispiele von veränderten Phänotypen der *CaDOA1*-Mutante
(Beschreibung s. unten)

Abbildung 3.2.5-1: Beispiele von veränderten Phänotypen der *CaDOA1*-Mutante

- A) Der Phänotyp auf YPD bei 30°C oben (Tropfkonzentrationen wie in C), darunter der Rand der zweiten Kolonie, aufgenommen mit dem Phasenkontrast Objektiv. Darunter Zellen von der Kolonieoberfläche in Wasser aufgenommen, 1,25 x 40 fach vergrößert. In der untersten Reihe die Tropfttestplatte mit den im Medium verbliebenen invasiven Filamenten.
- B) Änderungen der Koloniemorphologien im zeitlichen Verlauf auf YCB-BSA Medium und Blutagar.
Wildtyp (*CAF2-1*) (oben) und Mutante (unten); gezeigt sind jeweils die Kolonien der 50 Zellen-Tropfen.
- C) Phänotypbeispiele auf Tropfttestplatten mit den Konzentrationen 5×10^3 , 5×10^1 und 5 Zellen je Tropfen (5 μ l).

3.2.6 Aufhebung der Phänotypen durch extrachromosomal exprimiertes

CaDoa1

In Analogie zu den Koch'schen Postulaten ist der veränderte Phänotyp einer Mutante auf das Fehlen eines Proteins bzw. dessen Aktivität zurückzuführen, wenn durch Wiedereinbringung des aktiven Proteins der Phänotyp aufgehoben wird und erneut dem des Wildtyps ähnlich ist. Diese Beweisführung wurde im Falle der *CaDOA1*-Mutante durch eine Transformation eines extrachromosomal und regulierbar exprimierten Gens erbracht. Dazu wurde das Plasmid pBI-1 benutzt, das den *PCK1*-Promotor von *C. albicans* enthält (Stoldt *et al.* 1997; Leuker *et al.* 1997). Gene unter der Kontrolle dieses Promotors werden bei Glukosemangel exprimiert. Mit den Primern DOA1-UE1 und DOA1-UE2 wurde das gesamte Gen einschließlich 200 bp nach dem STOP-Codon (als Terminatorregion) aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert und eine *Bgl*II Schnittstelle an den Enden des PCR-Produktes eingefügt. Das in den Vektor pGEM T-Easy ligierte Fragment ergab Plasmid pDK-21. Nach der Kontrolle des Gens mittels mehrerer Restriktionen und Sequenzierung wurde es über die *Bgl*II Schnittstellen in das Plasmid pBI-1 kloniert, woraus pDK-22 resultierte. (Plasmidkarten s. Anhang)

Die *URA3*-negative *CaDOA1*-Mutante (Klon 10.3-1-25-1) wurde mit dem Plasmid pDK-22 transformiert und die Transformanten im Southern-Blot überprüft, indem unverdaute und mit *Bgl*II bzw. *Hind*III verdaute DNA nacheinander mit Sonden für das *CaDOA1* Gen, ein Ampicillinresistenzgen und den *CaPCK1*-Promotor hybridisiert wurde. Zur Kontrolle wurde die *URA3*-negative *CaDOA1*-Mutante auch mit dem leeren Plasmid pBI-1 transformiert und wie oben beschrieben getestet. Positive

Klone wurden für einen Phänotypscreen auf geeigneten, den *CaPCK1*-Promotor induzierenden, Medien genutzt. Getestet wurde auf den Medien CAA-, B-Medium, SGlycAc, CAA-Medium + Isofluran oder Itraconazol (1 µg/ml) bei 30°C und 37°C. Auf allen Medien zeigte sich, dass ein extrachromosomal exprimierbares *CaDOA1* Gen in der Lage ist, den Phänotyp der *CaDOA1*-Mutante aufzuheben. In Abbildung 3.2.6-1 werden Beispiele der Tropftests gezeigt. So wurde die veränderte Kolonieoberfläche und Hyperfilamentierung auf CAA-Medium ebenso aufgehoben, wie die Hemmung durch Itraconazol auf dem gleichen Medium, sowie auf SGlycAc, und die Hemmung und Hyphenbildung auf B-Medium.

Eine andere Form der Retransformation bei *C. albicans* ist eine Integration des entsprechenden Gens in das Genom. Dazu wird das entsprechende Gen unter der Kontrolle des eigenen Promotors in den RP10 Locus des Genoms integriert. Für diesen Weg wurde in dieser Arbeit das *CaDOA1* Gen in das Plasmid pCIP10 kloniert (pDK-24 und pDK-25 s. Plasmidkarten und Beschreibung im Anhang) und für die Transformation der *CaDOA1*-Mutante eingesetzt. Potentielle positive Transformanden zeigten eine Aufhebung des Phänotyps der Mutante im Tropftest (nicht gezeigt), wurden aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr im Southern-Blot bestätigt.

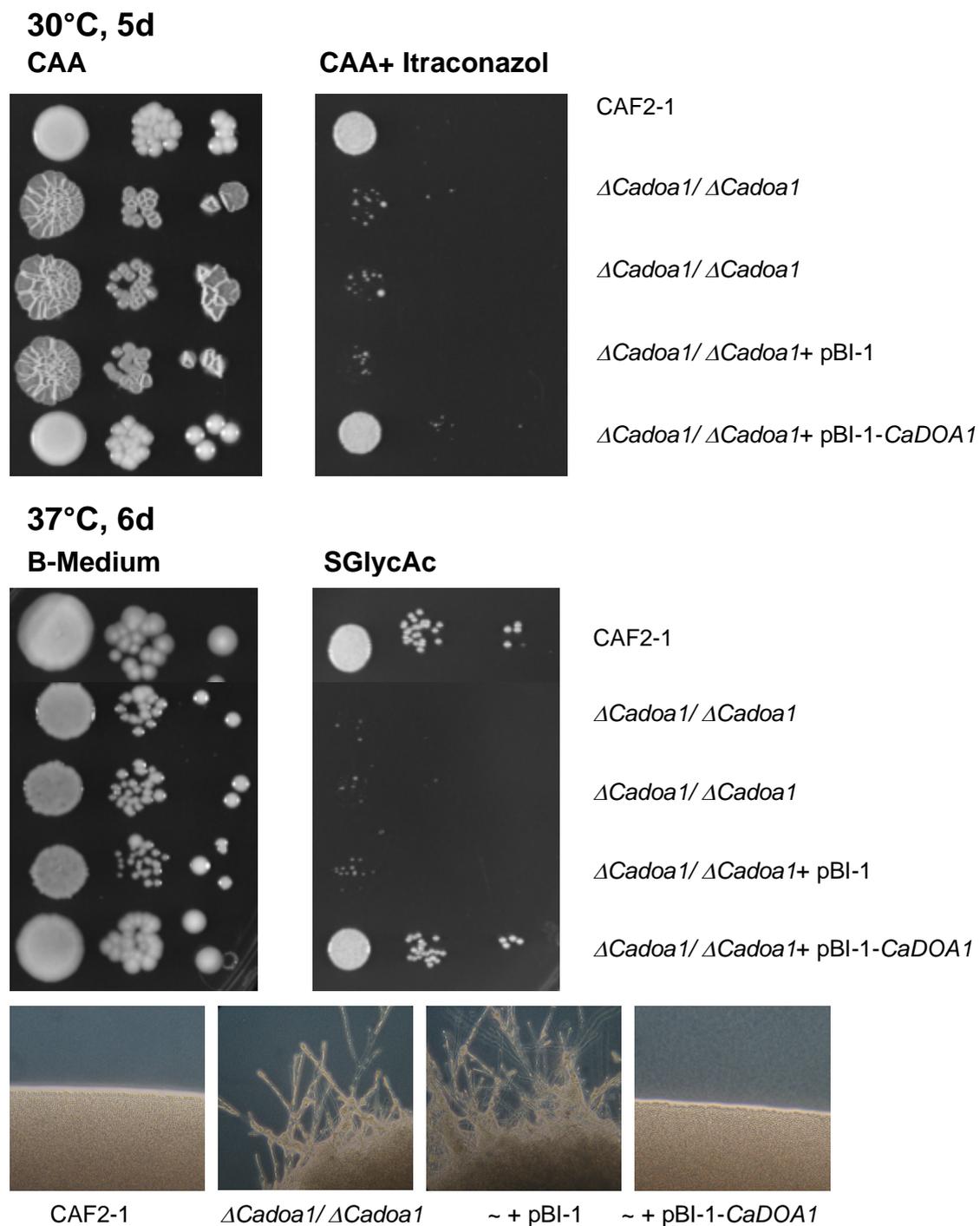


Abbildung 3.2.6-1: Das extrachromosomale *CaDOA1* Gen unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors hebt auf Glukosemangelmedien den Phänotyp der *CaDOA1*-Mutante auf.

Aufgetropft wurden 5000, 50 und 5 Zellen/ Tropfen (obere Abb.).

In der unteren Abbildung (Detail) ist der Rand einer Kolonie (Ausgangskonzentration 5×10^3 Zellen) auf einer Platte mit B-Medium nach 6 d Inkubation bei 30°C gezeigt (20 fach vergrößert).

3.2.7 Überexpression des *CaDOA1* Gens

Das Plasmid pDK-22 (s. 3.2.6) wurde ebenfalls in den Stamm CAI-4 transformiert. Damit sollte eine zusätzliche, regulierbare, extrachromosomale Transkription des *CaDOA1* Gens erfolgen, die zu einer erhöhten Expression des Proteins (CaDoa1) in der Zelle führt. Auf den *PCK1*-Promotor induzierenden Medien kann dadurch eine Phänotypenänderung verursacht werden. Positive Transformanden (Identifizierung mittels Southern-Blot wie oben beschrieben) wurden gemeinsam mit dem Stamm CAF2-1 und CAI-4 + pBI-1 als Kontrolle auf folgenden Medien im Tropftest untersucht: SD, YPD, B-Medium, CAA-Medium, B-Medium + 1 µg/ml Itraconazol, CAA-Medium + 1 µg/ml Itraconazol, SGlycAc, 5% FCS-Agar und 10% FCS-Agar. Die Agarplatten wurden sowohl bei 30°C, als auch bei 37°C inkubiert. Auf keiner Agarplatte konnte eine Änderung des Phänotyps im Vergleich zu den Kontrollen oder im Vergleich von induzierenden und nicht induzierenden Medien beobachtet werden. Eine leichte Wachstumshemmung auf allen Medien bei 37°C wurde allein durch das Plasmid hervorgerufen, nicht jedoch durch die Überexpression von *CaDOA1*. Die Kontrolle CAI-4 + pBI-1 und die überexprimierenden Transformanden verhielten sich gleich.

3.2.8 Untersuchung einer möglichen Induktion der Transkription von *CaDOA1* in vitro

Der modifizierte Phänotyp einer Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Topftest unter bestimmten Bedingungen, kann darauf hindeuten, dass unter diesen Bedingungen im Wildtyp die Transkription des entsprechenden Gens induziert wird. Um diese Regulationsmöglichkeit für *CaDOA1* im Wildtyp zu untersuchen, wurden einige Bedingungen aus dem Tropftest auf das Verhalten der *CaDOA1*-Transkription im Vergleich zur Kultur in SD-Medium bei 37°C überprüft. Eine Vorkultur des CAF2-1 Stammes in SD-Medium bei 30°C wurde in einer Dichte von 10^6 Zellen/ml in frischem SD-Medium angeimpft und bei 37°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6$) inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur in jeweils 40 ml Aliquots geteilt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und im gleichen Volumen des eigentlichen Testmediums resuspendiert. Die Testbedingungen waren: SD-Medium bei 42°C, SD-Medium mit 60 µM Cadmium bei 37°C und SGlyc-Medium bei 37°C.

Als Kontrolle diente SD-Medium bei 37°C. Nach 1 h in den genannten Bedingungen wurden die Zellen für die RNA-Isolation geerntet.

Semiquantitative PCR diente zur Untersuchung einer möglichen Erhöhung der *CaDOA1*-Transkription im Wildtyp (CAF2-1) unter den gewählten Bedingungen.

Weder durch oxidativen Stress im Glycerol-Medium, noch durch das Zellgift Cadmium war eine Induktion der *CaDOA1*-Transkription nachzuweisen (s. Abbildung 3.2.8-1). Die RNA-Ausbeute der Hitzeschockproben war deutlich geringer, denn Transkription und Splicen sind unter Hitzeschockbedingungen eingeschränkt (Bracken *et al.* 1999; Yost *et al.* 1991; Vogel *et al.* 1995). Das Primerpaar für die *CaEFB1*-Kontrolle ist nicht einsetzbar, denn es entstehen die Banden von Transkripten von vor und nach dem verzögerten bzw. gehemmten Splicen. Im Vergleich zu gleich starken *CaACT1*-Produktbedingungen erfolgte beim Hitzeschock ein Expressionsanstieg von *CaDOA1* (s. Abbildung 3.2.8-1).

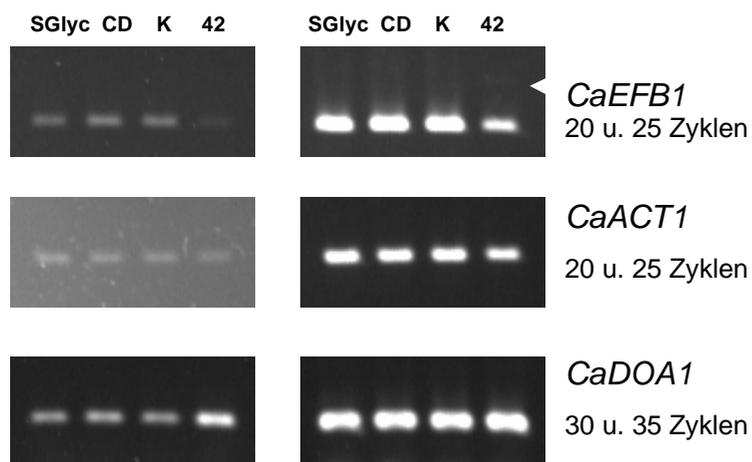


Abbildung 3.2.8-1: Semiquantitative PCR zum Testen einer möglichen Induktion der Transkription von *CaDOA1* in SGlyc-Medium bei 37°C (SGlyc), SD-Medium mit 60 μ M Cadmium bei 37°C (Cd) und SD-Medium bei 42°C (42) im Vergleich zur Kontrolle mit SD-Medium bei 37°C (K). Verwendet wurde der Stamm CAF2-1. *CaEFB1* und *CaACT1*-PCR dient der Kontrolle der gleichen cDNA-Menge. Der Keil weist auf die Bande des vorhandenen langen *EFB1*-Transkripts, da das Splicen beim Hitzeschock verzögert abläuft.

3.2.9 Microarray-Analyse der Transkriptionsprofile von *CaDOA1*-Mutante und Wildtyp

Zur Untersuchung der Unterschiede im Transkriptionsprofil von *CaDOA1*-Mutante und CAF2-1 (wt) wurde für die Microarray-Analyse eine Bedingung gewählt, bei der beide Stämme sich bereits mikroskopisch phänotypisch unterscheiden. Damit könnte gegebenenfalls die Ursache für diesen phänotypischen Unterschied herausgefunden werden, sofern dieser transkriptionell bedingt ist. Eventuell wären Rückschlüsse auf die Funktion von *CaDoa1* möglich. Es wurde RNA von Zellen verwendet, die, von der Vorkultur (30°C, SD) mit einer Dichte von 10^6 Zellen/ml angeimpft, 7 Stunden bei 37°C in SD-Medium kultiviert wurden. Die *CaDOA1*-Mutante (Klon 1P-1-4) wurde mit dem Wildtyp-Stamm CAF2-1 verglichen. Die dargestellten Ergebnisse sind die Zusammenfassung von 3 Arraydaten. Dabei wurden ein „dye swap“ (Farbstoffwechsel bei der cDNA-Markierung) und eine biologische Wiederholung durchgeführt. Für einige Gene wurde mittels semiquantitativer PCR nochmals deren Regulation nachgewiesen. Insgesamt waren 96 Gene in den beiden Stämmen unterschiedlich transkribiert (P-Value von 0,05 oder kleiner im t-Test). Die Stärke der Regulation der Gene reicht von 11,1mal bis 1,4mal höher. Nur 2 Gene (*CaHIR1*, *CaMET3*) wurden herunterreguliert (beide 2,1fach). Die ausführliche Liste der höher exprimierten Gene befindet sich im Anhang. In Abbildung 3.2.9-1 sind die 96 Gene nach funktioneller Ähnlichkeit in Gruppen eingeteilt. Dabei ist von etwa einem Drittel der Gene (36 Gene) die Funktion weder bekannt, noch vermutet. Die 11 Gene der Gruppe „Unspezifische Funktion“ haben zwar eine bekannte oder erwartete Funktion, doch sind die Funktionen alle verschieden von einander und passen in keine der anderen gewählten Gruppen. Mit 13 Genen, die im weiteren Sinn eine Funktion beim Proteinabbau (über das Proteasom, Ubiquitin oder Ubiquitin-unabhängige Proteolysewege) haben, ist diese Gruppe am größten. Die nächst größte Gruppe beinhaltet Gene, die eine Funktion in Zusammenhang mit RNA und DNA (Transkription, Replikation) besitzen. Immerhin 7 Transportergene wurden in der Mutante hoch reguliert. Jeweils 5 Gene sind der Kategorie „Fett“ und „Energie“ zuzuordnen. Aus den Kategorien „Aminosäure“, „Stress“ und „Oxidativer Stress“ waren jeweils 2 bzw. 3 Gene höher exprimiert. Obwohl das mikroskopische Bild der Proben für den Array ein Filamentgemisch aus Pseudomycel und echten Hyphen neben Hefezellen bei der Mutante zeigte (s. Calcofluor-Färbung in Abb. 3.2.4-3), ist

nur *CaHWP1* als filamenttypisches Gen deutlich hochreguliert. Von ausgewählten Genen ist die semiquantitative PCR zur Bestätigung des Array-Ergebnisses in Abbildung 3.2.9-2 dargestellt.

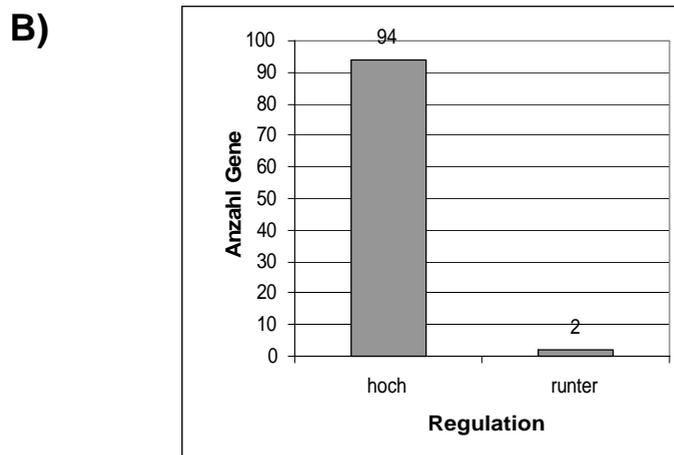
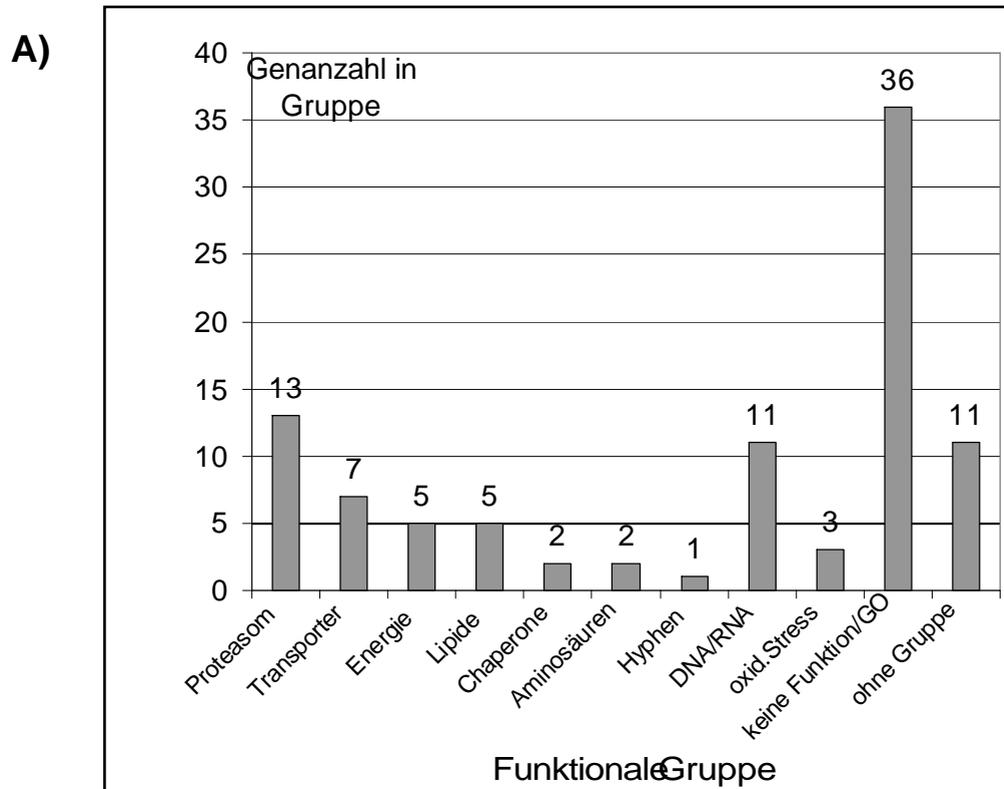


Abbildung 3.2.9-1: Ergebnis des Microarray-Experiments.

Die im Vergleich vom Wildtyp zur *CaDOA1*-Mutante differenziell exprimierten Gene sind in Diagrammen dargestellt. In A) sind die Mengen der Gene in den einzelnen funktionellen Gruppen im Vergleich dargestellt. In B) sind die Mengen hoch bzw. runter regulierter Gene aufgetragen. Namentlich werden die einzelnen Gene in den funktionellen Gruppen in der unten folgenden Tabelle genannt.

Proteasom/ Proteinkatabolismus/ Ubiquitin		Energie/ Elektronentransport
Proteolyse (13)	Transporter (7)	Sauerstofftransport (5)
<i>PUP2, UBI4, SMT3, IPF3262.3 PRE6, IPF7227, CDC48, PRE10, RPT3 RPT1, RPT6, IPF19983, IPF13356</i>	<i>CAN2, GAP6, GAP3 GAP7.3eoc CAF16, TOM22, SSU1</i>	<i>YHB1, EBP1, PCK1, GPM2 PGM2</i>
Sterolmetabolismus (5)	Stress/Chaperone (2)	Aminosäurebiosynthese ~metabolismus (2)
Fettmetabolismus/ -katabolismus/-biosynthese		
<i>ACB1.exon2, SCS7 MUQ1, ARE2 DAK2.3eoc</i>	<i>CPR6 RBL2</i>	<i>MET3 (runter), IPF13176.3</i>
Transkription/ DNA/ RNA (11)	Hyphen (1)	unspezifische Funktion (11)
<i>HIR1(runter), IPF14248, RNR21, IPF19974 DCP1, IPF4814, IFA3, IPF7666, URA5 MBF1, Zorro1a</i>	<i>HWP1</i>	<i>IPF6041, ERO1, UGP1, HEM14 IPF7400, IPF11379, IPF3492 IPF1969, MAK3, CRD1, IPF199</i>
kein GO/ unbekannte Funktion (36)	Oxidativer Stress (3)	
<i>IPF14850, CDC123, IPF17510, IPF18234.3 ECM29.exon2, IPF6305.exon2, IPF3432 IPF19815, IPF4284, IPF3491, IPF18207 TC11, IPF8762, IPF9851, IPF351, IPF6461 IPF4514, IPF11766, IPF17945, IPF4311 IPF8746, IPF18161, IPF2997, IPF14109 IPF1461, IPF15706, IPF2878, IPF3401, IFA1 IPF6156, IPF17975, IPF8725, IPF165 IPF13038, IPF16843, IPF1020</i>	<i>TTR1 TRR1 IPF6231</i>	

Beschreibung s. **Abbildung 3.2.9-1** (oben)

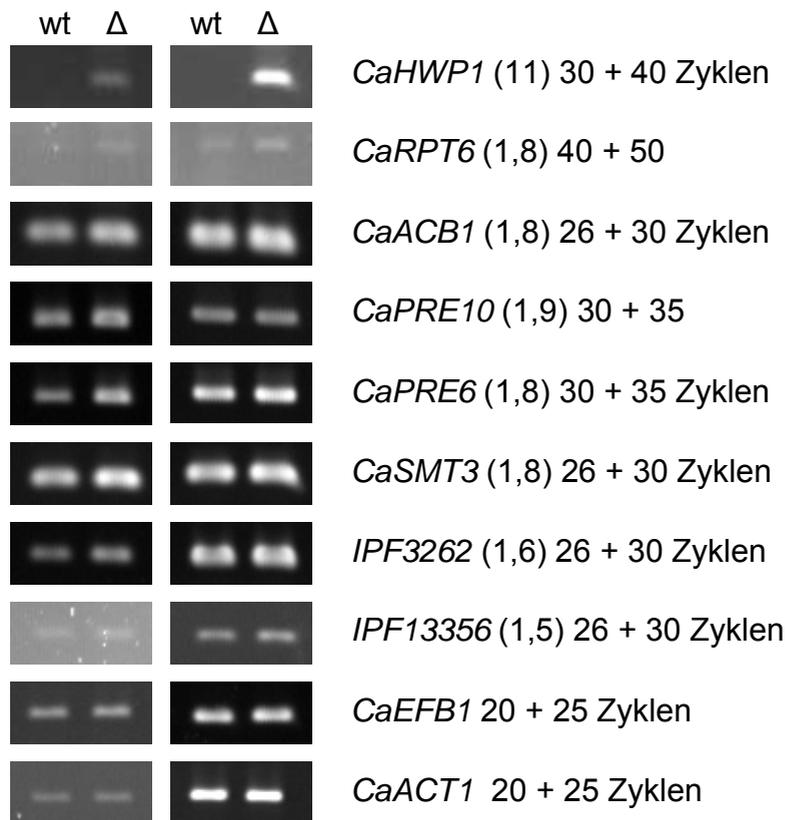


Abbildung 3.2.9-2: Semiquantitative PCR ausgewählter *C. albicans* Gene, die im Microarray-Experiment unterschiedlich exprimiert waren, zur Bestätigung ihrer Regulation. wt= CAF2-1, Δ = *CaDOA1*-Mutante; () Angabe der -fachen Regulation laut Array. Die abgebildeten Zyklenzahlen sind ebenfalls angegeben.

3.2.10 Untersuchung der Rolle der mellitinähnlichen Sequenz für die CaDoa1-Funktionalität

Clark *et al.* (1991) haben die PLA₂ aktivierende Wirkung der mellitinähnlichen Sequenz in PLAP gezeigt. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine mögliche Rolle der mellitinähnlichen Sequenz bei der Funktionalität des Proteins CaDoa1 untersucht. Die entsprechende Sequenz wurde im Gen deletiert und die Funktionsfähigkeit des entstehenden Proteins im Phänotypentest untersucht. In der *CaDOA1*-Disruptionsmutante fehlen 710 bp vor der mellitinähnlichen Sequenz. Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, zeigten die vielen Phänotypen, dass das Protein, seine Funktion nicht mehr oder nicht vollständig wahrnehmen konnte. Ein extrachromosomales, konditionell exprimiertes *CaDOA1* Gen konnte den Phänotyp aufheben (s. o.). Im nächsten Schritt sollte ein extrachromosomales, konditionell

exprimiertes *CaDOA1* Gen, in dem zwar die 710 in der Mutante fehlenden bp vorhanden waren, die mellitinähnliche Sequenz jedoch deletiert wurde, Aufschluss über die Wichtigkeit dieser „-KVL- Sequenz“ bei der Funktionalität von *CaDoa1* geben. Dazu wurde das Plasmid pDK-21 als Template verwendet und bei einer inversen PCR mit den Primern DOA1-K1 fwd. und rev. aus dem *CaDOA1*-Gen heraus amplifiziert. Die 75 Basen der mellitinähnlichen Sequenz, (Basenpaar + 1801 bis + 1875 nach dem ATG) wurden dabei ausgespart. Das lineare PCR-Produkt enthielt an den Enden je eine von den Primern eingefügte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle und wurde zum Plasmid pDK-26 religiert. Durch Sequenzierung wurde nachgewiesen, dass anstelle der 75 Basen zweimal die Sequenz GGTACC der *KpnI* Schnittstelle eingefügt wurde. Die entsprechenden Aminosäuren (Gly - Thr) kamen in anderer Kodierung auch innerhalb der deletierten Sequenz vor. Aus pDK-26 wurde das *CaDOA1*-Fragment mittels *BglII* herausgeschnitten und in den Vektor pBI-1 ligiert, um das Konstrukt pDK-27 zu erhalten. Damit ist das veränderte Gen unter der Kontrolle des regulierbaren *PCK1*-Promotors in glukosefreien Medien exprimierbar. (Plasmidkarten s. Anhang)

Mit pDK-27 wurde anschließend die $\Delta Cadoa1/ \Delta Cadoa1$ Mutante transformiert und positive Transformanden phänotypisch im Tropftest auf den induzierenden Medien CAA, SGlycAc und Blutagar bei 30°C und 37°C untersucht. Die Kontrolle der Transformation erfolgte mit Hilfe einer Southern-Blotanalyse. Wie in Abbildung 3.2.10-1 am Beispiel des 37°C Tropftests gezeigt wird, war das Protein des extrachromosomal kodierten, *PCK1*-Promotor kontrollierten Gens ohne die mellitinähnliche Sequenz nicht in der Lage, den Phänotyp der Disruptionsmutante aufzuheben. Das galt auch für den Phänotyp bei 30°C, der hier am Beispiel des Blutagars gezeigt wird. In Abschnitt 3.2.6 ist bereits gezeigt worden, dass ein ebenso exprimiertes, aber unverändertes Gen den Phänotyp aufheben kann.

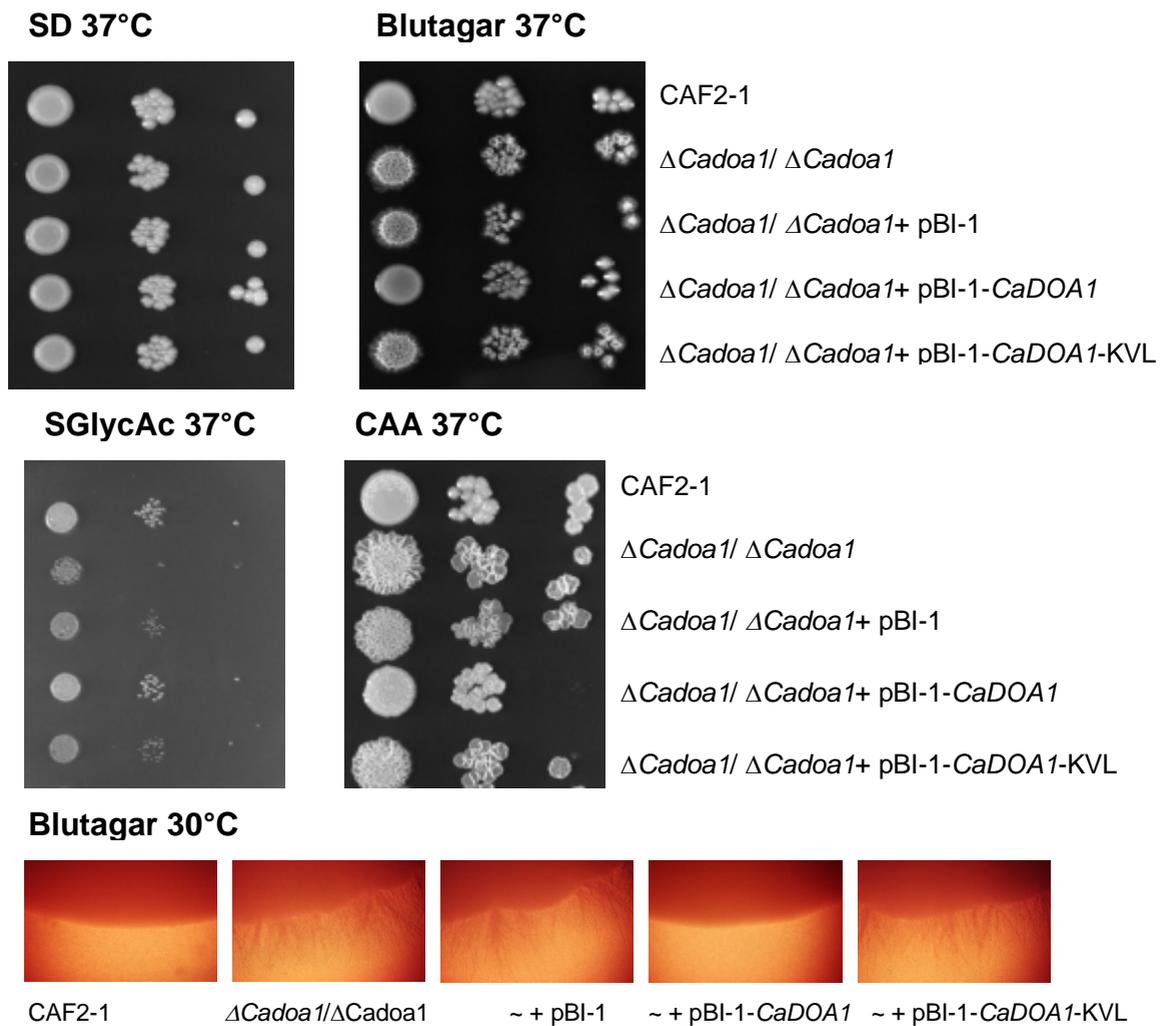


Abbildung 3.2.10-1: Tropftest zur Untersuchung der Bedeutung der KVL-Region.

Im oberen Teil sind die Tropftests auf 4 Medien nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C dargestellt. Von links nach rechts wurden jeweils $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^1$ und 5 Zellen einer 30°C SD-Vorkultur aufgetropft. Der für die *CaDOA1*- Mutante typische Phänotyp mit einer modifizierten Kolonieoberfläche und Hyphenbildung auf CAA-Medium oder Blutagar und aus Wachstumshemmung auf SGlycAc wurde durch das extrachromosomal kodierte *CaDOA1* mit deletierter mellitinähnlicher Sequenz ($\Delta Cadoa1 / \Delta Cadoa1+$ pBI-1-CaDOA1-KVL) nicht aufgehoben. Dagegen wurde durch die Expression des intakten Proteins vom Plasmid der Wildtypphänotyp in der Mutante ($\Delta Cadoa1 / \Delta Cadoa1+$ pBI-1-CaDOA1) wiederhergestellt.

Als Detailansicht sind im unteren Teil der Abbildung die Ränder der Kolonien mit der größten initialen Zellzahl ($5 \cdot 10^3$ Zellen) des Tropftests auf Blutagar nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C gezeigt (Objektiv PhD, Okular 1,25 fache Vergrößerung).

3.2.11 Bestimmung der Phospholipaseaktivitäten in der *CaDOA1*-Mutante und im Wildtyp

Ein Merkmal des zu *CaDoa1* homologen PLAP Proteins ist eine Phospholipase A₂ Aktivierung (Clark *et al.* 1991). Um zu untersuchen, ob die Deletion von *CaDoa1* eine Änderung der Phospholipaseaktivität bei *C. albicans* bewirkt, wurden die lipolytischen Aktivitäten mit den Substraten LPC und PC untersucht. Dabei wurden sowohl extrazelluläre Proteine im Kulturüberstand als auch intrazelluläre lösliche Proteine im Zellaufschluss berücksichtigt. Aus Vorversuchen ging hervor, dass das Substrat PC im Zellaufschluss unter den gewählten Bedingungen nur in sehr geringem Umfang umgesetzt wird, weshalb es für die eigentlichen Versuche mit den intrazellulären löslichen Proteinen nicht verwendet wurde. In den Kulturüberständen von Lee's Hefekulturen war zu geringe Aktivität vorhanden, um sie auswerten zu können. Auch einige andere Experimente konnten aufgrund großer Schwankungen der Messungen nicht ausgewertet werden. Es wurden Kulturen aus 5 verschiedenen Medien (Lee's Hefe, Lee's Hypheninduktion, SD bei 30°C, SD bei 37°C und YPD bei 37°C) getestet. Von ihnen wurden auch die zellulären Morphologien mikroskopisch untersucht. Die Abbildungen 3.2.11-1A-B zeigen, dass nur im Lee's Hefemedium beide untersuchten Stämme (Wildtyp CAF2-1 und *CaDOA1*-Mutante) in der gleichen Morphologie, hier Hefeform, auftraten. In den anderen Medien, ob hypheninduzierend oder nicht, hatte die Mutante immer mehr Filamente produziert, als der Wildtyp CAF2-1, wenngleich deren Anzahl zwischen den Medien schwankt. Am größten war der Unterschied der prozentualen Anzahl an Filamenten zwischen CAF2-1 und *CaDOA1*-Mutante im YPD-Medium und nach Hypheninduktion im Lee's Medium. Gemessen an den mmol freigesetzten Fettsäuren je Gramm Gesamtprotein erfolgte der Umsatz von PC deutlich geringer als LPC trotz bis zu viermal längerer Reaktionszeit. Von den extrazellulären Proteinen wurde sowohl PC als auch LPC in folgender Probenreihe steigend abgebaut (mmol freie Fettsäure/ g Gesamtprotein): SD 37°C < Lee's Hyphen < SD 30°C. In der SD 37°C- Probe ist die LPC-abbauende Enzymaktivität intrazellulär deutlich höher als extrazellulär (Daten nicht in Abb. 3.2.11-1 speziell dargestellt). Die Art und Stärke der Aktivitätsänderung zwischen Wildtyp und Mutante ist in jedem Medium verschieden. Der Unterschied der Phospholipaseaktivität der *CaDOA1*-Mutante zum Wildtyp besteht in einer mediumabhängigen Reduktion. Allein im hypheninduzierenden Lee's Medium mit PC als Substrat stieg die Aktivität in den

Kulturüberständen der Mutante um mehr als 150% an. Die Aktivitätsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante in den Kulturüberständen der SD-Kulturen bei beiden Inkubationstemperaturen (30°C und 37°C) mit PC und LPC als Substrat waren ungefähr gleich (um -70% bis -80%). Dagegen waren sie in den Zellaufschlussproben (nur LPC als Substrat) mit um - 50% bei der Kultur aus 30°C und - 20% bei der SD-Kultur aus 37°C sehr verschieden. Zusätzliche Calciumionen im Reaktionsansatz des Proteinassays führten kaum zu einer Änderung des Ergebnisses. Ebenso zeigte der Vergleich der beiden verwendeten pH-Werte nur minimale Unterschiede in der Aktivitätsstärke und Änderung. (Abb. 3.2.11-1C)

A)

Medium	CAF2-1(wt)	$\Delta CaDOA1$
SD (30°C)	100% \pm 0 Hefe	98% \pm 0 Hefe (Keimschläuche, Pseudohyphen)
SD (37°C)	99% \pm 1 Hefe	96% \pm 1 Hefe (sehr lange Hyphen)
YPD	99% \pm 1 Hefe	sehr lange Filamente in nicht trennbaren Klumpen
Lee's Hefe	100% \pm 0 Hefe	100% \pm 0 Hefe (in kleinen Klumpen)
Lee's Hypheninduktion	94% \pm 1 Hefe	88% \pm 1 Hefe

Abbildung 3.2.11-1A: Umsetzung von LPC und PC durch Phospholipasen des Wildtyps (CAF2-1) bzw. der *CaDOA1*-Mutante im Proteinassay.

Die Tabelle zeigt die durch mikroskopische Auszählung ermittelten prozentualen zellulären Morphologien der Kulturen für den Proteinassay.

B)

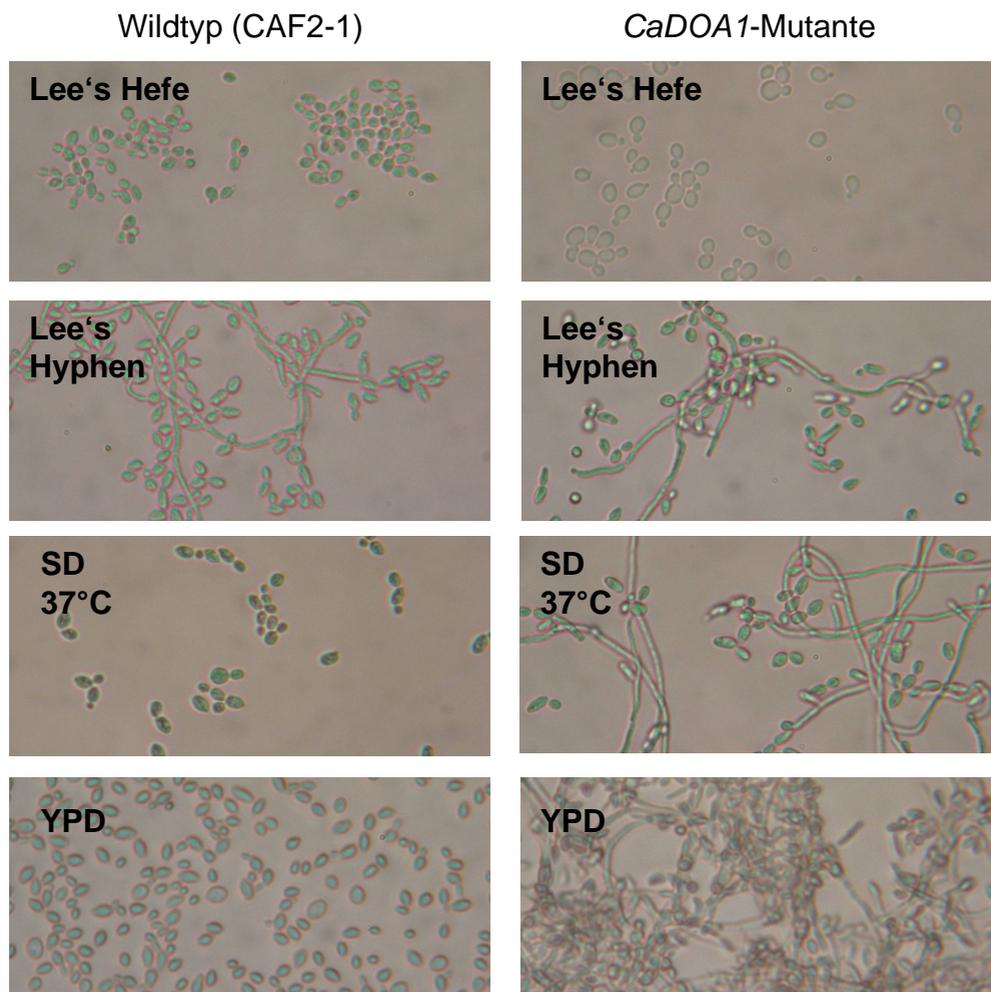


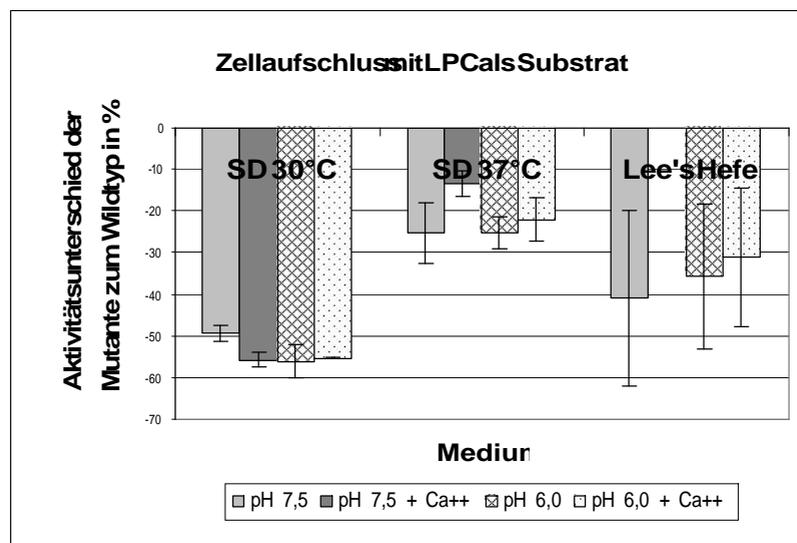
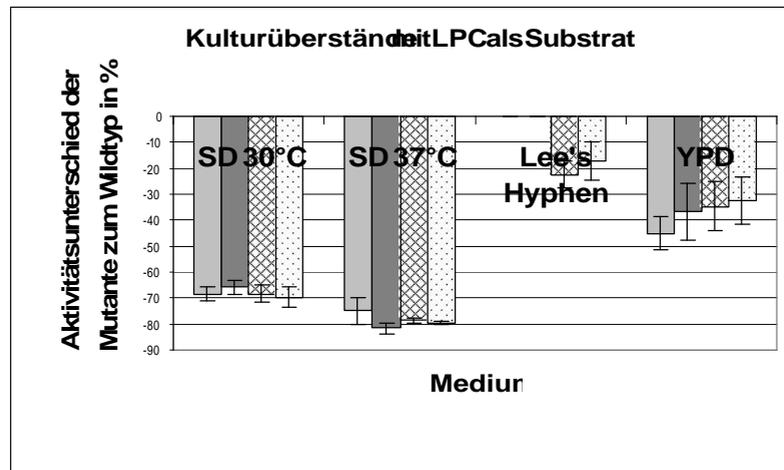
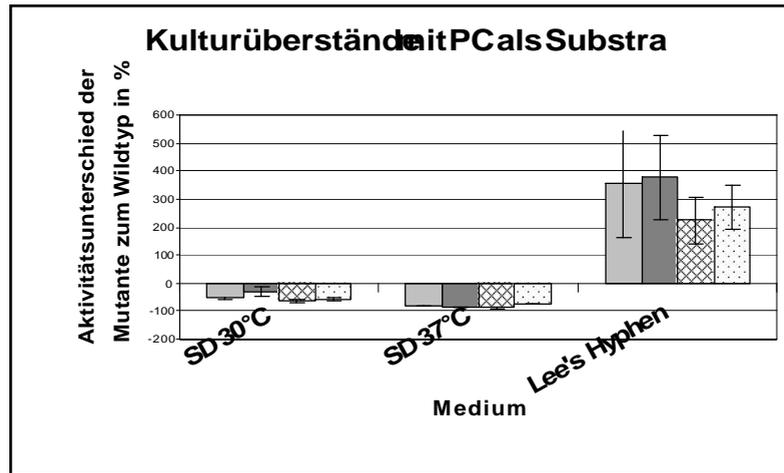
Abbildung 3.2.11-1B: Umsetzung von LPC und PC durch Phospholipasen des Wildtyps (CAF2-1) bzw. der *CaDOA1*-Mutante im Proteinassay.

Beispiele der Kulturen für den Assay im Inversmikroskop mit dem Objektiv 40x 0,5 Ph2.

Abbildung 3.2.11-1C: Umsetzung von LPC und PC durch Phospholipasen des Wildtyps (CAF2-1) bzw. der *CaDOA1*-Mutante im Proteinassay.

Das Ergebnis des Proteinassays ist als prozentualer Unterschied in der Aktivität vom Wildtyp (=100%) zur *CaDOA1*-Mutante dargestellt. Die Aktivität selber wurde in mmol entstandene freie Fettsäuren je g Gesamtprotein bestimmt. (s. Diagramme unten)

C)



3.2.12 Versuch der Lokalisation von CaDoa1 mittels GFP-Fusion

Für die Lokalisation von CaDoa1 innerhalb der Zelle wurde die von Gerami-Nejad *et al.* (2001) beschriebene Vorgehensweise zur Fusion eines Proteins mit dem für *C. albicans* optimierten GFP verwendet. Mit den Primern DOA1-GFP und DOA1-URA sowie dem Plasmid pMG1602 (pGFP-URA3) wurde durch PCR die benötigte Fusionskassette gewonnen. Für die Transformation mit dieser Kassette wurden zwei isogene, *URA3* negative, heterozygote *CaDOA1*-Mutanten verwendet (10.3-1, 1P-2). So sollte sichergestellt werden, dass nach richtiger homologer Rekombination mit dem nicht disruptierten Allel nur das mit GFP fusionierte *CaDOA1* Gen in ein funktionales Protein transkribiert wird. Das Überprüfen der Transformanden mittels Southern-Blot (*HindIII* – Verdau, *CaDOA1*- und *GFP*-Sonde) ergab 2 positive Transformanden (10.3-1-G2 und 1P-2-G3). Tropftests bei 30°C auf den Medien YPD, SD und SGlycAc ergaben keinen Phänotyp, was bedeutet, dass das fusionierte *CaDOA1*-Allel zu einem funktionsfähigen Protein abgelesen wird. In der RNA aus Zellen einer YPD Flüssigkultur (OD_{600} von 1,6) konnte mit RT-PCR das Transkript von *CaDOA1* und auch von *GFP* nachgewiesen werden. Dennoch ließ sich keine GFP-Fluoreszenz neben der starken Hintergrundfluoreszenz der Zellen im Mikroskop erkennen. Die Lokalisation war dadurch nicht möglich.

3.2.13 Test der CaDOA1-Mutante im Mausinfektionsmodell

Verstärkte Filamentbildung kann bei *C. albicans* Mutanten zu verminderter Pathogenität führen (Umeyama *et al.* 2005), zum Beispiel weil die Filamente vom Immunsystem schneller erkannt und stärker abgewehrt werden. Sie könnte andererseits sekundär durch eine erhöhte Penetrationsrate zu größerer Pathogenität führen. Möglich wäre auch eine höhere Pathogenität in Form einer erhöhten Sterberate, wenn Filamente die Blutgefäße verstopfen. Im Labor von F. C. Odds (Aberdeen) wurde die *CaDOA1*-Mutante im Mausmodell für systemische Infektionen getestet. Vergleichsstamm war CAF2-1. Trotz des hyperfilamentösen Phänotyps war kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der Mäuse und im Befall von Niere und Gehirn zwischen Wildtyp und Mutante messbar.

4 DISKUSSION

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* hat 3 Gene, die für Phospholipasen der Klasse C kodieren (*CaPLC1*, *CaPLC2*, *CaPLC3*). Sie wurden im ersten Teil dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Rolle und Funktion näher untersucht. Der zweite Teil befasste sich mit einem Gen (*CaDOA1*), das eine hohe Ähnlichkeit zu Phospholipase A₂ aktivierenden Proteinen hat. Am Beginn der Arbeiten zu allen Genen stand eine nähere Analyse der vorhandenen Sequenzdaten, um Anhaltspunkte zur Lokalisation der abgeleiteten Proteine und deren mögliche Funktionen zu erhalten. Dann wurden die Gene soweit möglich ausgeschaltet und die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Während die Ergebnisse zu *CaPLC1* ähnliche Funktionen wie *PLC1* in *Saccharomyces cerevisiae* vermuten lassen, ist die Funktion von *CaPLC2* und 3 auch nach den durchgeführten Untersuchungen offen. Beim Gen *CaDOA1* sind Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu den Daten des homologen Gens in *S. cerevisiae* zusammengetragen worden.

4.1 Ableitungen aus den Sequenzen der Phospholipasen der Klasse C

Um Aussagen über die Lokalisation der untersuchten Phospholipasen zu erhalten, wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen der Phospholipasegene (*CaPLC1*, *CaPLC2*, *CaPLC3*) untersucht. Aus den Sequenzen ergaben sich keinerlei Hinweise, dass die Phospholipasen der Klasse C in den sekretorischen Weg geleitet werden könnten. Diese Annahme wurde dadurch unterstützt, dass weder *CaPlc1* noch *CaPlc2* oder 3 in genomweiten Ansätzen zur Identifizierung von Zellwandproteinen gefunden wurden (Monteoliva *et al.* 2002; de Groot *et al.* 2003).

Im Falle von *CaPlc1* könnte die in dieser Arbeit vorgestellte potentielle Kernlokalisierungssequenz (NLS), auf eine Kernlokalisierung der Phospholipase deuten. Die erwähnte Region ist sehr basisch. Durch Bindung an andere Proteine oder Domänen oder durch Phosphorylierung wird die NLS Sequenz maskiert und ein Import reguliert. Allerdings können auch noch Proteine mit einer deletierten NLS mit Hilfe einer NLS eines anderen gebundenen Proteins in den Kern importiert werden (Wen *et al.* 1995; Dingwall und Laskey 1991). Da im Kern lokalisierte Proteine keine sehr enge Konsensussequenz besitzen, bedarf es für die genaue Lokalisation von *CaPlc1* noch weiterer Untersuchungen. Das von Okada *et al.* (2002) untersuchte Säugerprotein PLC d₁ der Ratte besitzt ebenfalls ein funktionelles NES (nuclear

export signal) und ist sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma lokalisiert. Offensichtlich pendelt das Protein zwischen Zytoplasma und Kern. Mago und Khuller (1990) fanden in der microsomalen und cytosolischen Fraktion von *C. albicans* enzymatische PLC-Aktivität was ebenfalls für eine wechselnde Lokalisation sprechen würde.

Zusätzlich interessant ist dabei die Tatsache, dass das homologe Protein Plc1 in *S. cerevisiae* Funktionen hat, die für eine Kernlokalisierung sprechen. Beispielsweise gehört dazu der Inositolpolyphosphat - regulierte mRNA Transport aus dem Kern in Assoziation mit dem ArgR-Mcm1 Transkriptionskomplex (York *et al.* 1999, 2001). Auch ScPlc1 besitzt eine putative NLS Sequenz (Payne *et al.* 1993).

Das *CaPLC1* Gen wurde neben *C. albicans* auch in den *Candida*-Spezies *C. dublinensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* mittels Southern-Blot nachgewiesen (Haynes 2001). In dieser Arbeit wurde nach *CaPLC2/3* – ähnlichen Sequenzen in anderen *Candida*-Arten mit Southern-Blot Analysen gesucht. Eine Detektion erfolgte nur in *C. albicans* nahe verwandten Spezies (*C. dublinensis*, *C. parapsilosis* und *C. tropicalis*). Nach diesen Ergebnissen besitzt nur die sehr nah verwandte Spezies *C. dublinensis* zwei ähnliche Gene, während die anderen Spezies jeweils nur eines besitzen, das auch schwächer hybridisierte, also größere Sequenzunterschiede aufwies.

Nach Fitzpatrick *et al.* (2007) nimmt die phylogenetische Ähnlichkeit zwischen den getesteten *Candida*-Spezies folgendermaßen ab: *C. albicans* – *C. dublinensis* – *C. tropicalis* – *C. parapsilosis* – *C. glabrata*. Genau diese Reihenfolge spiegelt sich auch in der Southern-Blot Analyse für *CaPLC2/3* wieder. Knechtle *et al.* (2005) wählten den Ansatz des Vergleiches von bereits sequenzierten Genomen verschiedener *Saccharomycetales* und fanden in allen untersuchten Genomen homologe Gene zu *CaPLC2/3* außer in dem phylogenetischen Zweig in dem die Matingtyp-Wechsel-Kassette auftritt, zu dem *C. glabrata* gehört. Dieses Ergebnis wird durch die Southern-Blot Daten dieser Arbeit unterstützt (s. 3.1.12).

Die Sequenzen von *CaPlc2/3* bestehen nur aus eine X-Domäne und nicht aus einer X- und Y-Domäne wie eukaryotische Proteine und ähneln dadurch eher den bakteriellen PI-spezifischen Phospholipasen (Andaluz *et al.* 2001; Knechtle *et al.* 2005). In *S. cerevisiae* ist kein homologes Protein vorhanden. Diese Tatsachen könnten zu der Annahme führen, dass diese Gene eine Anpassung an die humanpathogene Eigenschaft von *C. albicans* sind. Da jedoch auch *C. glabrata*

pathogen ist und, wie in dieser Arbeit und bei Knechtle *et al.* (2005) gezeigt, keine zu *CaPLC2/3* homologen Gene besitzt, kann das Vorhandensein von homologen Genen zu bakteriellen PI-spezifischen Phospholipasen bzw. zu *CaPLC2/3* nicht zur Unterscheidung von pathogenen und apathogenen Pilzen verwendet werden. Oder anders ausgedrückt, können *CaPLC2* und *3* keine zwingende Anpassung an die pathogene Lebensweise sein.

4.2 Die *CaPLC*-Mutanten unterscheiden sich in den Phänotypen

Für die *CaPLC*-Gene sollten Mutanten erstellt werden, um aus den phänotypischen Änderungen dieser Mutanten Rückschlüsse auf die Funktion bzw. den funktionellen Zusammenhang der Gene ziehen zu können.

Die Disruption beider Allele von *CaPLC1* ist trotz vielfacher unterschiedlicher Ansätze nicht gelungen. Das spricht für eine Essentialität von *CaPLC1*. Dies sollte in einer konditionellen Mutante mit einem regulierbaren Promotor gezeigt werden. Der dafür gewählte *MET3*-Promotor von *C. albicans* wurde bereits mehrfach zum Nachweis anderer essentieller Gene verwendet, zum Beispiel bei Care *et al.* (1999); Roig und Gozalbo (2002); Nishikawa *et al.* (2002) und Sousa *et al.* (2002).

Jedoch konnte in dieser Arbeit auch mit Hilfe des regulierbaren *MET3*-Promotors nicht klar nachgewiesen werden, dass *CaPLC1* essentiell ist (s. dazu auch 4.3). Folglich kann nur von einer möglichen Essentialität des *CaPLC1* Gens gesprochen werden.

Bereits die heterozygote Mutante, die nur noch ein Allel des *CaPLC1* Gens enthält, zeigte veränderte Phänotypen. Demnach führt bereits der Verlust einer Kopie des *CaPLC1* Gens zu Veränderungen. Einen solchen Gendosiseffekt zeigten auch Kohler und Fink (1996) bei den nicht essentiellen Genen *CaCST20* und *CaHST7*. Bei einem systematischen Screeningansatz von Uhl *et al.* (2003) wurde der Gendosiseffekt (Haploinsufficiency) sogar für die Suche nach haploiden Mutanten genutzt, die mittels Transposonmutagenese generiert wurden und einen veränderten Phänotyp im Filamentwachstum zeigten. Uhl *et al.* (2003) diskutierten, dass ein solcher Ansatz möglich sei, weil *C. albicans* fast ausschließlich im diploiden Zustand auftritt und die Genregulation deshalb sehr sensitiv auf 50% Verlust des Genproduktes reagieren würde. Einige *CaPLC1*-Phänotypen wurden sowohl bei der konditionellen, als auch bei der heterozygoten Mutante gefunden (z. B.

Temperatursensitivität, Hemmung durch Nocodazol), andere aber auch nur bei einer der beiden Mutantenformen.

Die nicht vollständig überlappenden Phänotypen von konditioneller und heterozygoter Mutante zeigen die Wirkung des Gendosiseffektes, denn die Transkriptionsstärke der beiden Promotoren (*MET3* und nativer *PLC1*-Promotor) gilt als unterschiedlich. Weiterhin ist möglich, dass die hohen Methionin- und Cysteinkonzentrationen zur Repression des *MET3*-Promotors den Phänotyp zusätzlich beeinflusst haben.

Unter 4.3 werden die Probleme bei der Filamentinduktion mit dem *MET3*-Promotor erwähnt. Diese werden bei der Verwendung der heterozygoten Mutante umgangen. Die Hyphenbildung betreffende Phänotypen bei der *CaPLC1* -Mutante sind, ebenso wie bei der *CaPLC2/3* – Doppelmutante, reverse Phänotypen und stellen nur eine Verzögerung der Hyphenbildung auf Blutagar, FCS-Agar und Spider dar. Auf Blutagar und Spider-Medium ist dies bei 37°C besonders deutlich zu beobachten. Gadd und Foster (1997) beschrieben einen Anstieg von IP₃ bei der Hyphenbildung. Durch eine fehlende oder reduzierte PLC-Aktivität kann möglicherweise der Anstieg des CaPlc1 Reaktionsproduktes IP₃ nicht mehr oder nur verzögert gewährleistet werden. Gehemmt wurde die heterozygote Mutante weiterhin durch Itraconazol, Wasserstoffperoxid und auf SGlycAc-Medium. Bei Arginin als alleiniger Stickstoffquelle (ArgD-Medium) wurde die konditionelle Mutante gehemmt.

Die Osmosensitivität bei 1 N NaCl und 5% Sorbitol bei der konditionellen *CaPLC1*-Mutante wurde durch die zusätzliche Disruption von *CaPLD1* (*pld1/pld1 ΔCaplc1/pMET3-CaPLC1* Doppelmutante) noch deutlich verstärkt (3.1.7). Die Disruption beider Gene wirkt hier wahrscheinlich synergistisch, da bei beiden Phospholipasen normalerweise DAG als Reaktionsprodukt entsteht und die Doppelmutante deshalb über noch geringere Mengen an DAG verfügt.

Die bei den *CaPLC1*-Mutanten gefundenen Phänotypen stimmen weitgehend mit denen der *ScPLC1*-Mutante überein: Temperatursensitivität, Osmosensitivität und Defekte bei der Verwendung von Galaktose und Glycerol wurden auch von Yoko-o *et al.* (1993), Flick und Thorner (1993) und Payne und Fitzgerald-Hayes (1993) beschrieben. Konträre Phänotypen im Vergleich der *S. cerevisiae* und *C. albicans*-Phospholipase C Mutanten, wie sie z. B. beim *CaDOA1* Gen beobachtet wurden, gab es innerhalb der getesteten Bedingungen nicht. Eine Temperatursensitivität ist

ebenfalls für eine *PLC1* Mutante von *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben worden (Slaaby *et al.* 1997).

Aus diesen Phänotypen lässt sich nicht auf eine spezielle Funktion schließen. Jedoch könnte eine der Ursachen eine gestörte Membranintegrität sein. Andere, ebenfalls in *C. albicans* und *S. cerevisiae* auftretende Phänotypen weisen schon eher auf eine Funktion.

Lin *et al.* (2000) fanden eine Kinetochorfunktion von ScPlc1, bei der die Phospholipase mit 2 Komponenten des Kinetochorkomplexes interagiert. Die Disruption von ScPlc1 erzeugt eine Nocodazolsensitivität, da Nocodazol die Mitose über Mikrotubuli- und Chromosomensegregationshemmung hemmt. Diese Sensitivität tritt auch bei CaPlc1 auf und lässt funktionelle Parallelen vermuten.

Ist Arginin die einzige Stickstoffquelle für Zellen von *S. cerevisiae* wird der ArgR-Mcm1-Komplex aktiviert. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Genen des Arginin-Katabolismus und Hemmung von Genen des Arginin-Anabolismus (York *et al.* 2001). Somit kann mit dem Phänotypentest auf ArgD-Medium die Funktionalität des ArgR-Mcm1-Komplexes in Mutanten untersucht werden. Die *ScPLC1*-Mutante ist auf diesem Medium nicht lebensfähig, die *CaPLC1*-konditionelle Mutante ist im Wachstum stark gehemmt. Eine Analogie zur Rolle der nukleären Inositolpolyphosphat-Produktion in *S. cerevisiae* ist folglich in *C. albicans* denkbar. Somit geben die Phänotypen der *CaPLC1*-Mutanten Hinweise auf Funktionen im Kern und stellen eine Verbindung zur putativen Kernlokalisationssequenz NLS (s. 4.1) her.

Allerdings sind aus der Literatur auch Unterschiede bekannt. So wurde in einem „two-hybrid“ Test bei *S. cerevisiae* gefunden, dass ScPlc1 mit ScGpr1, einem rezeptorähnlichen Protein, interagiert (Ansari *et al.* 1999). ScGpr1 ist Bestandteil des Pseudohyphen induzierenden Stickstoff-Signalweges (Ansari *et al.* 1999). ScGpa2 interagiert ebenfalls mit ScGpr1 (Ansari *et al.* 1999). Dagegen gab es in *C. albicans* bei einer Arbeit von Sanchez-Martinez und Perez-Martin (2002) keinen Hinweis darauf, dass CaGpr1 auch mit CaPlc1 interagiert.

Im Gegensatz zu *CaPLC1* sind *CaPLC2* und 3 nicht essentiell, selbst eine Doppelmutante ließ sich herstellen und überlebte. Trotz einer breit angelegten Phänotypsuche wurden bei der *CaPLC2/3* - Doppelmutante nur sehr wenige und schwache Phänotypänderungen beobachtet. Keiner der Phänotypen trat in einer

Einzelmutante auf. Knechtle *et al.* (2005) untersuchten unabhängig von dieser Arbeit ebenfalls *CaPLC2/3* – Doppelmutanten unter anderen Bedingungen und fanden keinen Phänotyp, weder in den dort untersuchten hypheninduzierenden Medien, noch bei Macrophagentests zur Phagocytose. Das gleiche Verhalten von Wildtyp und Doppelmutante in flüssigem FCS-Medium bei Knechtle *et al.* (2005) konnte in dieser Arbeit auf festem FCS-Medium bestätigt werden.

Unter den vielen getesteten Bedingungen traten nur zwei Hemmphänotypen auf. Obwohl viele der untersuchten Verbindungen auf eine verminderte Membranintegrität hinweisen können, trat nur bei Zusatz von Itraconazol (37°C) eine Hemmung der Doppelmutante auf. Bei 30°C inhibierte Coffein die Doppelmutante. Coffein beeinflusst unter anderem die intrazelluläre Calciumionenfreisetzung. Keiner der beiden Phänomene lässt einen deutlichen Schluss auf die Funktionen von *CaPlc2* oder 3 zu. Jedoch kann durch die Tatsache, dass nur die Doppelmutante geänderte Phänotypen aufwies, geschlussfolgert werden, dass die beiden Phospholipasen ähnliche Funktionen haben.

Interessant ist, dass die anderen beobachteten Phänotypen alle bei der Hyphenbildung (30°C – CAA, 37°C – M199, Spider, YCB-BSA) auftraten. Solche morphologischen Veränderungen gelten auf diesen Medien als reverse Phänotypen (Ernst 2000), die Hyphenbildung bleibt nicht aus, sondern tritt lediglich verspätet auf. Damit besteht ein Hinweis, dass *CaPLC2/3* doch bei der Filamentbildung eine Rolle spielen, wenngleich keine bedeutende, eher eine indirekte Verbindung. Eventuell muss in der Doppelmutante erst ein „Nebenweg“ zur Filamentbildung aktiviert werden.

Es wurden nur feste Medien getestet, ob die verzögerte Hyphenbildung auch in Flüssigkeit auftritt bleibt offen. Dies ist allerdings nicht unbedingt zu erwarten, denn laut Ernst (2000) ist ein schwacher veränderter Phänotyp auf festem Medium in flüssigen Medien oft nicht sichtbar.

4.3 Expression der *CaPLC*-Gene mit induzierbaren Promotoren

Da *CaPLC2* und *CaPLC3* sehr ähnlich sind, sich ihre Promotoren aber unterscheiden, wurde zur Erfüllung der Koch'schen Postulate für die Aufhebung eines Phänotyps nicht eines der Gene am eigenen Genlocus reintegriert, sondern *CaPLC2* extrachromosomal induzierbar transkribiert. Der *CaPCK1*-Promotor wurde

mit seinen Vor- und Nachteilen ebenfalls zur Induktion des *CaDOA1* Gens verwendet (s. 4.8). Mit dieser Vorgehensweise gelang es, wie erwähnt, den Einfluss der nativen *PLC*- Promotoren auf die Phänotypaufhebung prinzipiell auszuschließen. Gleichzeitig war die Transkriptionsrate am *PCK1*-Promotor hoch genug, um den Phänotyp (verzögerte Hyphenbildung bei 30°C auf CAA - Medium) aufzuheben.

Die Verwendung des *MET3*-Promotors für die Expression von *CaPLC1* brachte nicht die erwünschte Beweisführung, dass das *CaPLC1* Gen essentiell ist (s. o.). Flick *et al.* (1993) benötigten aufgrund der geringen Transkriptmenge eine lange Expositionszeit im Northern für den Nachweis von *ScPLC1* mRNA. Bennett *et al.* (1998) erwähnten eine geringe Transkriptmenge, da *CaPLC1* im Northern nicht detektierbar war. Ein weiterer Hinweis auf geringe mRNA Mengen von *CaPLC1* ist die vergleichsweise hohe Zyklenzahl, die zur Detektion des *CaPLC1*-Transkripts mittels RT-PCR in dieser Arbeit notwendig war. Da selbst unter repressiven Bedingungen des *MET3*-Promotors noch *CaPLC1*-Transkripte mit RT-PCR nachweisbar waren, könnte gefolgert werden, dass *CaPLC1* zwar essentiell ist, dass aber diese, wenngleich deutlich geringere Transkriptmenge, für das Überleben der konditionellen Mutante ausreicht.

Weitere Promotoren, wie beispielsweise der *MAL2*-Promotor oder der *PCK1*-Promotor (in der Reihenfolge verwendet für *ERG26* von Aaron *et al.* 2001 und für *RHO1* von Smith *et al.* 2002) oder der von Roemer *et al.* (2003) verwendete, tetrazyklinregulierbare Promotor, wurden in Erwägung gezogen, jedoch gilt keiner dieser Promotoren als so fest reguliert wie der *MET3*-Promotor.

In der wissenschaftlichen Literatur herrscht jedoch keine Einigkeit über die Konzentrationen von Methionin und Cystein, die genügen, um den *MET3*-Promotor vollständig zu reprimieren. In dieser Arbeit wurden, wie bei der Originalpublikation zum *MET3*-Promotor von Care *et al.* (1999) beschrieben, 2,5 mM jeder Aminosäure verwendet. Barelle *et al.* (2004) verwendeten jeweils 10 mM von den Aminosäuren. Solche Konzentrationen beeinträchtigen aber möglicherweise das Wachstum auch in der Hefeform, nicht nur die Hypheninduktion. Shepherd *et al.* beschrieben bereits 1980 die Hemmung der Keimschlauchbildung ab Konzentrationen von mehr als 5 µM Cystein und keinen Effekt bis zu 1 mM Methionin. Roig und Gozalbo (2003) erwähnen Hyphenproduktion in Lee's Medium bei 2,5 mM Methionin und 0,5 mM Cystein.

Hervorzuheben ist darüber hinaus die temperaturabhängige Repression des *MET3*-Promotors. Sie erfolgt stärker bei 37°C als bei 30°C (s. 3.1.5). Für Butler *et al.* (2006) war dennoch eine Kultur bei 30°C ausreichend, um mit Hilfe des *MET3*-Promotors einen Pseudohyphenphänotyp der *CaGRR1*-Mutante bei Repression auftreten zu lassen, wie es bei der Disruptionsmutante des gleichen Gens bekannt war.

Somit konnte in dieser Arbeit experimentell nicht eindeutig gezeigt werden, dass *CaPLC1* essentiell ist. Allerdings spricht die hohe Anzahl von erfolglosen Transformationen zur Disruption des zweiten Allels dafür, dass *CaPLC1* essentiell ist. Dafür spricht ebenfalls die Tatsache, dass bei diesen Transformationen bei einer geringen Anzahl zwar ein zweites Allel ausgeschaltet werden konnte, jedoch jeweils nur, wenn der Integration zuvor eine Duplikation dieses Genortes vorausgegangen war, so dass immer eine intakte Kopie vorhanden war.

Dieses Phänomen entspricht prinzipiell dem eines indirekten Nachweises der Essentialität nach Enloe *et al.* (2000). Diese Methode wurde für *CaMDS3* benutzt (Davis *et al.* 2002).

4.4 Die Transkription von *CaPLC1*, *CaPLC2* und *CaPLC3*

Um weitere Informationen zur Funktion der Phospholipasen zu erhalten, wurden Transkriptionsprofile der *CaPLC* Gene untersucht.

Beim Wildtyp wurde die Transkription von *CaPLC1* bei verschiedenen *in vitro* Wachstumsbedingungen geprüft. Diese Bedingungen (42°C/ SD, 37°C/ SD, 37°C/ SGlyc, 37°C/ SD+ Cadmium) verursachten bei den Mutanten teilweise ein verändertes Wachstumsverhalten. Lediglich bei Wachstum in cadmiumhaltigem Medium (ohne erkennbare Veränderungen der Mutante) war ein transkriptioneller Zusammenhang in Form einer leichten Transkriptionsabnahme erkennbar. So muss vermutet werden, dass sofern ein direkter Zusammenhang zwischen dem Wachstumsphänotyp der Mutante und der Phospholipase C1 besteht, dieser posttranskriptionell ist oder ein sekundärer Zusammenhang besteht. Orthologe Gene von Genen, deren Proteine in *S. cerevisiae* mit ScPlc1 zusammen am nukleären mRNA Export beteiligt sind (*GLE1*, *IPK1*, *IPK2*), zeigten ebenfalls keine bzw. nur sehr geringe Änderungen der Transkriptionsstärke. Damit besteht auch hier kein transkriptioneller Zusammenhang zwischen den Genen und den Wachstumsbedingungen.

Auch bei den Genen *CaPLC2* und *CaPLC3* wurde das Transkriptionsprofil unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen im Wildtyp (SC5314) untersucht. In allen untersuchten Medien, in hefe- und hypheninduzierenden, waren Transkripte beider Gene nachweisbar. Die Expressionsstärke für *CaPLC2* stieg in den Medien von YPD + 5% FCS, YPD 37°C, SLAD, bis zum Sabouraud Glukose Medium an. Bei *CaPLC3* war die Reihenfolge der beiden letzten Medien entgegengesetzt.

Knechtle *et al.* (2005) verglichen mittels real time-PCR die Expression im SC5314 Wildtypstamm in YPD bei 30°C, Lee's Medium bei 37°C und 10% FCS bei 37°C und fanden die Gene in hypheninduzierenden Medien stärker transkribiert (Ausnahme: 10% FCS bei 37°C, wo *CaPLC3* repressiert wurde). Sie sahen darin eine Bestätigung von Murad *et al.* (2001), deren Microarray-Daten zeigten, dass *CaPLC2* und/ oder *CaPLC3* durch den Tup1-Nrg1-Komplex in ihrer Expression unterdrückt werden (Anmerkung: aufgrund der Sequenzähnlichkeiten war in dem Array keine Unterscheidung zwischen den beiden Genen möglich).

Diese Daten sind nicht konträr zu den Daten dieser Arbeit, denn in den YPD-Proben war die Expression vergleichsweise zu den anderen Medien geringer. Knechtle *et al.* machen keine Aussage zu den Zeitpunkten der Probennahme und dem Vorhandensein von Hyphen. In den hypheninduzierenden Proben dieser Arbeit waren zur Zeit der Probennahme noch keine Hyphen vorhanden. Nach den hier vorliegenden Daten besteht auch ein Expressionsunterschied innerhalb der hefeinduzierenden Medien. Allerdings war die Expression im Hefemedium Lee's pH 4,5 stärker als im Hyphenmedium Lee's pH 6,5. Unterschiedliche Hypheninduktionen wirken über unterschiedliche Signalkaskaden und nicht nur über den Tup1-Nrg1-Komplex. Auch die Wachstumstemperatur (30°C oder 37°C) kann einen Einfluss auf die Expression haben.

Bei der Filamentinduktion durch SLAD-Medium war die nachweisbare mRNA Menge für *CaPLC3* höher als bei *CaPLC2* im Vergleich zum YPD-Signal und war dort von allen untersuchten Bedingungen am höchsten. Die beiden Gene reagieren folglich unterschiedlich stark auf verschiedene hypheninduzierende Medien, ein Fakt, den auch Knechtle *et al.* (2005) fanden, z. B. in 10% FCS bei 37°C.

Festzuhalten ist jedoch, dass beide Gene unter allen getesteten Bedingungen exprimiert waren.

4.5 Microarray-Analyse der Δ Caplc1/pMET3-CaPLC1 Mutante

Eine Microarray-Analyse sollte genomweit die Expressionsänderung von konditioneller *CaPLC1*-Mutante zum Wildtyp untersuchen. Dazu wurden Wachstumsbedingungen gewählt, die einen veränderten Phänotyp bei der Mutante zeigten.

Bei dem Vergleich von Wildtyp (CAF2-1) und konditioneller *CaPLC1*-Mutante im Microarray unter Hitzeschock Bedingungen wurden nur 45 Gene als unterschiedlich transkribiert ermittelt. Keines der Gene ist homolog zu den bei *S. cerevisiae* in „yeast-two-hybrid“ Tests gefundenen Bindungspartnern von Plc1: Ndc10, Cep3, Tor2, Ume3 (Lin *et al.* 1998). Mit 8 von den 45 unterschiedlich regulierten Genen, denen über Homologievergleiche oder Sequenzanalysen keine putative Funktion zugeschrieben werden konnte, liegt das Verhältnis innerhalb dieser Gruppe von Genen hinter dem genomweiten Verhältnis, wo etwa 1/3 der offenen Leserahmen (ORF) unbekannter Funktion ist.

Allerdings sind von den Genen mit zugeordneter (putativer) Funktion wenige genauer untersucht und beschrieben, einschließlich der homologen Gene in *S. cerevisiae*. Deshalb sind nur wenige Angaben zu diesen Genen in der wissenschaftlichen Literatur zu finden.

Eine der großen funktionellen Gruppen, in die die Gene eingeteilt wurden, ist die der Transporter. Sie beinhaltet Gene für generelle Aminosäuretransporter (*CaGAP6*, *CaGAP7*), Metalltransporter (*CaCTR1*, *CaCOX19*) und ABC-Transporter (*CaCDR1*, *IPF8642*).

Gleich zwei Metallionentransporter sind in der Gruppe enthalten, *CaCTR1* und *CaCOX19*.

Genprodukte von *COX19* wurden in *S. cerevisiae* im mitochondrialen Membranzwischenraum gefunden und können einwertige Kupferionen binden (Rigby *et al.* 2007). *CTR1* kodiert für einen Kupfertransporter mit putativen Transmembrandomänen und Kupfer-Bindemotiven (Marvin *et al.* 2003). Eine *C. albicans* *CTR1*-Mutante wächst bevorzugt in der Pseudohyphenform (Marvin *et al.* 2003). Die Transkription dieses Gens ist in *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von der Kupferverfügbarkeit durch den Transaktivator Mac1 reguliert. Die *MAC1*-Mutante von *C. albicans* zeigt den gleichen Phänotyp wie die *CTR1*-Mutante von *S. cerevisiae* und induziert keine *CTR1*-mRNA. Eine Hemmung der Kupferaufnahme hat den

Sekundäreffekt der reduzierten Eisenaufnahme (Marvin *et al.* 2003). Unter den im Microarray gefunden Genen befindet sich ebenfalls ein Eisenchelatreduktasegen (*CaFRE7*), in dessen Promotor sich eine Mac1-Bindestelle befindet (Levitin und Whiteway 2007).

Neben der offensichtlichen Beeinflussung der Kupfer-Eisen-Aufnahme durch die Mutation des *CaPLC1* Gens, scheint auch der Aminosäurehaushalt betroffen, denn es wurden auch zwei generelle Aminosäurepermeasen induziert. Desweiteren sind zwei ABC-Transporter, kodiert durch die Gene *CaCDR1* und *IPF8642*, stärker in der Mutante transkribiert. Von *CaCdr1* ist neben der Funktion in der Multidrugresistance auch die des Phospholipidtranslokators bekannt (Smriti *et al.* 2002). Das wäre eine Funktion, die eine Verbindung zu einer *CaPlc1* Aktivität vermuten lässt.

Die Methioninsulfoxid-Reduktase, kodiert durch das Gen *MXR1*, (Gruppe Reduktasen/ Oxidoreduktasen) spielt in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress. Durch Oxidation kritischer Methioninreste inaktivierte Proteine werden durch die Aktivität von *ScMxr1* (Reduktion von Methioninsulfoxid zu Methionin) wieder aktiviert. *ScMxr1* bindet die Glutathion-Peroxidase 3 (*ScGpx3*). Bei oxidativem Stress durch H_2O_2 wird diese Bindung gestört und das freie *ScMxr1* kann geschädigte Proteine reparieren (Kho *et al.* 2006). Die entsprechende Mutante von *S. cerevisiae* zeigte unter verschiedenen Laborbedingungen keinen veränderten Phänotyp (Hansen 1999).

Auch für eine *RBT2*-Mutante von *C. albicans* konnten keine auffälligen Phänotypen gefunden werden (Braun *et al.* 2000). *CaRBT2* wurde bei der Suche nach von *Tup1* unterdrückten Genen gefunden und die Sequenzanalyse lässt auf eine Eisen-Reduktase-Aktivität von *CaRbt2* schließen (Braun *et al.* 2000).

Die Glutamat-Dehydrogenase *Gdh3* ist in *S. cerevisiae* einer von 3 Wegen, um Glutamat aus Ammonium und alpha-Ketoglutarat zu synthetisieren (Avendano *et al.* 2005; DeLuna *et al.* 2001). Die Expression von *CaGDH3* ist in der konditionellen $\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$ Mutante reduziert, was im Einklang mit einer gestiegenen *CaNRG1*-Expression steht, da *Nrg1* ein Repressor der *GDH3*-Expression ist (Murad *et al.* 2001). Damit wäre die Erhöhung der *GDH3*-Expression eher eine Folge der gestiegenen *NRG1*-Transkription (siehe unten) als der Disruption von *CaPLC1*.

Barker *et al.* (2004) untersuchten genomweite Expressionsänderungen von Genen zwischen SC5314 und SC5314AR, einem Isolat in dem experimentell eine Resistenz gegenüber Amphotericin B und Fluconazol induziert wurde. Dabei fanden sie die

Zellstress-Gene *CaDDR48* und *CaRTA2* neben den Genen der Ergosterolbiosynthese hoch reguliert. *CaDDR48* und *CaRTA2* wurden auch im hier besprochenen Expressionsvergleich zwischen CAF2-1 und konditioneller *CaPLC1*-Mutante hoch reguliert gefunden. *CaRTA2* wird in die gleiche funktionelle Gruppe eingeordnet wie *CaGUT2*, *IPF14981*, *CaMSS4* und *IPF10262*. Bei der Expressionssteigerung von *CaGUT2* und *IPF14981* kann daher ein Zusammenhang vermutet werden. Die mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Gut2*) dient in *S. cerevisiae* dem Abbau von Glycerol. Die Transkription von *GUT2* wird beim Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen und Nährstoffmangel induziert (Grauslund *et al.* 2000). Die Repression der Transkription erfolgt durch cAMP (Tadi *et al.* 1999). Für das Genprodukt von *IPF14981* wird die Funktion einer Glycerophosphodiesterase/ Phosphodiesterase vermutet. Das entsprechende Protein spaltet also vermutlich cAMP. Folglich kann eine erhöhte Expression von *IPF14981* zu einem schnelleren Abbau von cAMP und somit einer verkürzten Antwort auf cAMP in der Zelle führen, was die Repression der *CaGUT2*-Transkription aufhebt und ebenfalls zu einer erhöhten Transkription führt. Damit wäre die Transkriptionszunahme von *CaGUT2* nur indirekt auf die *CaPLC1*-Mutation zurückzuführen.

Das Genprodukt von *MSS4* ist die Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase (PI4P5K), deren Reaktionsprodukt PIP₂ das Substrat für CaPlc1 ist. In *C. albicans* ist das Protein Mss4 membranständig und die Aktivität von Mss4 steigt bei der Hypheninduktion durch Temperaturwechsel (Hairfield *et al.* 2002). Eine Expressionssteigerung kann der Versuch der Zellen sein, die Substratmenge für CaPlc1 zu steigern, weil in der Mutante ein Mangel an Plc1-Reaktionsprodukten, den sekundären Botenstoffen DAG und IP₃, herrscht. Gleichzeitig kann PIP₂ auch die Phospholipase D (Pld1) stimulieren (Hairfield *et al.* 2002), die eine weitere Quelle für DAG darstellt.

Und schließlich gehört zu den stärker transkribierten Genen der Δ *Caplc1/pMET3-CaPLC1* Mutante auch *CaNRG1*, das Gen für einen wichtigen Transkriptionsrepressor. CaNrg1 reguliert Gene allein oder gemeinsam mit CaMig1 bzw. CaTup1. Der Repressor reguliert Gene unterschiedlicher zellulärer Funktionen, wie Gene der Morphogenese, Virulenz oder Stressantwort. Die CaNrg1-Mutante ist hyperfilamentös (Murad *et al.* 2001 A / B; Braun *et al.* 2001).

Die Ergebnisse des Microarray-Experiments zeigten einige regulatorische Zusammenhänge auch unter den differentiell exprimierten Genen auf und zeigten damit die Komplexität und auch Limitierung der Erkenntnisse solcher Analysen. Direkte Hinweise zur zellulären Funktion der CaPlc1 gibt es nicht, allerdings weitere Hinweise, die diejenigen Vermutungen stützen, die nach den vorhergehenden Experimenten geäußert wurden. Dazu gehören die erhöhte Expression von *CaMSS4* und die nahe liegende CaPlc1-Funktion im Phosphoinositol-Pathway, die Zunahme von *CaNRG1*-Transkripten und die verzögerte Hyphenbildung der Mutante.

4.6 Zwei putative Funktionen von CaDoa1 aufgrund von Sequenzvergleichen

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit versuchte, Informationen über die Funktion und Rolle des aufgrund seiner Ähnlichkeit als CaDoa1 bezeichneten Proteins in *C. albicans* zu erhalten. Dazu erfolgten zunächst Ableitungen anhand der Protein- bzw. Gensequenz, die über die Ähnlichkeit zu Doa1 von *S. cerevisiae* und dem Säugerprotein PLAP (Phospholipase A₂ aktivierendes Protein) hinausgingen.

Aus der abgeleiteten Proteinsequenz für CaDoa1 lässt sich das Protein über die große Ähnlichkeit der Sequenz zur Familie der WD-repeat-Proteine zuordnen. Damit ist jedoch keine funktionelle Einordnung möglich, da die Funktionen der bekannten WD-repeat-Proteine sehr unterschiedlich sind. So sind Proteine bekannt, die beispielsweise bei der Regulation der Signaltransduktion, der pre-mRNA Prozessierung, der Zytoskelettausbildung und der Transkription mitwirken (Smith *et al.* 1999). Typischerweise besitzen Proteine der WD-repeat Familie keine katalytische Funktion und bilden Multiproteinkomplexe durch die Interaktion mit anderen Proteinen über die WD Wiederholungen (Neer *et al.* 1994). Einige WD-repeat Proteine sind dennoch mit einer funktionalen Domäne fusioniert und besitzen deshalb eine katalytische Aktivität, so auch das Säugerprotein PLAP (Neer *et al.* 1994). Diese funktionale Domäne ist die mellitinähnliche Sequenz (Clark *et al.* 1991). Mit dieser Domäne ist PLAP in der Lage, die Phospholipase A₂ zu aktivieren, was durch einen Anstieg des Reaktionsprodukts (Arachidonsäure) gezeigt werden konnte. Eine ähnliche Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit in CaDoa1 identifiziert.

In den Genomen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* wurden mehrere Gene gefunden, die für beschriebene oder putative WD repeat Proteine kodieren. Das

prominenteste Beispiel ist wahrscheinlich der Transkriptionsrepressor Tup1. Durch die variable Region (Neer *et al.* 1994) innerhalb der Konsensussequenz der WD-Wiederholung ergeben solche Proteine bei einem Proteinsequenzvergleich jedoch nicht sämtlich hohe Ähnlichkeiten. ScDoa1, das die größte Ähnlichkeit mit CaDoa1 (alias IPF4477) hat, spielt eine Rolle bei der ubiquitinabhängigen Proteindegradation, bei der Kontrolle der zellulären Ubiquitinkonzentration und bindet in „yeast-two-hybrid“ Assays Cdc48, Ciu1, Cui2 und Cui3 (Johnson *et al.* 1995; Keil *et al.* 1996; Seigneurin-Berny *et al.* 2001; Ghislain *et al.* 1996; Decottignies *et al.* 2004). Für die Bindung an die im „yeast-two-hybrid“ Assay gefundenen Proteine sind die C-terminalen 260 Aminosäuren von ScDoa1 nötig (Decottignies *et al.* 2004). ScDoa1 modifiziert die NHEJ (nonhomologous end-joining) Maschinerie in Abhängigkeit von der stationären Phase (Wilson 2002). In Mutanten denen ScDoa1 fehlt, treten niedrigere Konzentrationen freien Ubiquitins auf.

Auch ScDoa1 hat 7 WD Wiederholungen (Keil *et al.* 1996), wobei wie bei CaDoa1 die zweite und siebte stärker von der WD-Konsensussequenz abweichen. Damit sind die beiden homologen Proteine für diesen Teil der Sequenz (WD-Wiederholungen, N-terminal) sehr ähnlich. Keil *et al.* (1996) zeigten des Weiteren in anderer Herangehensweise als in dieser Arbeit, dass die homologen Bereiche zwischen ScDoa1 und dem Säugerprotein PLAP außerhalb des WD-Bereiches die katalytische, mellitinähnliche Sequenz in PLAP aussparen. Sie vermuten deshalb ähnliche und unterschiedliche Funktionen von ScDoa1 und PLAP. In dieser Arbeit wurde bei der Sequenzanalyse gezeigt, dass sich CaDoa1 und PLAP gerade im C-terminalen Bereich (durch Homologien innerhalb der mellitinähnlichen Sequenz) ähnlicher sind als ScDoa1 und PLAP. Damit sind anhand von Sequenzähnlichkeiten zwei verschiedene putative Funktionen von CaDoa1 denkbar. Die eine bestünde in einer Verbindung mit den vielfältigen Wirkungen von Ubiquitin in der Zelle und die andere in einer Verbindung mit dem Phospholipidkreislauf in der Zelle. Durch weitere Untersuchungen, auch im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Funktionen, wenn möglich, untermauert werden.

Da in früheren Publikationen (Price & Cawson 1977, Mago & Khuller 1990, Goyal & Khuller 1992) aufgrund von Aktivitätstests eine Phospholipase A (PLA) Aktivität in *C. albicans* postuliert wurde, jedoch auch mit dem Genomprojekt kein entsprechendes Gen in *C. albicans* gefunden wurde, stellt ein Protein mit einer potentiellen PLAP-Aktivität eine Möglichkeit zum Auffinden einer PLA dar.

4.7 Die *CaDOA1*-Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp

Nach der Sequenzanalyse wurde die Expression des Gens (*CaDOA1*) mittels RT-PCR untersucht und eine Mutante erstellt, um die oben genannten Vermutungen durch eventuell veränderte Phänotypen zu erhärten.

Das sowohl in der Hefe- als auch der Hyphenform exprimierte (s. Abb. 3.2.2-1) Gen *CaDOA1* ist nicht essentiell, denn die Mutante ist lebensfähig. Auffälligster Phänotyp der *CaDOA1*-Mutante ist die Hyperfilamentation sowohl in Flüssigkultur als auch auf festem Medium. Dadurch wurden auch die Wachstumskurvenverläufe bei Messung der OD₆₀₀ verfälscht (s. Abb. 3.2.4-1 A), denn die Filamente der Mutante flocculieren schneller als die Hefezellen des Wildtyps. Es kann folglich nicht von einem eindeutig langsameren Wachstum der *CaDOA1*-Mutante bei dieser Untersuchung gesprochen werden.

Am sichersten können Pseudohyphen und echte Hyphen durch die Lage der Septen zur Mutterzelle voneinander unterschieden werden (Sudbery 2001). Wie aus der Calcofluor-Färbung der Zellwände und Septen zu ersehen ist (s. Abb. 3.2.4-3), bestehen die Filamente der Mutante aus einem Gemisch von Pseudohyphen und echten Hyphen.

Einen ähnlichen, filamentösen Phänotyp zeigten beispielsweise die Mutanten der Gene *CaSSN6* (Hwang *et al.* 2003), *CaSPT3* (Laprade *et al.* 2002), *CaUBI4* (Roig und Gozalbo, 2003), *CaRAD6* (Leng *et al.* 2000), *CaCDC4* (Atir-Lande *et al.* 2005) und *CaGRR1* (Butler *et al.* 2006) in *C. albicans*. Bei den Genen *CaUBI4*, *CaCDC4*, *CaRAD6* und *CaGRR1* besteht eine Verbindung zum Ubiquitin-Pathway.

Die Mutanten der Gene *SSN6* und *SPT3* in *C. albicans* zeigten auch eine reduzierte Virulenz im Mausinfektionsmodell. Dagegen ist die hyperfilamentöse *PDE2*-Mutante ebenso avirulent wie hypofilamentöse Mutanten (Bahn *et al.* 2003). Ein Test im Labor von F.C. Odds (Aberdeen) mit der während dieser Arbeit erstellten *CaDOA1*-Mutante zeigte am Mausmodell zur systemischen Infektion dagegen keine signifikante Änderung der Virulenz der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Damit wird deutlich, dass ein alleiniges Wachstum in der Hyphenform keine gesteigerte Pathogenität bedeutet, obwohl bekannt ist, dass Hyphen die invasivere Morphologie bei *C. albicans* darstellen. Hyphen können aber auch für eine bessere Nahrungsaufnahme in Stresssituationen nötig sein. Der hyperfilamentöse Phänotyp der *CaDOA1*-Mutante kann auch nicht als Hinweis für eine mögliche hypheninhibierende Wirkung der

CaDoa1-Funktion gesehen werden, da die Transkription des Gens mit der Hyphenbildung, beispielsweise *in vitro* in Lee's Medium (s. Abb. 3.2.2-1), zunimmt. Für die Hyperfilamentierung bei allen getesteten pH-Werten (37°C), jedoch nicht auf SD-Medium, muss bei einer Interpretation auch die veränderte Phosphatkonzentration in den Platten als mögliche Ursache in Erwägung gezogen werden, da Phosphatpuffer verwendet wurde.

Wie schon der Sequenzvergleich von CaDoa1 und ScDoa1 vermuten lässt, zeigte ein Vergleich der Ergebnisse der Tropftests gemeinsame und unterschiedliche Phänotypen der Mutanten dieser homologen Gene.

Ghislain *et al.* (1996) fanden bei der Ufd3 (alias Doa1) - Mutante in *S. cerevisiae* keinen Effekt auf erhöhte Temperaturen, Coffein (8 mM), NaCl (0,9 M), CaCl₂ (0,1 M), EGTA (10 mM), jedoch einen Sporulationsdefekt. Während sich die *C. albicans* Mutante im Fall von NaCl und CaCl₂ gleich verhielt, wurde sie durch Coffein (10 mM) und EDTA (1 mM), das ähnlich wirkt wie EGTA, gehemmt. Beides weist auf einen Defekt bei Stress durch zweiwertige Ionen hin. EDTA entzieht durch die Chelatorwirkung zweiwertige Ionen und Coffein hat als cAMP Phosphodiesterasehemmer einen Effekt auf das zelluläre Calcium durch die Begünstigung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern (Sigma-Aldrich, Coffein-Produktbeschreibung).

Die Deletion von ScDOA1 führte zur Resistenz gegenüber Isofluran und kreuzreaktiv auch gegenüber anderen flüchtigen Anästhetika. Zudem war die Mutante in Abhängigkeit von der Wachstumsphase temperatursensitiv (Keil *et al.* 1996). Wolfe *et al.* zeigten 1998, dass die DOA1-Mutante von *S. cerevisiae* im Vergleich zum Wildtyp sensitiver gegenüber Cadmium ist und resistenter gegenüber Isofluran. Gegenüber Cycloheximid verhielt sich die Mutante von *S. cerevisiae* wie die Kontrolle. Cycloheximid rief nur eine schwache Hemmung der Mutante in *C. albicans* hervor. Letztere Mutante verhielt sich aber sowohl gegenüber Cadmium als auch bei Gegenwart von Isofluran sensitiver. Dieser Unterschied der Phänotypen weist möglicherweise auf die oben angesprochenen zwei verschiedenen putativen Funktionen in *C. albicans* hin.

Cadmium reagiert mit Thiolgruppen und kann in einigen Proteinen Zink ersetzen, was wahrscheinlich einen Abbau der abnormen Proteine zur Folge hat. In *S. cerevisiae* zeigten Jungmann *et al.* (1993), dass Mutanten von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (Ubc1, Ubc4 und Ubc7) hypersensitiv gegenüber einer Cadmiumexposition

sind. Die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen erfolgt über das Proteasom. Auch die Mutation einer essentiellen Untereinheit des Hefeproteasoms (Pre1) führte zur Cadmiumhypersensitivität. Damit könnte die Funktion von CaDoa1 durchaus mit dem Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau verbunden sein. Die Wirkungsweise von Isofluran ist noch nicht geklärt, es wird jedoch ein Zusammenhang mit den Membranlipiden und/ oder membrangebundenen Proteinen vermutet, da mit zunehmender Lipophilie auch das anästhetische Vermögen einer solchen Substanz steigt (Keil *et al.* 1996). Wolfe *et al.* (1999) postulierten jedoch eine mögliche Rolle des Ubiquitin-Metabolismus bei der Reaktion auf Isofluran und diskutierten einen direkten und einen indirekten Zusammenhang von beiden. Keines der Modelle ist jedoch näher charakterisiert oder untersucht.

Auch die Phänotypen, zu denen es keine Entsprechung bei der *S. cerevisiae* Mutante in der Literatur gibt, bestätigen die Vermutungen zur Funktion von CaDoa1. Propranolol hemmt die Morphogenese in *C. albicans* wahrscheinlich über die Bindung von PA (Phosphatidsäure/ phosphatidic acid), das durch die Pld1-vermittelte PC-Hydrolyse entsteht und Ausgangsstoff für die DAG Bildung ist. Dabei ändert sich die DAG-Konzentration in der Zelle nicht (Baker *et al.* 2002). Fehlende Pld1-Aktivität führt beim Zellwachstum zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Propranolol (Baker *et al.* 2002). Eine solche fehlende oder verminderte Aktivität lässt sich bei der Mutante vermuten, da sie sowohl gegenüber Propranolol, als auch gegenüber Butanol sensitiv ist. Gleich mehrere Phänotypen (SDS, Amphotericin B, Amorolfin, Itraconazol) weisen auf eine verminderte Zellmembranintegrität hin. Amphotericin B, aber nicht Fluconazol, reduziert die extrazelluläre Phospholipaseaktivität in *C. albicans* (Anil *et al.* 2003). So besteht auch hier wieder eine mögliche Verbindung zu den Phospholipasen. Eine veränderte Zellwand- und Zellmembranintegrität können die Ursache für veränderte extrazelluläre Proteinaktivitäten sein, wie sie die Phänotypen auf Blutagar, Eigelbagar und YCB-BSA zeigen. Dabei sind die Unterschiede in den Höfen auf diesen Medien schwer zu deuten, da jedes Mal auch eine stärkere Filamentierung bei der Mutante auftrat und es bei *C. albicans* zwischen Hefeform und Hyphenform Unterschiede in der extrazellulären Proteinaktivität gibt. Die Hemmung der Mutante durch Cycloheximid und Hygromycin B deutete auf eine vermehrt notwendige Proteinsynthese in der Mutante hin.

Vor dem Hintergrund von Minimalmedium ist die *CaDOA1*-Mutante von *C. albicans* empfindlicher gegenüber oxidativem Stress. Auch dies ist eine mögliche Verbindung

zur ubiquitinabhängigen Proteindegradation, denn durch H₂O₂ oxidierte Proteine werden ubiquitiniert und über das 26 S Proteasom vakuolär abgebaut.

Die Bildung eines aufgeklärten Hofes auf Blutagar-Platten wird durch lipolytische und proteolytische Enzyme verursacht. Auffallend ist der völlig unterschiedliche Phänotyp der Mutante bei den beiden Temperaturen 30°C und 37°C. Bei 30°C war der Hof proportional zur verstärkten Hyphenbildung. Obwohl die Mutante bei 37°C nicht hyperfilamentös, sondern eher gehemmt wuchs, zeigte sie einen deutlicheren Hof als der Wildtyp. Das deutet darauf hin, dass die sekretierten Faktoren für die Blutagaraufklärung keine invasive Filamentbildung voraussetzen.

Die phänotypische Analyse erhärtet nicht nur die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen ScDoa1 und CaDoa1 und deutet auf das doppelte Wirkungsfeld von CaDoa1 hin, sondern zeigt auch eine Verbindung der Funktion von CaDoa1 mit der Morphologiekontrolle in *C. albicans*.

4.8 Retransformation und Überexpression mit Hilfe des PCK1-Promotors

Um zu überprüfen, ob die *CaDOA1*- Disruption tatsächlich als Ursache für den Phänotyp verantwortlich gemacht werden kann, wurden in dieser Arbeit mehrere isogene hetero- und homozygote Mutanten bei der Phänotypsuche verwendet. Darüber hinaus wurden einige Phänotypen durch ein extrachromosomal transkribiertes *CaDOA1* Gen auf dem Plasmid pBI-1 unter Kontrolle des *CaPCK1*- Promotors aufgehoben. Trotz der eingeschränkten Testmöglichkeiten bei diesem induzierbaren Promotor konnten einige Phänotypen der *CaDOA1*-Mutante rückgängig gemacht werden. Neben den von Stoldt *et al.* (1997) und Leuker *et al.* (1997) publizierten Medien zur Induktion des *CaPCK1*-Promotors (CAA- und B-Medium) wurden in dieser Arbeit noch weitere Glukosemangelmedien verwendet, z.B. SGlycAc und Blutagar.

Die Hyperfilamentation konnte nicht immer (bei allen Isogenen bzw. Bedingungen) durch *PCK1*-Induktion vollständig aufgehoben werden, manchmal trat sie nur einige Zeit später und schwächer als bei der *CaDOA1*-Mutante auf. Das kann eine Ursache in der Anzahl der pBI-1 Plasmidderivate in der Zelle haben, wie es auch bei *CaTEC1* (Schweizer *et al.* 2000 und persönliche Kommunikation) beobachtet wurde. Dort wurden in Abhängigkeit von der Anzahl der pBI-1 Plasmidderivate in der Zelle verschiedene Phänotypen beobachtet. Damit könnte auch die leichte Hemmung

erklärt werden, die schon das leere Plasmid (pBI-1) als Kontrolle (C1) für die Überexpression in diesem Stamm verursachte. Die Auswertung des Microarray Experimentes ergab einen Anstieg der Transkription von *CaPCK1* um das 3,7 fache in der Mutante (s. Abbildung 3.2.9-1). Deshalb wäre auch bei Verwendung von pBI-1 Derivaten ein Einfluss auf die Transkription der beiden Gene *CaPCK1* und *CaDOA1* denkbar.

4.9 Induktion der Transkription von *CaDOA1*

Drei Stressbedingungen (Temperatur-, oxidativer und Schwermetallstress), die bei der Mutante auch einen Phänotyp auslösten, wurden beim Wildtyp im Hinblick auf eine mögliche Transkriptänderung von *CaDOA1* untersucht. Dabei ist anzumerken, dass ein solcher transkriptioneller Zusammenhang nicht zwingend erforderlich ist, um bei der Mutante einen Phänotyp hervorzubringen. Bei einem direkten Zusammenhang von Proteinfunktion und eingesetztem Stress kann die Regulation auch posttranskriptionell erfolgen. Über sekundäre Effekte kann bei einer Mutante auch ein Phänotyp auftreten, der nur indirekt etwas mit der Funktion des fehlenden Proteins verbunden ist. Von *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Expression einiger Gene des Ubiquitinsystems, z. B. von Proteasomproteinen, durch Cadmium induzierbar ist (Jungmann *et al.* 1993). Trotz des deutlichen Phänotyps steigert Cadmium die Transkription von *CaDOA1* im Vergleich zur Kultur in SD bei 37°C nicht.

Auch der oxidative Stress im SGlyc Medium führt zu keiner Induktion der Transkription bei dem gewählten Experimentaufbau. Bei 42°C, wo der Phänotyp der Mutante nicht wie bei den beiden vorherigen Bedingungen in einer Hemmung, sondern in einer veränderten Kolonieoberfläche besteht, kommt es dagegen zu einer Zunahme der *CaDOA1*- Transkription.

Es sei hier noch einmal auf die Verwendung zweier unterschiedlicher Primerpaare für die Kontrollgene *CaEFB1* und *CaACT1* hingewiesen, denn erst dadurch war es möglich diese Probe auszuwerten. Das Primerpaar für *CaACT1* unterscheidet nicht zwischen den Transkripten mit und ohne Intron wie das Primerpaar für *CaEFB1*. Damit werden beide Transkriptlängen in einem gleichlangen PCR-Produkt amplifiziert. Das ist bei den Proben aus der 42°C Kultur wichtig, da bei 42°C das Spleißen nicht mehr vollständig bzw. verzögert stattfindet (Bracken *et al.* 1999; Vogel

et al. 1995; Yost *et al.* 1991). Für die Entscheidung über die Transkriptionsregulation von *CaDOA1* wurden PCR-Bedingungen gewählt, unter denen die Transkriptmengen von *CaACT1* in der exponentiellen Amplifikationsphase gleich sind. Sowohl die Cadmiumzugabe, als auch der durchgeführte Hitzeschock führen zu mehr fehlgefalteten Proteinen, die über das Proteasom abgebaut werden müssen. Die fehlende Aktivität von *CaDoa1*, die mit dem ubiquitinvermittelten Proteinabbau in Verbindung steht, führte in der Mutante in beiden Fällen zu einem Phänotyp, steht aber nur mit der Hitzeschockantwort transkriptionell in Zusammenhang.

4.10 Microarray-Analyse der *CaDOA1*-Mutante

Die Microarray-Analyse war eine weitere Methode mit deren genomweitem Expressionsvergleich zwischen Wildtyp (CAF2-1) und *CaDOA1*-Mutante, wenn möglich, Funktionshinweise für *CaDOA1* gefunden werden sollten. Als Wachstumsbedingungen für dieses Experiment wurde mit einer Vorkultur bei 30°C in SD-Medium und einer anschließenden Kultur bei 37°C in SD-Medium eine Standardkulturbedingung gewählt. Doch die phänotypische Erscheinung der zu vergleichenden Stämme war so unterschiedlich, dass deutliche Expressionsunterschiede erwartet wurden.

92 Gene wurden unterschiedlich exprimiert. Etwa für ein Drittel der differentiell regulierten Gene (36 von 92) in der *CaDOA1*- Mutante ist die Funktion unbekannt. Das entspricht etwa dem Verhältnis im gesamten Genom. Selbst bei dem systematisch untersuchten Genom von *S. cerevisiae* codierten 1/3 der offenen Leserahmen (ORF) für (zu dem Zeitpunkt der Analyse) unbekannte Proteine (Bianchi *et al.* 2001). Vielen der Gene mit einer veränderten Expression wurde eine Funktion über Homologievergleiche oder Sequenzanalyse zugeschrieben, sie sind jedoch nicht näher untersucht und haben oft noch keinen Gennamen. Die Sortierung der regulierten Gene in weit gefasste funktionelle Gruppen anhand der vermuteten oder bekannten Funktion ergab eine große Gruppe von 13 Genen, die in Zusammenhang mit Ubiquitin, Proteolyse und Proteasom im weitesten Sinne stehen. Dies kann so ausgelegt werden, dass auch die Funktion von *CaDOA1* in diesem Zusammenhang steht. Herauszuheben sind dabei die Gene *CDC48* und *UBI4*, über die es mehrere Literaturdaten gibt. In *S. cerevisiae* kann die Überexpression von *ScUbi4* zum Teil die proteolytischen Defekte der *ScDoa1*-Mutante aufheben (Johnson *et al.* 1995).

CaUBI4 kann den Phänotyp der *ScUBI4*-Mutante komplementieren. CaUbi4 spielt eine geringere Rolle beim Hitzeschock und eher eine wichtigere bei der Kontrolle von Entwicklungsprogrammen von Morphogenese und Switching folgerten Roig *et al.* (2003) nach Untersuchung der *CaUBI4* heterozygoten Mutante von *C. albicans*. Denn diese Mutante war nur wenig sensitiver gegenüber Hitze als ein Wildtyp Stamm und zeigte phänotypische Effekte wie die verstärkte Bildung von Hyphen und Pseudohyphen, hauptsächlich bei Zellen der stationären Wachstumsphase. Die Expression von *CaUBI4* (Polyubiquitin) war erhöht bei Hitzestress und in hungernden Zellen, während das Expressionsniveau in wachsenden Zellen im Vergleich zur *CaUBI3*-Expression eher gering war (Roig *et al.* 2002) [Anmerkung: In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch *CaDOA1* bei Hitzestress induziert wird (s.o.)]. Zellen der CaUbi4-Mutante aus Kulturen mit Glycerol als Kohlenstoffquelle reagierten in der stationären Phase auf chronischen Temperaturstress, Zellen aus der exponentiellen Phase oder Glukosemedium jedoch nicht. Weiterhin bildeten Zellen aus der exponentiellen Phase echte Hyphen und Pseudohyphen nach Wachstum in Lee's Medium bei 28°C vor einer „Hungerperiode“ (Roig *et al.* 2003).

Ghislain *et al.* zeigten 1996 durch Co-Immunopräzipitation und „two-hybrid“ Assays, dass ScDoa1 ein Ligand von ScCdc48 ist. ScCdc48 ist eine essentielle ATPase und wird für den Zellzyklusablauf und die Fusion von ER-Membranen benötigt. Hier besteht wiederum ein Zusammenhang zwischen Ubiquitin und Membranlipiden im weitesten Sinne.

CaSMT3 ist ebenfalls der funktionellen Gruppe „Ubiquitin, Proteolyse und Proteasom“ zuzuordnen und ist ein SUMO (**s**mall **u**biquitin-related **m**odifier) Protein. Proteine können mit SUMO, ähnlich wie mit Ubiquitin, posttranslational modifiziert werden, wodurch Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen, die Proteinlokalisierung, die enzymatische Aktivität und der Proteinabbau reguliert werden (Melchior *et al.* 2003). In *C. albicans* sind Septin-assoziierte Proteine am Knospenhals auf der Seite der Mutterzelle Ziele der SUMO-Modifizierung (Martin und Konopka, 2004).

Obwohl bei der Probennahme für das Arrayexperiment ein Filamentgemisch vorhanden war, ist nur *CaHWP1* als hyphenspezifisches Gen in der Mutante im Vergleich zur Wildtypprobe hoch reguliert.

CaTTR1 und *CaTRR1* aus der Gruppe „Oxidativer Stress“ sind im Microarray Experiment von Enjalbert *et al.* (2003) neben anderen Genen als Antwort auf

oxidativen Stress ebenfalls hoch reguliert. Dort sind sie sogar mehr als 4fach hoch reguliert. Wie in vorherigen Abschnitten bereits erwähnt, ist die *CaDOA1*-Mutante teilweise auch sensitiv gegenüber oxidativem Stress (s. Tabelle 3.2.5-T1). Werden *C. albicans* Zellen Stickstoffmonoxid ausgesetzt, steigt die Transkription des Gens für das Flavohämoglobin CaYhb1, dessen Deletion eine hyperfilamentöse Mutante erzeugt (Hromatka *et al.* 2005).

Ebenfalls hoch reguliert ist *CaPCK1* und wird hier aus der Gruppe "Elektronen- und Sauerstofftransport" herausgehoben, weil der *PCK1*-Promotor für die extra-chromosomale Expression von *CaDOA1* in dieser Arbeit verwendet wurde. Zudem wird *CaPCK1* durch CaMig1 repressiert (Murad *et al.* 2001).

In der Gruppe der Transporter finden sich 3 noch nicht näher beschriebene **Generelle Aminosäure Permeasen** (*CaGAP3*, *CaGAP6*, *CaGAP7*). Diese Tatsache kann auf zwei Weisen ausgelegt werden. Zum einen könnten der Mutante Nährstoffe, genauer Aminosäuren fehlen, die sie verstärkt aufnehmen muss. Zum anderen kann es auch auf einen Ubiquitinsystemdefekt in der Mutante deuten. Denn eine Funktion von Ubiquitin ist unter anderem die Regulation von Rezeptoren über deren Abbau, aber auch die Bindung des Liganden kann ubiquitinabhängig sein. Beispielsweise vermittelt Ubiquitin in *S. cerevisiae* die Internalisation und Defragmentierung von Plasmamembranproteinen wie ScGap1. ScSte2, ScSte3 und ScSte6 werden in *S. cerevisiae* ligandeninduziert ubiquitiniert und endocytiert (Bonifacino *et al.* 1998). Für *C. albicans* werden ähnliche ubiquitinvermittelte Regulationen bei der Rezeptorwirkung des 37 kDa Lamininrezeptors, dem 58 kDa Fibrinogen bindenden Mannoprotein und dem C3d Rezeptor angenommen (Sepulveda *et al.* 1996).

Die Literaturdaten zu mehreren homologen Genen in *S. cerevisiae* unterstützen die Aussage aus der Phänotypanalyse, dass die Membranintegrität in der Mutante gestört ist. So spielt ScScs7 eine Rolle bei der Sterolregulation, wobei die Sterolkonzentration den Sphingolipidmetabolismus reguliert (Swain *et al.* 2002).

Die Deletion von ScAcb1 (acyl-CoA-binding protein) führt zu einer veränderten Ceramidsynthese und damit zu einer veränderten Vakuolenmorphologie und -fusion (Faergeman *et al.* 2004). ScAcb1 hat eine Funktion bei der Membranorganisation, denn in den Mutanten ist weiterhin die Sphingolipidsynthese reduziert, die Zusammensetzung der Plasmamembran verändert und es tritt eine Vesikelakkumulation auf (Gaigg *et al.* 2001). ScAre2 verestert Ergosterol. Der Verlust führt zu einer verminderten Sterolsynthese (Yang *et al.* 1996; Jensen-

Pergakes *et al.* 2001). Durch verschiedene Stressformen, z. B. DTT, Hitze, Ethanol und oxidativer Stress, ist die Transkription des Gens für das ER-Membran assoziierte Protein ScEro1 induzierbar (Takemori *et al.* 2006). Wenn die entsprechenden Gene in *C. albicans* gleiche oder ähnliche Funktionen ausüben, soll in der Mutante durch eine Transkriptionsinduktion dieser Gene die Membranintegrität wiederhergestellt werden. Die phänotypische Analyse mit erhöhter Sensitivität gegenüber, z. B. SDS, Amphotericin B, Amorolfen, Hygromycin B und Cycloheximid, unterstützt die These von Defekten in der Zellwand bzw. Zellmembran. Die *CaDOA1*-Mutante zeigt ebenfalls eine Zunahme granulärer Strukturen in der Zelle, möglicherweise ist dies eine Vesikelakkumulation (s. 3.2.4) wie in der ScACB1-Mutante (s.o.).

ScMbf1 (mutiprotein bridging factor) vermittelt die Transkriptionsaktivierung durch ScGcn4 in *S. cerevisiae* (Takemaru *et al.* 1998). ScCpr6 bildet in *S. cerevisiae* Komplexe mit ScHsp90, das seinerseits in mehreren Signaltransduktionswegen eine Funktion hat (Duina *et al.* 1996). Mit diesen beiden Proteinen ist die Expression von Vertretern komplexer Mechanismen in der Mutante reguliert.

Wie schon die Sequenzanalyse zu CaDoa1 und der Phänotyp der *CaDOA1*-Mutante, so weisen auch die Ergebnisse des Microarray-Experiments auf zwei mögliche Funktionen von CaDoa1: eine im Zusammenhang mit dem Ubiquitinsystem und eine im Zusammenhang mit dem Phospholipidkreislauf.

4.11 Die mellitinähnliche Sequenz ist für die Funktionalität von CaDoa1 notwendig

Clark *et al.* (1991) haben die PLA₂ aktivierende Wirkung der mellitinähnlichen Sequenz in PLAP gezeigt, indem sie das entsprechende kurze Peptid der PLAP-Proteinsequenz synthetisierten und es auf die aktivierende Wirkung hin untersucht haben. Die PLA₂ Aktivität stieg dosisabhängig, wie im Anstieg des Reaktionsproduktes Arachidonsäure zu verfolgen war. In dieser Arbeit wurde die Sequenz nicht isoliert untersucht, sondern die entsprechende Sequenz innerhalb des *CaDOA1* Gens disruptiert. Bei der verwendeten Vorgehensweise wurde nicht die Wirkung der mellitinähnlichen Sequenz auf die PLA₂ Aktivität bestimmt, sondern allgemein die Wichtigkeit dieser kurzen Proteinsequenz für die Funktionalität untersucht. Durch die vorhandenen Phänotypen der *CaDOA1*-Mutante (s. oben) und die Lage der Disruption im Gen wurde gezeigt, dass die Region der WD-

Wiederholungen für die vollständige Funktionalität des Proteins nötig ist. Da der Phänotyp der Mutante nicht durch ein Protein ohne mellitinähnliche Sequenz aufgehoben werden konnte, wohl aber durch ein Protein mit kompletter Sequenz, zeigt dies, dass dieser Abschnitt des Proteins für seine vollständige Funktionalität nötig ist. Dass Änderungen in der Tertiärstruktur des veränderten Proteins die Ursache für die fehlende Funktionalität des Proteins waren, ist nicht auszuschließen. Es wurden 25 Aminosäuren deletiert und nur 4 an ihrer statt durch die *Kpnl* Schnittstellen eingefügt. Die eingefügten Aminosäuren Glycin und Threonin waren auch im Ausgangsprotein vorhanden. Da mehrere Transformanden getestet wurden, die sich alle gleich verhielten, sollte die unterschiedliche Anzahl der pBI-1 Derivate in der Zelle als Fehlerquelle ausgeschlossen sein.

Somit ist die mellitinähnliche Sequenz als putative katalytische Domäne für die Funktion von CaDoa1 erforderlich.

4.12 Phospholipaseaktivitäten

Die bisherigen Ergebnisse deuten zwar auf eine Funktion von CaDoa1 hin, die sowohl in den Bereich des Ubiquitinsystems, als auch in den des Phospholipidsystems geht, untermauern jedoch vor allem erstere Funktion. Dass beide Wirkungen sich nicht ausschließen, zeigten Guarino *et al.* 1995, denn PLA₂ kann den Lipidanker einer membrangebundenen Ubiquitinform abspalten, die an Knospen von Baculovirus-Virionen auftritt.

Beim homologen Säugerprotein zu CaDoa1, PLAP, ist die mellitinähnliche Sequenz für die Erhöhung der PLA₂-Aktivität verantwortlich (Clark *et al.* 1991; Ribardo *et al.* 2001). Eine solche Sequenz ist auch für die Funktionalität von CaDoa1 notwendig (s.o.). In *C. albicans* sind 3 Phospholipasen der Klasse B beschrieben, Plb1, Plb2 und Plb5 (Hoover *et al.* 1998; Leidich *et al.* 1998; Sugiyama *et al.* 1999; Theiss *et al.* 2006). Mit dem Genomprojekt wurden noch 2 weitere mögliche *PLB*-Gene gefunden, ein Gen für eine mögliche Phospholipase A (PLA) ist jedoch noch nicht gefunden worden.

Mehrere frühere Arbeiten, beruhend auf Aktivitätstests, weisen auf die Aktivität einer PLA hin, aber auch Lysophospholipase- und Lysophospholipase-Transacylase-Aktivitäten wurden gezeigt (Price und Cawson 1977; Mago und Khuller 1990; Takahashi *et al.* 1991; Mirbod *et al.* 1995). Tabelle 4.12-T1 ist eine

Zusammenfassung von Publikationen mit diesen Enzymassays. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Enzymassay wurden die freigesetzten Fettsäuren bestimmt. Damit ist eine Unterscheidung zwischen der Aktivität von PLA, PLB und Lysophospholipase nicht möglich, denn alle drei Enzyme spalten die Fettsäuren ab. Eine Lysophospholipase verwendet als Substrat ein Lysophospholipid, wie z.B. LPC im vorliegenden Fall. Auch bei den meisten früheren biochemischen Untersuchungen in der Literatur ist keine solche Unterscheidung zwischen den Enzymaktivitäten möglich. Deshalb kann das als PLA postulierte Enzym durchaus die Aktivität einer PLB sein. Beide Enzyme unterscheiden sich nur darin, dass die PLA nur eine Fettsäure abspaltet (die am ersten oder die am zweiten Kohlenstoffatom) und die PLB beide Fettsäuren. Für die Unterscheidung der Aktivitäten von PLA, PLB und Lysophospholipase wäre zusätzlich eine Untersuchung der Enzymassayprodukte mittels Dünnschichtchromatographie nötig.

Mit den Substraten PC und LPC wurden in der vorliegenden Arbeit bekannte Substrate für *C. albicans* verwendet. PC ist auch Bestandteil der Lipidzusammensetzung in *C. albicans* (Goyal *et al.* 1992; Mahoudabadi *et al.* 2001). Der Umsatz von PC durch intrazelluläre Proteine war nicht messbar bzw. war auch nach 20 h Inkubation nur sehr gering. Dieser Unterschied zu den Referenzen in Tab. 4.12-T1 entstand durch die kleine verwendete Pelletgröße zur Extraktion und eine fehlende Proteinanreicherung. Die Aktivität änderte sich kaum durch die Zugabe von Calciumionen, woraus sich schließen lässt, dass die gemessene Aktivität nicht von calciumabhängigen Enzymen stammte. Auch die verschiedenen verwendeten pH-Werte (pH 6,0 und 7,5) zeigten nur minimale Unterschiede, so dass das entsprechende Enzym kein enges pH-Optimum für die Aktivität besitzt oder mehrere Enzyme mit pH-Optima in diesem Bereich sich ergänzen. Auf die von Mirbod *et al.* (1995) beschriebene h-LPTA trifft, beispielsweise, die Calciumunabhängigkeit und das pH-Optimum von 6,0 zu.

Die Deutung der Ergebnisse des Enzymassays wird durch den Phänotyp der Mutante erschwert, denn die Aktivität und/ oder Expression der untersuchten Enzyme änderte sich mit der Morphologie. In Hefezellen und Pseudohyphen ist die Expression des *CaPLB1* Gens höher als in Keimschläuchen (Hoover *et al.* 1998). Nach Goyal und Khuller (1992) besitzt die Hefeform intrazellulär höhere PLA- und Lysophospholipaseaktivität als die Mycelform. Während die extrazelluläre PLA-Aktivität bei der Hefeform zwar geringer, jedoch nicht signifikant geringer, als bei der

Mycelform war, zeigte die Aktivität der extrazellulären Lysophospholipase eine signifikant erhöhte Aktivität bei der Hefeform. Bei der Aussage der Experimente dieser Arbeit, dass die gemessenen Aktivitäten bei den Mutantenproben sinken, muss deshalb die verringerte Aktivität durch die vorhandenen Filamente berücksichtigt werden. Abgesehen von der YPD-Kultur ist der Unterschied im prozentualen Filamentgehalt zwischen Wildtyp und Mutante jedoch so gering (2 - 6%), dass dieser nicht die Ursache für das starke Absinken der gemessenen Aktivität sein kann. Folglich ist das Fehlen der CaDoa1-Aktivität der Grund für den gesunkenen Umsatz von PC und LPC durch extra- und intrazelluläre Proteine in der Mutante. Die Aktivität eines extrazellulären Proteins nimmt jedoch zu beim Umsatz von PC. Dies kann bedeuten, dass es zwar durch den Morphologiewechsel induziert wird, jedoch unabhängig von der CaDoa1 Funktionalität ist. Eine weitere Möglichkeit ist dagegen eine Regulation dieses Proteins durch CaDoa1, doch in umgekehrter Weise als die anderen in diesem Assay gemessenen Proteinaktivitäten. Mit diesem Proteinassay konnte eine Verbindung zwischen CaDoa1 Funktion und phospholipid- bzw. lysophospholipidhydrolysierenden Proteinen gezeigt werden.

Tabelle 4.12-T1: Zusammenstellung früherer Publikationen zur Phospholipaseaktivität mittels Enzymassays bezüglich der postulierten Enzyme und deren Lokalisation, sowie der verwendeten Substrate im Assay (Aussagen zu PLC und PLD sind nicht berücksichtigt).

Referenz	Nachgewiesene Enzymaktivität	Lokalisation	Verwendete Substrate
Price u. Cawson 1977	PLA, Lysophospholipase	intrazellulär	PC, LPC
Mago u. Khuller 1990	PLA, Lysophospholipase	intrazellulär, PLA in Mikrosomenfraktion, Lysophospholipase in Mitochondrien	PC, LPC
Takahashi <i>et al.</i> 1991	LPTA-I, LPTA-II, PLB	extrazellulär	PC, LPC
Goyal u. Khuller 1992	PLA, Lysophospholipase	extrazellulär und intrazellulär	PC, LPC
Mirbod <i>et al.</i> 1995	h-LPTA	extrazellulär	LPI, LPE und LPC mit verschiedenen Fettsäuren
Leidich <i>et al.</i> 1998	PLB1	extrazellulär	Dipalmitoyl-PC

5 AUSBLICK

Ausgehend von den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit sind weitere Experimente nötig und gezieltere Fragestellungen im Hinblick auf die Klärung der Funktion der Genprodukte der 4 untersuchten Gene (*CaPLC1*, *CaPLC2*, *CaPLC3* und *CaDOA1*) möglich.

Die Essentialität von *CaPLC1* ist nicht eindeutig bewiesen, doch gibt es für *Candida albicans* keinen direkten Nachweis. Auch der Nachweis essentieller Gene nach Enloe *et. al.* (2000) ist indirekt, ebenso wie die Testung weiterer regulierbarer Promotoren, bei denen, wie beim verwendeten *MET3*- Promotor, auch immer wieder das Problem geringer vorhandener Transkriptmengen und ihrer ausreichenden Wirkung in der Zelle auftreten kann. Die Frage der Essentialität sollte nicht überbewertet werden, zumal *CaPLC1* aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu anderen eukaryotischen Phospholipasen der Klasse C kein bevorzugtes Ziel für mögliche Antimykotika wäre.

Die Lokalisation des Proteins CaPlc1 in der Zelle sollte durch Markierung des Proteins, beispielsweise mit GFP (green fluorescence protein), geklärt werden. Zusätzlich könnte in einem dafür nötigen Konstrukt die in dieser Arbeit postulierte Kernlokalisationssequenz (NLS) deletiert werden und in einem anschließenden Experiment die zu erwartende Lokalisationsänderung von CaPlc1 dokumentiert werden.

Aus der Kernlokalisierung von CaPlc1 ergäbe sich die Frage, ob in *C. albicans*, wie in *S. cerevisiae*, ein Inositolpolyphosphat- Signalweg am mRNA- Export beteiligt ist. Dafür würde sich anbieten, die Inositolhexakisphosphat-Konzentration (IP₆) in Wildtyp und *CaPLC1*-Mutanten zu vergleichen. In der Mutante sollte kein IP₆ im Kern mehr entstehen oder zumindest deutlich reduzierte Mengen, die aber noch das Überleben der Zelle sichern. Die Anreicherung von mRNA im Zellkern ließe sich z.B. mit fluoreszenzmarkierten Oligo (dT) Primern (z.B. von molecular probes) oder digoxigeninmarkierten Oligo (dT) Primern (s. York *et al.* 1999) nachweisen.

Für das nähere Verständnis der Funktion der CaPlc1 ist das Wissen um Bindungspartner von Nutzen. Diese würden sich aus einem „yeast-two-hybrid“ Test ergeben. Da solche Tests durch die abweichende Übersetzung des CUG-Codons in Serin statt Leucin erschwert werden, könnten alternativ zumindest Bindungstest mit

den homologen *C. albicans* – Genen zu den bekannten Bindungspartnern von ScPlc1 durchgeführt werden.

Trotz der großen Phänotypsuche bei der CaPlc2/CaPlc3-Doppelmutante in dieser Arbeit und auch der Suche von Knechtle *et al.* (2005) ist kein Anhaltspunkt für die Funktion von CaPlc2 und CaPlc3 vorhanden. Dennoch wären ähnliche Experimente, wie oben zu CaPlc1 beschrieben, möglich. Diese hätten dann jedoch allgemeineren Suchcharakter. So gäben resultierende Bindungspartner aus „yeast-two-hybrid“ Tests möglicherweise Hinweise auf die Funktion der Proteine in der Zelle. Die Lokalisation würde den Ort der ausgeübten Funktion in der Zelle ergeben. Da die IP₃ – Konzentration während der Hyphenbildung steigt (Gadd und Foster, 1997), ist hinsichtlich der gefundenen verzögerten Hyphenbildung auf festen hypheninduzierenden Medien bei der Doppelmutante ein Vergleich mit dem Wildtyp über die IP₃ – Konzentrationsentwicklung auf diesen Medien relevant.

Für die Isolation und Untersuchung der 3 CaPlc – Proteine böte sich die Nutzung von phosphatidylinositolummantelten Agarosekügelchen an (für alle 7 möglichen Derivate z.B. bei molecular probes erhältlich).

Für die Funktion von CaDoa1 gilt es 2 wichtige Rollen zu bestätigen. Bei einem ähnlichen Zusammenhang von CaDoa1 mit ubiquitinvermittelten Regulationen in der Zelle wie beim entsprechenden ScDoa1 Protein, würde sich eine Bestimmung des freien Ubiquitins in den Zellen der Mutante anbieten. In der *S. cerevisiae* Mutante nimmt dessen Konzentration ab (Johnson *et al.* 1995).

Über eine Verbindung zwischen CaDoa1 Funktion und phospholipid- oder lysophospholipidhydrolysierenden Proteinen bzw. PI-Signalwegen, wie schon in dem Proteinassay dieser Arbeit gezeigt, ließen sich mit einer Wiederholung des Assays und einer anschließenden Bestimmung der Reaktionsprodukte durch Dünnschichtchromatographie genauere Aussagen bezüglich des betroffenen Enzyms machen.

Eine weitere Untersuchung der mellitinähnlichen Sequenz wie bei Clark *et al.* (1991) durch Peptidexpression und Messung der Arachidonsäurekonzentration als Produkt einer möglichen PLA bestärkte die Bedeutung und auch Funktion dieses Sequenzabschnittes.

Die beschriebene Häufung granulärer Strukturen in der CaDoa1-Mutante (s. 3.2.4) und die erhöhte Expression von *CaACB1* (s. 3.2.9) könnten in Zusammenhang stehen. Denn die Mutation von *ScAcb1* führt zur Akkumulation von Vesikeln und anderen Änderungen zellulärer Membranen (Gaigg *et al.* 2001). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der CaDoa1-Mutante könnte dies weiter erhärten.

Mittels eines „yeast-two-hybrid“ Test ließen sich die Bindungspartner für die verschiedenen Wirkungen von CaDoa1 bestimmen. Auch hier sind bereits einige aus *S. cerevisiae* bekannt und die Suche könnte sich zunächst auch auf diese beschränken.

Eine interessante Frage ist weiterhin die Lokalisation von CaDoa1 in der Zelle, deren Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit vorbereitet worden ist und zu Ende zu führen wäre. Von ScDoa1 ist eine Lokalisation im Zytoplasma und Kern beschrieben (Ghaemmaghami *et al.* 2003; Huh *et al.* 2003).

Der Phänotyp der CaDoa1-Mutante bei der Zugabe des DNA-Alkylierungsgagens' Methylmethansulfonat sowie des DNA-Replikationsblockers Hydroxyharnstoff ins Medium wäre im Falle einer Hemmung ein Hinweis auf die nukleäre Funktion. Denn für ScDoa1 ist eine Rolle bei der Ubiquitinierung bei Antwort auf DNA-Schäden und der Ubiquitinierung des Histons H2B gezeigt worden (Lis und Romesberg, 2006). Dafür sind viele Interaktionspartner bekannt, die auch in *C. albicans* für Doa1 getestet werden könnten. Hier könnte sich auch ein weiterer Unterschied zwischen ScDoa1 und CaDoa1 zeigen, weil bei der CaDoa1-Mutante keine Hemmung auf Galaktose-Medium erfolgte. Andererseits wurde die ScDoa1-Mutante auf Galaktose-Medium gehemmt, weil ScDoa1 bei der Transkription des *GAL*-Locus involviert ist (Lis und Romesberg, 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu CaPlc1 und CaDoa1 führen zu einer verbindenden Frage: Gibt es einen Zusammenhang zwischen den ubiquitinvermittelten Regulationen und phosphatidylinositolvermittelten Signalwegen? Beide Signalwege sind im Cytoplasma und im Kern vorhanden. Beide Proteine scheinen Funktionen sowohl im Cytoplasma, als auch im Kern zu haben. Für *S. cerevisiae* ist ein solcher Zusammenhang gezeigt worden (Zewail *et al.* 2003). Ein entsprechendes Experiment wäre ein Phänotypentest der Mutanten auf Wortmannin, einem Hemmer der PI-Kinasen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Phosphoinositide (PI) sind nicht nur strukturelle Bestandteile der Zellmembranen, sie sind auch wichtige Botenstoffe in verschiedenen Signalwegen im Zytoplasma und Zellkern.

PI-spezifische Phospholipasen sind mit ihrer spaltenden Funktion bei einigen Prokaryoten wichtige Virulenzfaktoren und ihre Reaktionsprodukte zudem wichtige sekundäre Botenstoffe. Diese Arbeit befasst sich näher mit Phospholipasen der Klasse C, sowie einem Gen mit einer Ähnlichkeit zu Phospholipase A₂ aktivierenden Proteinen im humanpathogenen Pilz *Candida albicans*.

Im Genom von *C. albicans* wurden 3 Gene gefunden, die für intrazelluläre Phospholipasen C kodieren, *CaPLC1*, *CaPLC2* und *CaPLC3*. Diese galt es im ersten Teil dieser Arbeit im Hinblick auf ihre Rolle und Funktion in *C. albicans* genauer zu untersuchen. Dazu wurden die Gene ausgeschaltet und die Mutanten analysiert. *CaPLC1* scheint essentiell zu sein, da eine Disruption des zweiten Allels mit verschiedenen Kassetten und Transformationen nicht erfolgreich war. Eine konditionelle Mutante, in der das zweite Allel unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors war, zeigte ähnliche Phänotypen wie die *PLC1*-Mutante in *Saccharomyces cerevisiae*. Dazu zählten eine Temperatursensitivität, gehemmtes Wachstum bei osmotischem Stress, sowie auf Medien mit anderen Kohlenstoffquellen als Glukose und auf Medien mit Arginin als alleinige Stickstoffquelle. Auch die heterozygote Mutante zeigte veränderte Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp. Zusätzlich zu den genannten ist eine verzögerte Filamentbildung auf einigen hypheninduzierenden Medien (Blutagar, Serumagar, Spider) und die Hemmung durch Nocodazol nennenswert. Die gefundenen Phänotypen stimmen mit denen der *ScPLC1*-Mutante weitestgehend überein, was vermuten lässt, dass CaPlc1 ebenfalls in verschiedenen zellulären (cytoplasmatischen, wie nuklearen) Prozessen eine Rolle spielt. Ein Microarray-Experiment zum Vergleich der Expression von Wildtyp und konditioneller *CaPLC1*-Mutante zeigte ebenfalls die Vielfältigkeit und Verzweigung der betroffenen Signalwege und deutete auf mehrere Funktionen hin. Herauszuheben ist eine Verbindung der CaPlc1-Funktion mit dem Transkriptionsrepressor CaNrg1, dessen Expression in der Mutante steigt.

Während CaPlc1 strukturell eine typische eukaryotische Phospholipase C ist, ähneln die fast identischen Proteine CaPlc2 und CaPlc3 strukturell den prokaryotischen

Phospholipasen C. In *S. cerevisiae* gibt es keine homologen Gene dazu, wohl aber in anderen *Candida*-Arten. Sie können den Verlust von CaPlc1 nicht kompensieren. Trotz unterschiedlicher Promotorregionen sind die Transkriptionsprofile beider Gene sehr ähnlich. Beide Gene sind nicht essentiell, denn Doppelmutanten überleben und zeigen sogar kaum veränderte Phänotypen. Mit Blick auf die Virulenz von *C. albicans* sind die verzögerten Hyphenbildungen auf CAA-, YCB-BSA- und Spider-Medium wie im Falle von *CaPLC1* interessant. Dennoch zeigten sich im Vergleich zum Wildtypstamm keine Unterschiede im systemischen Mausinfektionsmodell.

Der zweite Teil der Arbeit galt dem mit *CaDOA1* bezeichneten Gen, das Homologien zum Säugerprotein PLAP (Phospholipase A₂ aktivierendes Protein) und *DOA1* in *S. cerevisiae* aufweist. Alle drei haben WD-repeats in ihrer Sequenz. Ebenso wie PLAP hat auch CaDoa1 eine mellitinähnliche Sequenz, von der in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sie für die vollständige Funktionalität des Proteins nötig ist. *CaDOA1* wird sowohl in der Hefe-, als auch Hyphenform transkribiert. Das Gen ist nicht essentiell und die Mutante weist einen sehr interessanten hyperfilamentösen Phänotyp auf. Sie wächst in einem Filamentgemisch aus Pseudohyphen und Hyphen unter Bedingungen, die Hefewachstum begünstigen. Die Filamentbildung verursacht eine veränderte Kolonimorphologie. Daneben treten weitere Phänotypen auf, wie erhöhte Temperatursensitivität, die verminderte Sekretion hydrolytischer Enzyme und die erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedener Verbindungen, wie zum Beispiel Propranolol, Butanol, Coffein, Chelatoren, Azolen, Nocodazol und Cadmium. Die von der entsprechenden *S. cerevisiae* *DOA1*-Mutante bekannten Phänotypen stimmen nur teilweise mit denen der *CaDOA1*-Mutante überein, einige sind genau konträr dazu. Ein Microarray-Experiment und ein Enzymassay zur Bestimmung der Phospholipaseaktivitäten bestätigten die Verbindung der CaDoa1 Funktion mit dem Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau und der Aktivität von Phospholipasen.

6.1 SUMMARY

Phosphoinositides (PI) are structural components of cell membranes and are important second messengers in several cytoplasmic and nucleic signal transduction pathways too. PI-specific phospholipases are known prokaryotic virulence factors and their products are known second messengers.

The present work investigated class C phospholipases of the human-pathogenic fungus *Candida albicans* and a gene with similarity to a phospholipase A₂ activating protein. At least three genes in the genome of *Candida albicans* encode intracellular phospholipases C, *CaPLC1*, *CaPLC2* and *CaPLC3*. The first part of this project was to study the role and function of these three genes. Therefore the genes were disrupted and the mutants analysed. *CaPLC1* seems to be an essential gene as the disruption of the second allele was unsuccessfully, even with different disruption cassettes and transformations. A conditional mutant had the second allele under the control of the *MET3*-promoter and showed similar phenotypes to the *PLC1*-mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. These phenotypes are temperature sensitivity, inhibited growth at osmotic stress and on media with non-glucose carbon source as well as on medium with the nitrogen source arginine. Even the heterozygous $\Delta Caplc1/CaPLC1$ mutant showed altered phenotypes. Additionally to the phenotypes mentioned above the hyphal formation was impaired on hyphae inducing media, such as blood agar, serum agar, Spider medium. Further the heterozygous mutant was inhibited by nocodazole. The fact that the phenotypes of the *CaPLC1*-mutant of *C. albicans* are very similar to the phenotypes of the *ScPLC1*-mutant supposed a role of *CaPLC1* in different cellular (cytoplasmic and nucleic) processes too. A genome-wide transcriptional profiling (microarray analysis) comparing conditional mutant ($\Delta Caplc1/pMET3-CaPLC1$) and wild type (CAF2-1) gave hints for several functions due to a variety of concerned signalling pathways. Especially there is a connection between *CaPlc1* function and the transcriptional repressor *CaNrg1*, which expression increased in the mutant.

Against *CaPlc1*, which has a typical eukaryotic phospholipase C structure, are the nearly identical proteins *CaPlc2* and *CaPlc3* more similar to the prokaryotic structure of phospholipase C. There is no counterpart in *S. cerevisiae* but in other *Candida*-species for *CaPlc2* and *CaPlc3*. Both genes cannot compensate the loss of *CaPlc1*. Although the promoter sequences of *CaPLC2* and *CaPLC3* differed a lot, the

transcriptional pattern of both genes was similar. In contrast to *CaPlc1*, *CaPlc2* and *CaPlc3* are not essential, as double mutants survive and show even hardly altered phenotypes. Although the double mutants had reduced ability to produce hyphae on solid media (CAA-, YCB-BSA- and Spider-medium), these mutants were as virulent as the wild type in a model of systemic mice infection.

The second part of this study concerned a gene, named *CaDOA1*, as it has homology to the human PLAP (phospholipase A₂ activating protein) and to *ScDOA1* in *S. cerevisiae*. All three mentioned genes contain WD-repeats in their sequence. Furthermore PLAP and *CaDoa1* have a mellitin-like sequence. In this work was shown that the mellitin-like sequence is necessary for full function of *CaDoa1*.

CaDOA1 was expressed under yeast and hyphae morphologies. The gene is not essential and the mutant showed an interesting filamentous phenotype and grew as pseudohyphae and true hyphae under conditions normally support yeast growth. Further phenotypes caused in the mutants were modified colony morphologies, temperature sensitivity, reduced secretion of hydrolytic enzymes and hypersensitivity to various compounds such as propranolol, butanol, caffeine, chelators, azoles, nocodazole and cadmium. Known phenotypes of the homologous *ScDOA1*-mutant correspond only partly with the *CaDOA1*-mutant phenotypes, some are contrary. Transcriptional profiling and detected phospholipase activities in an enzyme assay, together with the phenotypes supported the hypothesis that the function of *CaDoa1* is associated with Ubiquitin-mediated proteolysis and phospholipase activity.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Andaluz, E., Coque, J. J., Cueva, R. und Larriba, G. (2001).

Sequencing of a 4.3 kbp region of chromosome 2 of *Candida albicans* reveals the presence of homologues of SHE9 from *Saccharomyces cerevisiae* and of bacterial phosphatidylinositol-phospholipase C.

Yeast **18(8)**:711-21.

Anil, S. und Samaranayake, L. P. (2003)

Brief exposure to Antimycotics Reduces the Extracellular Phospholipase Activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.

Chemotherapy. **49** (5): 243-247

Ansari, K., Martin, S., Farkasovsky, M., Ehbrecht, I.M., und Kuntzel H. (1999).

Phospholipase C binds to the receptor-like *GPR1* protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem. **274**: 30052-30058

Atir-Lande, A., Gildor, T. & Kornitzer, D. (2005)

Role for the SCFCDC4 ubiquitin ligase in *Candida albicans* morphogenesis.

Mol Biol Cell. **16**: 2772-2785

Augsten, M., Hübner, C., Nguyen, M., Künkel, W., Härtl, A. und Eck, R. (2002)

Defective Hyphal Induction of a *Candida albicans* Phosphatidylinositol 3-Phosphate 5-Kinase Null Mutant on Solid Media Does Not Lead to Decreased Virulence

Infection and Immunity. **70** (8): 4462-4470

Bain, J. M., Stubberfield, C. und Gow, N. A. (2001)

Ura-status dependent adhesion of *Candida albicans* mutants.

FEMS Microbiology Letters. **204**: 323-328

Baker, C. A., Desrosiers, K. and Dolan, J. W (2002)

Propranolol Inhibits Hyphal Development in *Candida albicans*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **46** (11): 3617-3620

Barelle, C. J., Manson, C. L., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Gow, N. A. R. und Brown, A. J. P. (2004)

GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*.

Yeast. **21**: 333-340

Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G., and Ryley, J. F. (1985).

A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts.

J Gen Microbiol **131**: 1217-1221

Bechet, J., Grenson, M. und Wiame, J. M. (1970)

Mutations Affecting the Repressibility of Arginine Biosynthetic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*.

European Journal of Biochemistry. **12**: 31-39

Bennett, D. E., McCreary, C. E. und Coleman, D. C. (1998).

Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*.

Microbiology. **144**: 55-72

Berman, J. und Sudbery, P. E. (2002)

Candida albicans: A molecular revolution built on lessons from budding yeast.

Nature Reviews in Genetics. **3**: 918-930

- Bianchi, M. M., Ngo, S., Vandenbol, M., Sartori, G., Morlupi, A., Ricci, C., Stefani, S., Morlino, G. B., Hilger, F., Carignani, G., Slonimski, P.P. und Frontali, L. (2001)**
Large-scale phenotypic analysis reveals identical contributions to cell functions of known and unknown yeast genes.
Yeast. **18**(15): 1397- 1412
- Bonifacino, J. S. und Weissman, A. M. (1998)**
Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways.
Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **14**: 19-57
- Borges-Walmsley, M. I. und Walmsley, A.R. (2000)**
cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity.
TRENDS in Microbiology. **8**(3): 133-141
- Borst, A. und Fluit, A. C. (2003)**
High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections.
Journal of Medical Microbiology. **52** (11): 971-974
- Bracken, A. P. und Bond, U. (1999)**
Reassembly and protection of small nuclear ribonucleoprotein particles by heat shock proteins in yeast cells.
RNA. **5** (12): 1586-1596
- Bruno, V. M. und Mitchell, A. P. (2004)**
Large-scale gene function analysis in *Candida albicans*
TRENDS in Microbiology.
- Bunting, M., Lorant, D. E., Bryant, A. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T.M., Stevens, D. L. und Prescott, S. M. (1997)**
Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells.
J.Clin. Investig. **100**: 565-574
- Butler, D. K., All, O., Goffena, J., Loveless, T., Wilson, T. & Toenjes, K. A. (2006)** The *GRR1* gene of *Candida albicans* is involved in the negative control of pseudohyphal morphogenesis.
Fungal Genet Biol. **43**: 573-582
- Calderone, R. A. und Fonzi, W. A. (2001)**
Virulence factors of *Candida albicans*.
TRENDS in Microbiology. **9**(7): 327-335
- Camilli, A., Goldine, H. and Portnoy, D. A. (1991)**
Listeria monocytogenes mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent.
Journal of Experimental Medicine. **173**: 751-754
- Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K. M. und Sudbery, P. E. (1999)**
The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics
Molecular Microbiology. **34**(4): 792-798
- Casadevall, A. und Pirofski, L.-A. (2003)**
On the Definition of Virulence.
ASM News. **69**(5): 217
- Clark, M. A., Özgür, L. E., Conway, T. M., Dispoto, J., Crooke, S. T. und Bomalaski, J. S. (1991)**
Cloning of a phospholipase A₂-activating protein.
PNAS. **88**: 5418-5422
- Cocchetti, P., Tisi, R., Martegani, E., Teixeira, L. S., Brandao, R. L., Castro, I. de M. und Thevelein, J. M. (1998)**
The *PLC1* encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase.
Biochimica et Biophysica Acta. **1405**: 147-154

- Cooper, K. F., Mallory, M. J. and Strich, R. (1999)**
Oxidative Stress-Induced Destruction of the Yeast C-Type Cyclin Ume3p Requires Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C and the 26S Proteasome.
Molecular and Cellular Biology. **19** (5): 3338-3348
- De Backer, M. D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., and Luyten, W. H. M. L. (1999)**
Transformation of *Candida albicans* by Electroporation.
Yeast. **15**: 1609-1618
- De Backer, M. D., Magee, P. T. und Pla, J. (2000)**
Recent Developments in Molecular Genetics of *Candida albicans*.
Annual Reviews of Microbiology. **54**: 463-498
- De Backer, M. D., Nelissen, B., Logghe, M., Viaene, J., Loonen, I., Vandoninck, S., de Hoogt, R., Dewaele, S., Simons, F. A., Verhasselt, P., Vanhoof, G., Contreras, R. und Luyten, W. H. M. L. (2001)**
An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*.
Nature Biotechnology. **19**: 235-241
- Decottignies, A., Evain, A. und Ghislain, M. (2004)**
Binding of Cdc48p to a ubiquitin-related UBX domain from novel yeast proteins involved in intracellular proteolysis and sporulation.
Yeast. **21**: 127-139
- d'Enfert, C., Goyard, S., Rodriguez-Arnaveilhe, S und 25 weitere Autoren (2005)**
Candida DB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics.
Nucleic Acids Res. **33**: D353-D357
- Desrivieres, S., Cooke, F. T., Parker, P. J. und Hall, M. N. (1998)**
MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biol Chem. **273**(25):15787-15793
- Dingwall, C. und Laskey, R. A. (1991)**
Nuclear targeting sequences – a consensus?
TIBS. **16**: 478-481
- Dolan, J. W., Bell, A. C., Hube, B., Schaller, M., Warner, T. F. und Balish, E. (2004)**
Candida albicans PLD1 activity is required for full virulence.
Medical Mycology. **42** (5): 439-447
- Duina, A. A., Chang, H. C., Marsh, J. A., Lindquist, S. und Gaber, R. F. (1996)**
A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction.
Science. **274** (5293): 1613-1614.
- Eckmann, L., Reed, S. L., Smith, J. R. und Kagnoff, M. F. (1995)**
Entamoeba histolytica trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1a.
J. Clin. Investig. **96**: 1269-1279
- Ella, K. M., Dolan, J. W., Qi, C. und Meier, K. E. (1996)**
Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in expression of phospholipase D.
Biochem J. **314**: 15-9
- Emanuelsson, O., Nielson, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (2000)**
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.
J Mol Biol. **300**: 1005-1016

Enjalbert, B., Nantel, A. und Whiteway, M. (2003)

Stress-induced Gene Expression in *Candida albicans*: Absence of a General Stress Response.
Molecular Biology of the Cell. **14**:1460-1467

Enloe, B., Diamond, A. und Mitchell, A. P. (2000)

A Single-Transformation Gene Function Test in Diploid *Candida albicans*.
Journal of Bacteriology. **182 (20)**: 5730-5736

Ernst, J. F. (2000)

Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis.
Microbiology. **146**: 1763-1774

Exton, J. H. (1998)

Phospholipase D
Biochimica et Biophysica Acta. **1436**: 105-115

Faergeman, N. J., Feddersen, S., Christiansen, J. K., Larsen, M. K., Schneider, R., Ungermann, C., Mutenda, K., Roepstorff, P. und Knudsen, J. (2004)

Acyl-CoA-binding protein, Acb1p, is required for normal vacuole function and ceramide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem J. **380**: 907-918.

Falquet, L., Garni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K. und Bairoch, A. (2002)

The PROSITE database, ist status in 2002.
Nucleic Acids Res. **30**: 235-238

Fankhauser, H., Schweingruber, A. M., Edenharter, E. und Schweingruber, M. E. (1995).

Growth of a mutant defective in a putative phosphoinositide-specific phospholipase C of *Schizosaccharomyces pombe* is restored by low concentrations of phosphate and inositol.
Curr Genet. **28**: 199-203

Flick, J. S. und Thorner, J. (1993).

Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol **13**: 5861-5876

Flick, J. S. und Thorner, J. (1998).

An essential function of a phosphoinositide-specific phospholipase C is relieved by inhibition of a cyclin-dependent protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics **148**: 33-47

Fonzi, W. A. und Irwin, M. Y. (1993)

Isogenic Strain Construction and Gene Mapping in *Candida albicans*
Genetics. **134**: 717-728

Fyrst, H., Oskouian, B., Kuypers, F. A. und Saba, J. D. (1999)

The *PLB2* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Confers Resistance to Lysophosphatidylcholine and Encodes a Phospholipase B/ Lysophospholipase.
Biochemistry. **38**: 5864-5871

Gadd, G. M. und Foster, S. A. (1997)

Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in *Candida albicans*: significance as a precursor of inositol polyphosphates and in signal transduction during the dimorphic transition from yeast cells to germ tubes.
Microbiology. **143**: 437-448

Gaigg, B., Neergaard, T.B., Schneider, R., Hansen, J. K., Faergeman, N. J., Jensen, N. A., Andersen, J. R., Friis, J., Sandhoff, R., Schroder, H. D. und Knudsen, J. (2001)

Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Biol Cell. **12(4)**: 1147-1160.

Gerami-Nejad, M., Berman, J. und Gale, C. A. (2001)

Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*
Yeast. **18**: 859-864

Geoffroy C., Raveneau, J. Beretti, J. L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J. A., Alouf J.E. and Berche, P. (1991)

Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*.
Infection and Immunity. **59**: 2382-2388

Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. und Weissmann, J. (2003)

Global analysis of protein expression in yeast.
Nature. **425**: 737-741

Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143

Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F. und Varshavsky, A. (1996)

Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO Journal. **15** (18): 4884-4899

Goyal, S. und Khuller, G. K. (1992)

Phospholipid composition and subcellular distribution in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*.
Journal of Medical and Veterinary Mycology. **30**: 355-362

Griffith, O. H. und Ryan, M. (1999)

Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids.
Biochimica et Biophysica Acta. **1441**: 237-254

Guarino, L. A., Smith, G. und Dong, W. (1995)

Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor.
Cell. **80** (2): 301-309.

Hairfield, M. L., Westwater, C. und Dolan, J.W. (2002)

Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity is stimulated during temperature-induced morphogenesis in *Candida albicans*.
Microbiology. **148** (6):1737-1746

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **136**: 557-580.

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of *Escherichia coli*.
In *DNA Cloning, Volume 1, a practical approach* (Glover, D.M.; Hrsg.), S. 109-135. Oxford.

Harrison, T. S., Chen, J., Simons, E. und Levitz, S. M. (2002)

Determination of the pH of the *Cryptococcus neoformans* vacuole
Medical Mycology. **40**: 329-332

Haynes, K. (2001)

Virulence in *Candida* species.
TRENDS in Microbiology. **9**(12): 591-596

Hipler, U.-C., Knöll, B. und Elsner, P. (2004)

Dermatomykologisches Erregerspektrum der Hautklinik Jena.
Mycoses. **47**: 365

- Hoover, C. I., Jantapour, M. J., Newport, G., Agabian, N., and Fisher, S. J. (1998).**
Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) gene.
FEMS Microbiol Lett **167**: 163-169
- Hromatka, B. S., Noble, S. M. & Johnson, A. D. (2005)**
Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence.
Mol Biol Cell. **16**: 4814-4826.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. und Schäfer, W. (2000).**
Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members.
Arch Microbiol. **174**: 362-374
- Hube, B., Hess, D., Baker, C. A., Schaller, M., Schäfer, W. und Dolan, J. W. (2001).**
The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*.
Microbiology. **147**(4):879-89
- Huh, W., Falvo, J., Gerke, L., Carroll, A., Howson, R., Weissmann, J. und O'Shea, E. (2003).**
Global analysis of protein localization in budding yeast.
Nature. **425**: 686-691
- Hwang, C.S., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S. und Kang, S.O. (2003).**
Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*.
Molecular Microbiology. **47**(4):1029-43
- Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., Edwards, J. E., Nozawa, Y. und Ghannoum, M. A. (1995)**
Evidence Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of *Candida albicans*.
Infection and Immunity. **63** (5): 1993-1998
- Jensen-Pergakes, K., Guo, Z., Giattina, M., Sturley, S. L. und Bard, M. (2001)**
Transcriptional regulation of the two sterol esterification genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
J Bacteriol. **183**(17): 4950-4957.
- Johnson, E. S., Maß, P. C. M., Ota, I. M. und Varshavsky, A. (1995)**
A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal.
The Journal of Biological Chemistry. **270** (29): 17442-17456
- Jungmann, J., Reins, H.-A., Schobert, C. und Jentsch, S. (1993)**
Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis.
Nature. **361**: 369-370
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J. (1994)**
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
14. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Keil, R. L., Wolfe, D., Reiner, T., Peterson, C. J. und Riley, J. L. (1996)**
Molecular Genetic Analysis of Volatile-Anesthetic Action.
Molecular and Cellular Biology. **16** (7): 3446-3453
- Knechtle, P., Goyard, S., Brachat, S., Ibrahim-Granet, O. und d'Enfert, C. (2005)**
Phosphatidylinositol-dependent phospholipases C Plc2 and Plc3 of *Candida albicans* are dispensable for morphogenesis and host-pathogen interaction.
Res Microbiol. **156** (7): 822-829
- Kohler, J. R. und Fink, G. R. (1996)**
Candida albicans strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development.
PNAS. **93**: 13223-13228

- Kullberg, B. J. und Oude Lashof, A. M. L. (2002)**
Epidemiology of opportunistic invasive mycoses.
Eur J Med Res. **7**: 183-191
- Kumamoto, C. A. & Vinces, M. D. (2005a)**
Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces.
Annu Rev Microbiol. **59**: 113-133
- Kumamoto, C. A. & Vinces, M. D. (2005b)**
Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence.
Cell Microbiol. **7**: 1546-1554
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K. H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G. S. und Snyder, M. (2002)**
Subcellular localization of the yeast proteome.
Genes and Development. **16 (6)**: 707-719
- Laprade, L., Boyartchuk, V. L., Dietrich, W. F. und Winston, F. (2002)**
Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence.
Genetics. **161**: 509-519
- Lee, K.L., Buckley, H.R. und Campbell, C.C. (1975)**
An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*.
Sabouraudia. **13(2)**:148-53.
- Lee, K. S., Patton, J. L., Fido, M., Hines, L. K., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., Henry S. A. und Levin, D. E. (1994)**
The *Saccharomyces cerevisiae* *PLB1* Gene Encodes a Protein Required for Lysophospholipase and Phospholipase B Activity.
The Journal of Biological Chemistry. **269 (31)**: 19725-19730
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y., and Ghannoum, M. A. (1998)**
Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*.
J Biol Chem **273**: 26078-26086
- Leng, P., Sudbery, P. E. & Brown, A. J. (2000)**
Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen *Candida albicans*.
Mol Microbiol. **35**: 1264-1275
- Leng, P., Lee, P. R., Wu, H. und Brown, A. J. (2001)**
Efg1, a morphogenetic regulator in *Candida albicans*, is a sequence-specific DNA binding protein.
J Bacteriol. **183(13)**:4090-3
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbrück, S. und Ernst J. F. (1997)**
Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*
Gene. **192**: 235-240
- Lin, H., Choi, J. H. und Vancura, A. (1998)**
Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Interacts with Phosphatidylinositol Kinase Homolog TOR2.
Biochemical and Biophysical Research Communications. **252**: 285-289
- Lin, H., Choi, J. H., Hasek, J., DeLillo, N., Lou, W. und Vancura, A. (2000)**
Phospholipase C Is Involved in Kinetochores Function in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molecular and Cellular Biology. **20 (10)**: 3597-3607

Lis, E.T. und Romesberg, F. E. (2006)

Role of Doa1 in the *Saccharomyces cerevisiae* DNA Damage Response.
Molecular and Cellular Biology. **26** (11): 4122-4133

Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C. S. und Cantley, L. C. (1994)

Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D.
J. Biol. Chem. **269**: 21403-21406

Mago, N. und Khuller, G. K. (1990)

Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*.
Journal of Medical and Veterinary Mycology. **28**: 355-362

Mahmoudabadi, A. Z., Boote, V. und Drucker, D. B (2001)

Characterization of polar lipids of oral isolates of *Candida*, *Pichia* and *Saccharomyces* by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FAB MS).
Journal of Applied Microbiology. **90**: 668-675

Marquis, H. und Hager, E. J. (2000)

pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*.
Molecular Microbiology. **35** (2): 289-298

Martin, S. W. und Konopka, J. B. (2004)

SUMO Modification of Septin-interacting Proteins in *Candida albicans*.
The Journal of Biological Chemistry. **279** (39): 40861-40867

Massey, S.E., Moura, G., Beltrao, P., Almeida, R., Garey, J. R., Tuite, M.F., Santos, M.A. (2003)

Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp.
Genome Res. **13**(4):544-57

Mattanovich, D., Ruker, F., Machado, A. C., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G. & Katinger, H. (1989)

Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation.
Nucleic Acids Res. **17**(16):6747

McLain, N. und Dolan, J. W. (1997).

Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology*. **143** (11):3521-6

Melchior, F., Schergaut, M. und Pichler, A. (2003)

SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores.
Trends Biochem Sci. **28**(11):612-8.

Mendling (2004)

Inzidenz, Risikokonstellation und Therapie vaginaler Pilzinfektionen.
Mycoses. **47**: 373

Merkel, O., Fido, M., Mayr, J. A., Prüger, H., Raab, F., Zandonella, G., Kohlwein, S. D. und Paltauf, F. (1999)

Characterization and Function *in Vivo* of Two Novel Phospholipases B/ Lysophospholipases from *Saccharomyces cerevisiae*.
The Journal of Biological Chemistry. **274** (40): 28121-28127

Meyers, D. J. and Berk, R. S. (1990)

Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent.
Infection and Immunity. **58**: 659-666

Mirbod, F., Banno, Y., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Nakashima, S., Kitajima, Y., Cole, G.T. und Nozawa, Y. (1995)

Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*.

Biochimica et Biophysica Acta. **1257**: 181-188

Monteoliva, L., Lòpez Matas, M., Gil, C., Nombela, C. und Pla, J. (2002)

Large-Scale Identification of Putative Exported Proteins in *Candida albicans* by Genetic Selection.

Eukaryotic Cell. **1 (4)**: 514-525

Morschhäuser, J., Michel, S. und Staib, P. (1999)

Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination.

Molecular Microbiology. **32**: 547-556

Mukherjee, P. K., Seshan, K. R., Leidich, S. D., Chandra, J., Cole, G. T. und Ghannoum, M.A. (2001)

Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo.

Microbiology. **147**: 2585-2597

Mullally, J. E., Chernova, T. & Wilkinson, K. D. (2006)

Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain.

Mol Cell Biol. **26**: 822-830

Murad, A. M. A., Lee, P. R., Broadbent, I. D., Barelle, C. J. und Brown, A. J. P. (2000)

Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*

Yeast. **16**: 325-327

Murad, A. M. A., d'Enfert, C., Gailardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., Marechal, D., Marchais, V., Cottin, J. und Brown, A. J. P. (2001)

Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1.

Molecular Microbiology. **42 (4)**: 981-993

Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. und Pla, J. (2001)

Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*.

FEMS Microbiology Reviews. **25**: 245-268

Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. und Smith, T. F. (1994)

The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins.

Nature. **371**: 297-300

Ochocka, A.-M. und Pawelczyk, T. (2003)

Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C and their role in signal transduction in the cell

Acta Biochimica Polonica. **50 (4)**: 1097-1110

Odds, F. C. (1994)

Candida Species and Virulence.

ASM News. **60(6)**: 313-318

Odds, F. C., Calderone, R. A., Hube, B., und Nombela, C. (2003)

Virulence in *Candida albicans*: Views and Suggestions from a Peer-Group Workshop.

ASM News. **69(2)**: 54-55

Odom, A. R., Stahlberg, A., Wentz, S. R. und York, J. D. (2000)

A Role for Nuclear Inositol 1,4,5-Triphosphate Kinase in Transcriptional Control.

Science. **287**: 2026-2029

Okada, M., Fujii, M., Yamaga, M., Sugimoto, H., Sadano, H., Osumi, T., Kamata, H., Hirata, H. und Yagisawa, H. (2002)

Carboxyl-terminal basic amino acids in the X domain are essential for the nuclear import of phospholipase C d₁.

Genes to Cells. **7**: 985-996

Payne WE, Fitzgerald-Hayes M. (1993).

A mutation in *PLC1*, a candidate phosphoinositide-specific phospholipase C gene from *Saccharomyces cerevisiae*, causes aberrant mitotic chromosome segregation. *Mol Cell Biol*. **13(7)**:4351-64

Peitsch, M. C., Borner, C. und Tschopp, J. (1993)

Sequence similarity of phospholipase A₂ activating protein and the G protein β-subunits: a new concept of effector protein activation in signal transduction?

TIBS. **18**: 292-293

Price, M. F. und Cawson, R. A. (1977)

Phospholipase activity in *Candida albicans*.

Sabouraudia. **15**: 179-185

Price, M. F., Wilkonson, I. D. und Gentry, L. O. (1982)

Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*.

Sabouraudia. **20**: 7-14

Proikas-Cezanne, T., Waddel, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A. und Nordheim, A. (2004)

WIPI-1a (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy.

Oncogene. **23**: 9314-9325

Raynaud, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Smith, I., Gicquel, B. and Jackson, M. (2002)

Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*.

Molecular Microbiology. **45** (1): 203-217

Rhee, S. G. (2001)

Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C

Annual Reviews of Biochemistry. **70**: 281-312

Ribardo, D. A., Crowe, S. E., Kuhl, K. R., Peterson, J. W. und Chopra, A. K. (2001)

Prostaglandin Levels in Stimulated Macrophages Are Controlled by Phospholipase A₂-activating Protein and by Activation of Phospholipase C and D.

The Journal Of Biological Chemistry. **276** (8): 5467-5475

Roig, P. und Gozalbo, D. (2003)

Depletion of polyubiquitin encoded by the *UBI4* gene confers pleiotropic phenotype to *Candida albicans* cells.

Fungal Genetics and Biology. **39** : 70-81

Roig, P. und Gozalbo, D. (2002)

Candida albicans *UBI3* and *UBI4* promoter regions confer differential regulation of invertase production to *Sacharomyces cerevisiae* cells in response to stress.

Int Microbiol. **5**: 33-36

Rottman, M., Dieter, S., Brunner, H. und Rupp, S. (2003)

A screen in *Saccharomyces cerevisiae* identified CaMCM1, an essential gene in *Candida albicans* crucial for morphogenesis.

Molecular Microbiology. **47** (4): 943-959

Rüchel, R., Kellner, S. und Schaffrinski, M. (2002)

Renewed increase in *Candida albicans* among isolates from the Göttingen university hospital.

Mycoses. **45**: 109-110

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.: Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2. Edition. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989

Sánchez-Martínez, C. and Pérez-Martín, J. (2002)

Gpa2, a G-Protein α Subunit Required for Hyphal Development in *Candida albicans*.
Eukaryotic Cell. **1** (6): 865-874

Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. und Bille, J. (1996)

Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors.
Antimicrob Agents Chemother. **40**(10):2300-2305.

Santos, M. A. und Tuite, M. F. (1995)

The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*.
Nucleic Acids Res. **23**: 1481-1486

Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C. und Lopez-Ribot, J. L. (2003)

Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection.
Eukaryotic Cell. **2** (5): 1053-1060

Schaloske, R. und Malchow, D. (1997)

Mechanism of cAMP-induced Ca^{2+} influx in *Dictyostelium*: role of phospholipase A2.
Biochem J. **327**: 233-8.

Schmiel, D. H. und Miller, V. L. (1999)

Bacterial phospholipases and pathogenesis.
Microbes and Infection. **1**: 1103-1112

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. und Schröppel, K. (2000)

The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*.
Mol Microbiol. **38**(3):435-45.

Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtt, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. und Khochbin, S. (2001)

Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex : Links between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways.
Molecular and Cellular Biology. **21** (23): 8035-8044

Sepulveda, P., Lopez-Ribot, J. L., Gozalbo, D., Cervera, A., Martinez, J. P. und Chaffin, W. L. (1996)

Ubiquitin-Like Epitopes Associated with *Candida albicans* Cell Surface Receptors.
Infection and Immunity. **64** (10): 4406-4408

Shepherd, M. G., Yin, C. Y., Ram, S. P. und Sullivan, P. A. (1980)

Germ tube induction in *Candida albicans*.
Canadian Journal of Microbiology. **26**: 21-26

Slaaby, R., Knott, T. und Davey, J. (1997).

Characterisation of a phospholipase Cd from *Schizosaccharomyces pombe*.
Biochemical Society Transactions. **25**: 225S

Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. und Neer, E. J. (1999)

The WD repeat: a common architecture for diverse functions.
TIBS. **24**: 181-185

Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. und Rupp, S. (2003)

EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays.
Molecular Microbiology. **47** (1): 89-102

Souza, M. A. A., Trópia, M. J. und Brandao, R. L. (2001)

New aspects of the glucose activation of the H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiology. **147**: 2849-2855

Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. und Sundstrom, P. (1999)

Adhesive and Mammalian Transglutaminase Substrate Properties of *Candida albicans* Hwp1
Science. **283**: 1535-1538

Staab, J. F. und Sundstrom, P. (2003)

URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes.
TRENDS in Microbiology. **11** (2): 69-73

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E. und Ernst, J. F. (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.
The EMBO Journal. **16**(8): 1982-1991

Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K., Martin, W. E., Hankin, J. A., Murphy, R. C., Chen, W., Lim, K. B., Hackett, M., Vasil, A. I. und Vasil, M. L. (2002)

A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C.
Molecular Microbiology. **46** (3): 661-676

Stryer, L. (1994)

Biochemie.
2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Sudbery, P. E. (2001)

The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization.
Molecular Microbiology. **41** (1): 19-31

Sugiyama Y, Nakashima S, Mirbod F, Kanoh H, Kitajima Y, Ghannoum MA, Nozawa Y. (1999).

Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*.
Med Mycol. **37**(1): 61-67

Swain, E., Baudry, K., Stukey, J., McDonough, V., Germann, M. und Nickels, J.T. Jr. (2002)

Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Biol Chem. **277**(29): 26177- 26184.

Takahashi, M., Banno, Y. und Nozawa, Y. (1991)

Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase.
Journal of Medical and Veterinary Mycology. **29**: 193-204

Takemaru, K., Harashima, S., Ueda, H. und Hirose, S. (1998)

Yeast coactivator *MBF1* mediates *GCN4*-dependent transcriptional activation.
Mol Cell Biol. **18**(9): 4971-4976.

Takemori, Y., Sakaguchi, A., Matsuda, S., Mizukami, Y. und Sakurai, H. (2006)

Stress-induced transcription of the endoplasmic reticulum oxidoreductin gene *ERO1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Genet Genomics. **275**(1): 89-96

Tang, X., Waksman, M., Ely, Y. und Liscovitch, M. (2002)

Characterization and regulation of yeast Ca²⁺-dependent phosphatidylethanolamine-phospholipase D activity.
European Journal of Biochemistry. **269** (15): 3821-3830

Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C. Y., Nichterlein, T., Hacker, J., Nigam, S., Agabian, N. und Kohler, G. A. (2006)

Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence.

Int J Med Microbiol. **296**(6):405-420

Titball, R. W. (1993)

Bacterial phospholipases C.

Microbiological Reviews. **57**: 347-366

Toker, A. (2002)

Phosphoinositides and signal transduction.

Cellular and Molecular Life Science. **59**: 761-779

Tzermia, M., Horaitis, O. und Alexandraki, D. (1994)

The complete sequencing of a 24.6 kb segment of yeast chromosome XI identified the known loci *URA1*, *SAC1* and *TRP3*, and revealed 6 new open reading frames including homologues to the threonine dehydratases, membrane transporters, hydantoinsases and the phospholipase A2-activating protein.

Yeast. **10**: 663-679

Tzung, K. W., Williams, R. M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R. W. und Agabian, N. (2001)

Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*.

Proc Natl Acad Sci. **98**(6): 3249-53

Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N. und Johnson, A. D. (2003)

Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*.

EMBO J. **22**: 2668-2678

Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M. und Uehara, Y. (2002)

Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*.

Yeast. **19**: 611-618

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. und Mazur, M. (2006)

Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.

Chemico-Biological Interactions. **160**: 1-40

Van der Voorn, L. und Ploegh, H. L. (1992)

The WD-40 repeat.

FEBS. **307** (2): 131-134

Vanhalewyn, M., Dumortier, F., Debast, G., Colombo, S., Ma, P., Winderickx, J., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M. (1999)

A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, Cyr K1876M, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level.

Molecular Microbiology. **33** (2): 363-376

Vogel, J. L., Parsell, D. A. und Lindquist, S. (1995)

Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation.

Curr Biol. **5** (3): 306-317

Waksman, M., Eli, Y., Liscovitch, M., Gerst, J. E. (1996)

Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast.

J Biol Chem. **271** (5): 2361-4

Watt, R. und Piper, P. W. (1997)

UBI4, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control.

Mol Gen Genet. **253**: 439-447

- Wera, S., Bergsma, J. C. T. und Thevelein, J. M. (2001)**
Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling
FEMS Yeast Research. **1**: 9-13
- Wilson, R. B., Davis, D. und Mitchell, A. P. (1999)**
Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions.
Journal of Bacteriology. **181 (6)**: 1868-1874
- Wilson, T. E. (2002)**
A Genomics-Based Screen for Yeast Mutants With an Altered Recombination / End-Joining Repair Ratio.
Genetics. **162**: 677-688
- Wolfe, D., Hester, P. und Keil, R. L. (1998)**
Volatile anesthetic additivity and specificity in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for yeast as a model system to study mechanisms of anesthetic action.
Anesthesiology. **89 (1)**: 174-181
- Wolfe, D., Reiner, T., Keeley, J. L., Pizzini, M. und Keil, R. L. (1999).**
Ubiquitin Metabolism Affects Cellular Response to Volatile Anesthetics in Yeast.
Mol Cell Biol. **19 (12)**: 8254-8262
- Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R.J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R. und Sturley, S. L. (1996).**
Sterol esterification in yeast: a two-gene process.
Science. **272(5266)**: 1353-1356
- Yesland, K. und Fonzi, W. A. (2000).**
Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles.
Microbiology. **146**: 2097-2104
- Yoko-o T, Matsui Y, Yagisawa H, Nojima H, Uno I, Toh-e A. (1993).**
The putative phosphoinositide-specific phospholipase C gene, PLC1, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is important for cell growth.
Proc Natl Acad Sci U S A. **90(5)**:1804-8
- York, J. D., Odom, A. R., Murphy, R., Ives, E. B. und Wentz, S. R. (1999)**
A Phospholipase C-Dependent Inositol Polyphosphate Kinase Pathway Required for Efficient Messenger RNA Export.
Science. **285**: 96-100
- York, J. D., Guo, S., Odom, A.R., Spiegelberg, B. D. und Stolz, L. E. (2001)**
An Expanded View of Inositol Signaling.
Advanced Enzyme Regulation. **41**: 57-71
- Yost, H. J. und Lindquist, S. (1991)**
Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol. **11 (2)**: 1062-1068
- Zewail, A., Xie, M. W., Xing, Y., Lin, L., Zhang, P. F., Zhou, W., Saxe, J. P. und Huang, J. (2003).**
Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin.
PNAS. **100 (6)**: 3345-3350

Verwendete Internetressourcen

<http://www.yeastgenome.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB>

<http://genodb.pasteur.fr/CandidaDB>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

<http://www.allergopharma.de>

[http:// genome-www.stanford.edu/group/botlab/protocols.html](http://genome-www.stanford.edu/group/botlab/protocols.html)

8 PUBLIKATIONEN

Poster und Vorträge

- 2000 „Mögliche Signaltransduktion der Phospholipase C1 in *Candida albicans*“ Poster auf der MYK
- 2001 „Untersuchung von Phospholipasen bei *Candida albicans* – Ist Phospholipase C1 essentiell?“ beim Doktoranden- und Diplomandentreffen des RKI
- 2002 „Untersuchungen zu Phospholipasen der Klasse C bei *Candida albicans*: Ein steiniger Weg“ beim DGHM-Fachgruppentreffen

Publikationen

Bader, O., Hube, B., **Kunze, D.**, Schröppel, K. (2003)

Statusworkshop der Fachgruppe „Eukaryontische Krankheitserreger“
(Mitteilungen der Fachgruppen) *Hygiene und Mikrobiologie* 7 (2): 51-53

Niewerth, M., **Kunze, D.**, Seibold, M., Schaller, M., Korting, H. C. und Hube, B. (2003)

Ciclopirox Olamine Treatment Affects the Expression Pattern of *Candida albicans* Genes Encoding Virulence Factors, Iron Metabolism Proteins, and Drug Resistance Factors.
Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 47 (6): 1805-1817

D'Enfert, C., Goyard, S., Rodriguez-Arnaveilhe, S., Frangeul, L., Jones, L., Tekaiia, F., Bader, O., Albrecht, A., Castillo, L., Dominguez, A., Ernst, J. F., Fradin, C., Gaillardin, C., Garcia-Sanchez, S., de Groot, P., Hube, B., Klis, F. M., Krishnamurthy, S., **Kunze, D.**, Lopez, M.-C., Mavor, A., Martin, N., Moszer, I., Onèsime, D., Perez Martin, J., Sentandreu, R., Valentin, E. and Brown, A. J. P. (2005)

CandidaDB: a genome database for *Candida albicans* pathogenomics.
Nucleic Acids Research. 33. Database issue: D353-D357

Kunze, D., Melzer, I., Bennett, D., Sanglard, D., MacCallum, D., Nörskau, J., Coleman, D. C., Odds, F. C., Schäfer, W. und Hube, B. **(2005)**

Functional analysis of the phospholipase C gene *CaPLC1* and two unusual phospholipase C genes, *CaPLC2* and *CaPLC3*, of *Candida albicans*.

Microbiology. 151: 3381-3394

Kunze, D., MacCallum, D., Odds, F. C. und Hube, B. **(2007)**

Multiple functions of *DOA1* in *Candida albicans*.

Microbiology. 153: 1026-1041

9 ANHANG**9.1 Abkürzungen**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BD	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
bidest.	bidestilliert (aqua bidestillata)
bp	Basenpaar(e) [base pair]
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Candida GO	Candida Gene Ontology
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
fwd.	forward/ vorwärts
G	Guanin
gen.	genomisch
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
inkl.	inklusive
IP ₃ = I(1,4,5)P ₃	Inositoltrisphosphat, bzw. Inositol1,4,5-trisphosphat
IP ₄	Inositoltetraakisphosphat
IP ₆	Inositolhexakisphosphat
Konz.	Konzentration
konz.	Konzentriert
LP	Lysophospholipase
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPTA (h-LPTA)	Lysophospholipase-Transacylase
LysoPL	Lysophospholipase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MCS	multi cloning site, Region im Plasmid mit vielen Restriktionsstellen
N	bezeichnet eine beliebige Base in der Gensequenz bzw. beliebige Aminosäure in der Proteinsequenz
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame = Leserahmen eines Gens

PA	Phosphatidsäure (phosphatidic acid)
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PI	Phosphoinositid
PLA	Phospholipase A
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLAP	Phospholipase A aktivierendes Protein
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
rev.	reverse/ rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
T	Thymin
u.	und
UE	Untereinheit
ü. N.	über Nacht
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

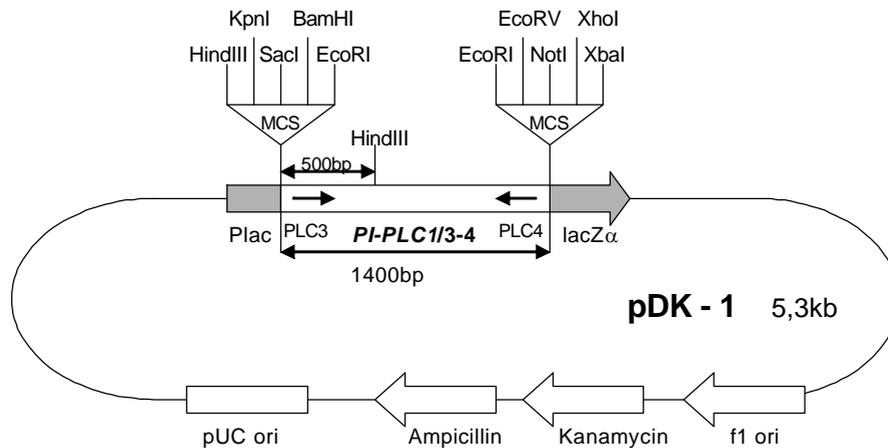
9.2 Ausführliche Tabelle zur Microarray-Analyse der Transkriptionsprofile von CaDOA1-Mutante und Wildtyp (s. 3.2.9)

Systemat. Name	Allg. Name	x-fach	t-test (P-Wert)	Funktionsbeschreibung nach GO
CA2825	HWP1	11,1	0,00336	Hyphenwandprotein
CA4265	GAP6	5,5	0,00048	generelle Aminosäurenpermease
CA2832	CRD1	4,1	0,01823	Metallionenbindung, ATP-Bindung, Hydrolase, Transkriptionsfaktor
CA5042	IPF4514	4,1	0,02264	kein Go
CA5857	PCK1	3,7	0,00023	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
CA2517	IPF4311	3,3	0,02552	kein GO
CA1120	IPF7666	3,2	0,02469	Transkriptionsfaktor
CA2638	GAP3	3,1	0,01910	generelle Aminosäurenpermease
CA1191	CAN2	3,0	0,04054	Aminosäurenpermease
CA2738	STF2	2,9	0,00562	Funktion unbekannt
CA0116	IPF17975	2,6	0,01178	kein GO
CA4220	IPF8762	2,5	0,00071	kein GO
CA0380	IPF14109	2,5	0,01472	kein GO
CA5175	IPF6041	2,5	0,00529	Hydrolase
CA5932	UBI4	2,4	0,00144	Polyubiquitin
CA3472	IPF6305.exon2	2,3	0,00675	Funktion unbekannt
CA0232	IFA1	2,3	0,00238	kein GO
CA4516	IPF18207	2,2	0,00166	Funktion unbekannt
CA5735	IPF2878	2,1	0,03124	Funktion unbekannt
CA5550	SSU1	2,1	0,01661	Sulfittransporter
CA4919	TTR1	2,1	0,01929	Glutathionperoxidase, Elektronentransfer
CA2076	ERO1	2,1	0,00658	Elektronen-Carrier
CA0311	DAK2.3eoc	2,0	0,00817	Glyceronkinaseaktivität
CA3178	IPF19974	2,0	0,04952	zeta-DNA-Polymerase
CA0943	YHB1	2,0	0,01529	Oxidoreduktase
CA3336	IPF19983	2,0	0,01119	Aminopeptidase
CA0757	GAP7.3eoc	2,0	0,03761	generelle Aminosäurenpermease
CA1625	IPF6156	1,9	0,00448	kein GO
CA2831	IPF15706	1,9	0,04020	kein GO
CA4155	RNR21	1,9	0,00673	Ribonukleosid-di-Phosphat-Reduktase
CA0026	IPF16843	1,9	0,01482	Funktion unbekannt
CA5868	IPF351	1,9	0,02473	kein GO
CA4257	PRE6	1,9	0,00472	Endopeptidase, homolog zu 20S Proteasom-Untereinheit
CA0930	Zorro1a	1,9	0,00979	RNA-Bindung, Transferaseaktivität
CA1370	TCI1	1,8	0,00991	Funktion unbekannt
CA0436	RBL2	1,8	0,00939	Tubulin Bindendeprotein/ Tubulinspezif. Chaperon
CA5225	ACB1.exon2	1,8	0,01362	Acyl-CoA Bindeprotein, Transport langer Fettsäuren
CA2964	IPF13176.3	1,8	0,01361	Ornithin-Carbamoyltransferase
CA1216	EBP1	1,8	0,01351	NADPH Dehydrogenase
CA0984	IPF7400	1,8	0,04607	Oxidoreduktase
CA0150	CDC123	1,8	0,03030	Funktion unbekannt
CA6040	CPR6	1,8	0,01797	Chaperon, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
CA4105	SMT3	1,8	0,01911	Proteintagging, SUMO
CA0155	RPT6	1,8	0,01037	Endopeptidase, ATPase, homolog zu 26S Proteasom-UE

CA4890	PRE10	1,8	0,00927	Endopeptidase, homolog zu 20S Proteasom-Untereinheit
CA0025	IPF17945	1,7	0,01046	kein GO
CA4602	IPF6231	1,7	0,01556	Protein-Methionin-R-Oxid Reduktase
CA5179	MAK3	1,7	0,01087	N-Acetyltransferase
CA5029	IPF2997	1,7	0,04230	kein GO
CA5558	IPF1969	1,7	0,00391	Hormonaktivität
CA0179	DCP1	1,7	0,01810	mRNA-Bindung, Hydrolase
CA2855	GPM2	1,7	0,01871	Phosphoglyceratmutase
CA3590	ARE2	1,7	0,01409	Sterol-Acyl-Transferase
CA5143	IPF1020	1,7	0,00923	kein GO
CA5944	IPF3491	1,7	0,01118	Funktion unbekannt
CA0890	IPF11766	1,7	0,04096	kein GO
CA4478	IPF6461	1,7	0,02303	Funktion unbekannt
CA0986	IPF4814	1,7	0,01157	RNA-Bindung
CA5652	IPF19815	1,7	0,04328	kein GO
CA0081	IPF11379	1,7	0,00667	(S-Adenosylmethionin-) Methyltransferase
CA0234	IFA3	1,7	0,03111	snoRNA-Bindung (20S pre rRNA Processing)
CA2038	IPF17510	1,6	0,00594	Funktion unbekannt
CA0663	PUP2	1,6	0,01855	Endopeptidase, homolog zu 20S Proteasom-Untereinheit
CA4064	RPT1	1,6	0,03454	Endopeptidase, ATP-Bindung, ATPase, Hydrolase, homolog zu 26S Proteasom-UE
CA4150	RPT3	1,6	0,03383	Endopeptidase, ATP-Bindung, ATPase, Hydrolase, homolog zu 26S Proteasom-UE
CA4254	IPF18234.3	1,6	0,01350	kein GO
CA2486	IPF9851	1,6	0,04940	Funktion unbekannt
CA4895	IPF18161	1,6	0,02687	Funktion unbekannt
CA4898	IPF1461	1,6	0,02407	kein GO
CA2091	IPF3401	1,6	0,01731	Funktion unbekannt
CA0740	IPF3262.3	1,6	0,00686	Proteasomaktivator
CA0126	IPF4284	1,6	0,01620	Funktion unbekannt
CA4604	MBF1	1,6	0,04994	Multiproteinbindefaktor, GCN4-abhängige Transkriptionsaktivierung
CA1951	HEM14	1,6	0,04490	mitochondriale Protoporphyrinogen Oxidase
CA3216	IPF13038	1,6	0,04722	kein GO
CA1548	IPF8746	1,6	0,02551	kein GO
CA0692	PGM2	1,6	0,01670	Phosphoglucomutase
CA3333	CDC48	1,5	0,01351	ATPase, ATP-Bindung, Transporter, Rezeptor
CA5930	ECM29.exon2	1,5	0,04043	kein GO
CA2739	MUQ1	1,5	0,04148	Ethanolaminphosphat-Cytidyltransferase
CA2056	URA5	1,5	0,04233	Orotat-Phosphoribosyltransferase
CA5945	IPF3492	1,5	0,03593	Ribosomenbestandteil
CA0435	UGP1	1,5	0,01594	UTP-Glukose-1-Phosphat-Uridyltransferase
CA1490	IPF165	1,5	0,02649	kein GO
CA3346	IPF13356	1,5	0,02701	katalytische Aktivität
CA5434	IPF199	1,5	0,02664	F-Actin Capping Protein-alpha-Untereinheit
CA1422	IPF14248	1,5	0,04632	tRNA-Methylierung
CA2493	IPF7227	1,5	0,04541	Oxidoreduktase, Metallopeptidase, Zinkbindung
CA3880	CAF16	1,5	0,04053	ATP-Bindung, ABC-Transporteraktivität
CA1401	TOM22	1,5	0,04431	Proteintransport an Mito-Außenmembran
CA2466	IPF8725	1,5	0,02029	kein GO
CA3059	TRR1	1,5	0,04155	Oxidoreduktase
CA3198	IPF3432	1,4	0,04207	kein GO

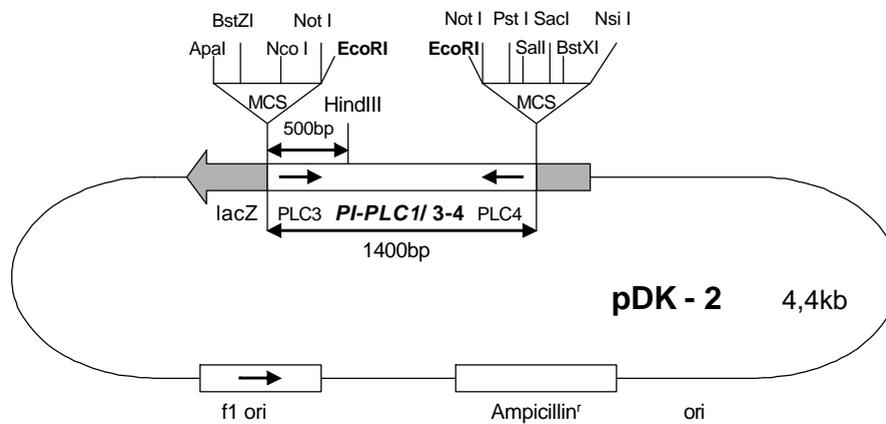
CA4852	SCS7	1,4	0,04001	Oxidoreduktase, katalytische Aktivität
CA0046	IPF14850	1,4	0,03286	kein GO
CA5238	MET3	0,5	0,04155	ATP-Sulfurylase
CA2745	HIR1	0,5	0,04690	Transkriptions-Corepressor

9.3 Plasmidkarten



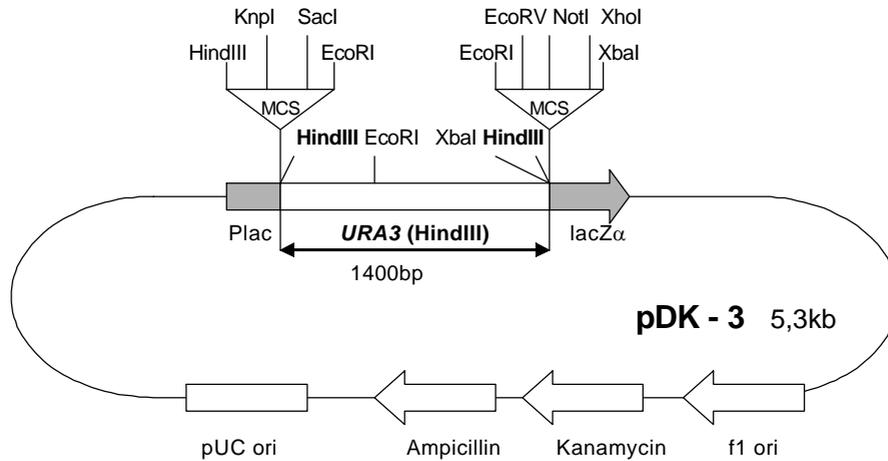
Ausführlicher Plasmidname: pCR2.1-TOPO- PLC1/ 3-4

Beschreibung: Mit den Primern PLC3 (fwd.) und PLC4 (rev.) wurde ein Teil der *PI-PLC1* in der heterozygoten *PLC1*-Mutante M222 amplifiziert. Von den beiden PCR-Produkten von zum einen 1,6kb des disruptierten Allels und von 1,4kb des wt-Allels zum anderen wurde letzteres nach Elution aus dem Gel in das Plasmid pCR2.1-TOPO ligiert. Das entstandene Plasmid ist der erste Schritt auf dem Weg zu einer allelspezifischen Mutante, sofern allelische Unterschiede bestehen.



Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-PLC1/ 3-4

Beschreibung: Das *PLC1/ 3-4* Fragment wurde aus dem Plasmid pDK-1 mit *EcoRI* heraus-geschnitten und in den *EcoRI* geöffneten, dephosphorylierten Vektor pGEM-T Easy ligiert.



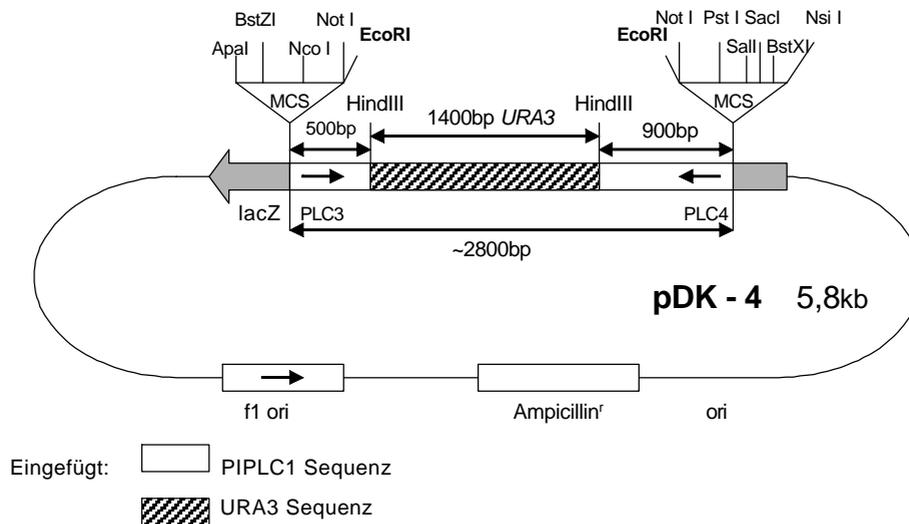
Ausführlicher Plasmidname: pCR2.1-TOPO-URA (Hind III)

Beschreibung: Mit den Primern URA-D1 und URA-D2 wurde das *URA3*-Gen aus dem Plasmid pMB7 amplifiziert und gleichzeitig an beiden Enden des PCR-Fragmentes eine Hind III-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR2.1-TOPO ligiert.

Kontrollrestriktion:

EcoRI	~550bp + ~840bp
HindIII	1,4 kb
XbaI	open circle

PI-PLC1-
Disruptionskassette:



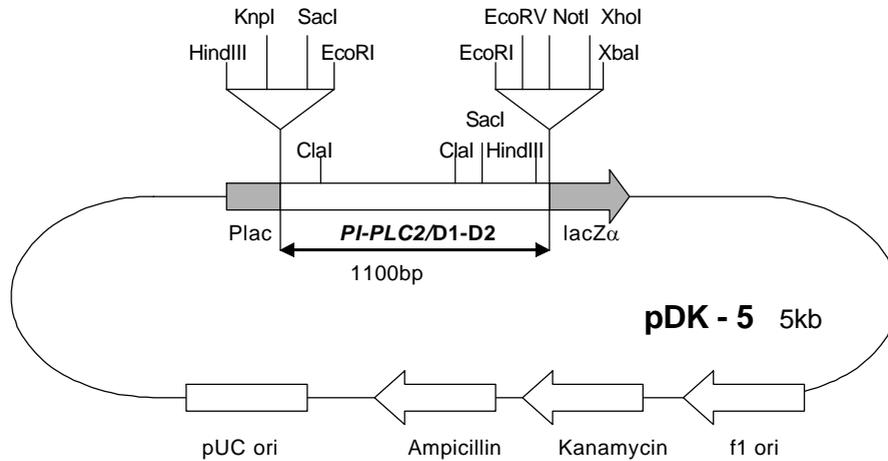
Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-PLC1 (3-4)-URA3

Beschreibung: Das Plasmid pDK-2 wurde mit *HindIII* innerhalb der *PI-PLC1*-Sequenz geöffnet und das mit *HindIII* aus pDK-3 herausgeschnittene *URA3*-Gen hineinligiert. Die Schnittstellen in der *URA3* Sequenz sind nicht eingezeichnet, in der MCS ebenfalls nur teilweise.

Kontrollrestriktion: *NotI* --> 2,8kb Gesamtinsert + 3kb Vektor

XbaI--> linearisiertes Konstrukt, da nur 1x am Ende des *URA3* Gens

EcoRI--> Unterscheidung der Lage der Inserts zueinander: fwd
PLC1+fwd *URA3* = 1050bp + 1580bp vorh. *HindIII*--> *URA3* Gen mit ~1,4kb fällt heraus

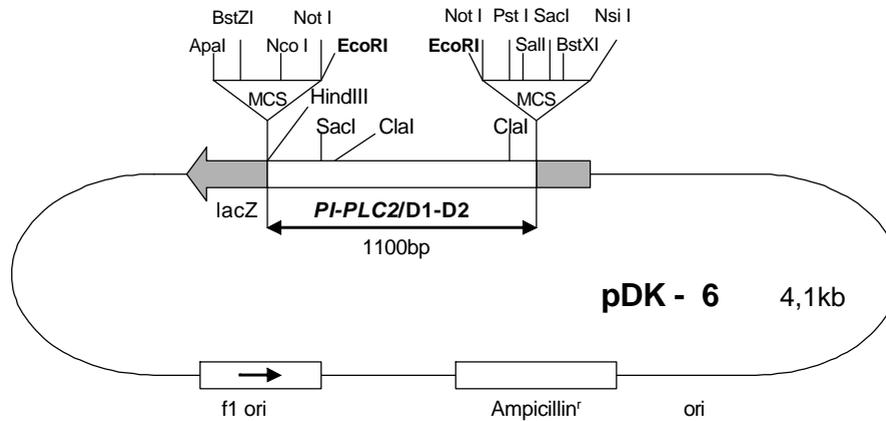


Ausführlicher Plasmidname: pCR2.1-TOPO-PLC2 / D1-D2

Beschreibung: Mit den Primern piplc2-D1 (fwd.) und piplc2-D2 (rev.) wurde aus genomischer DNA von SC5314 fast das ganze *PI-PLC2* Gen amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde in das Plasmid pCR2.1-TOPO ligiert.

Kontrollrestriktion:

EcoRI	1,1kb Fragment
Clal	670bp
SacI	~800bp
HindIII	1,1kb (Fragment zeigt Orientierung des Inserts im Plasmid)

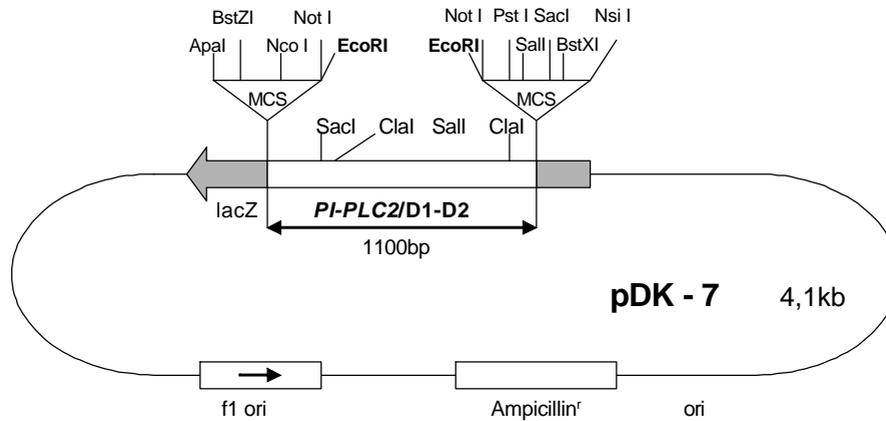


Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-PLC2/ D1-D2

Beschreibung: Mit den Primern piplc2-D1 (fwd.) und piplc2-D2 (rev.) wurde aus genomischer DNA von SC5314 das 1100bp Fragment des *PI-PLC2* Gens amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde als erster Schritt zur *PI-PLC2*-Disruptionskassette in das Plasmid pGEM-T Easy ligiert.

Kontrollrestriktion:

EcoRI	1,1 kb
HindIII	geöffnetes Plasmid
Clal	670bp
SacI	~800bp



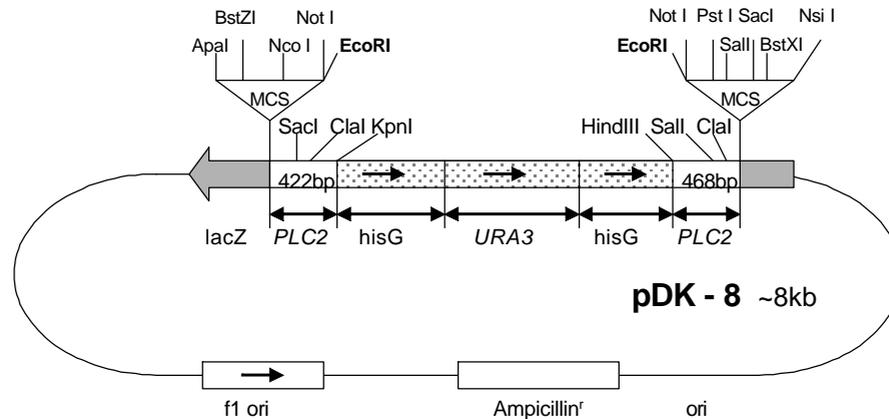
Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy- PLC2/ D1-D2-Hind III

Beschreibung: Im Plasmid pDK-6 wurde die Hind III Restriktionsstelle am Ende des Inserts deletiert. (Plasmidöffnung mit Hind III, Mungbohnen-Nuklease-Behandlung, Religation)

Kontrollrestriktion: EcoRI 1,1 kb
 ClaI 670bp
 SacI ~800bp
 SacI + HindIII ~800bp,

statt ~800bp +300bp bei pDK-6

PI-PLC2-
Disruptionskassette:



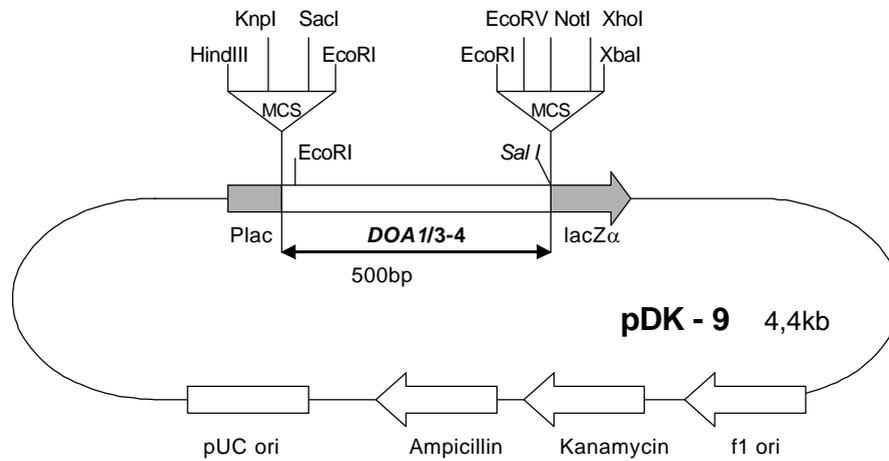
Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-PLC2 inv-hisG-URA3-hisG

Beschreibung: Das Plasmid pDK-7 wurde mit den Primern piplc-inv1 (fwd.) und piplc-inv2 (rev.) mittels inverser PCR amplifiziert, ausgenommen 135bp innerhalb des *PLC2*-Inserts. Die Primer fügten der Reihenfolge entsprechend die Schnittstellen KpnI und Hind III an die Enden des PCR-Produktes an. Nach der PCR wurde das Produkt mit diesen Enzymen verdaut und das hisG-*URA3*-hisG-Fragment (mit ebendiesen Enzymen aus pMB7 herausgeschnitten) unter Ringschluss hineinligiert.

Kontrollrestriktion: NotI → 3kb + 5kb (letzteres entspricht der Disruptionskassette)

SacI → 3230bp + 4770bp

EcoRI → 2849bp + 2015bp + 3136bp

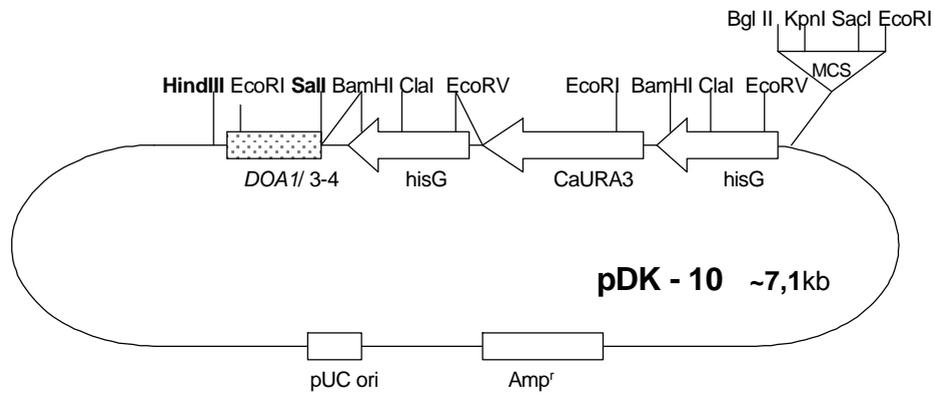


Ausführlicher Plasmidname: pCR2.1-TOPO-DOA1/3-4

Erläuterungen: Mit den Primern DOA1-3 (fwd.) und DOA1-4 (rev.) wurde aus gen. DNA von SC5314 ein Fragment amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Dabei wurde mit dem Primer 3 die Sal I Schnittstelle für weitere Klonierungen eingefügt.

Kontrollrestriktion: HindIII / Sal I --> 500bp

EcoRI --> 500bp

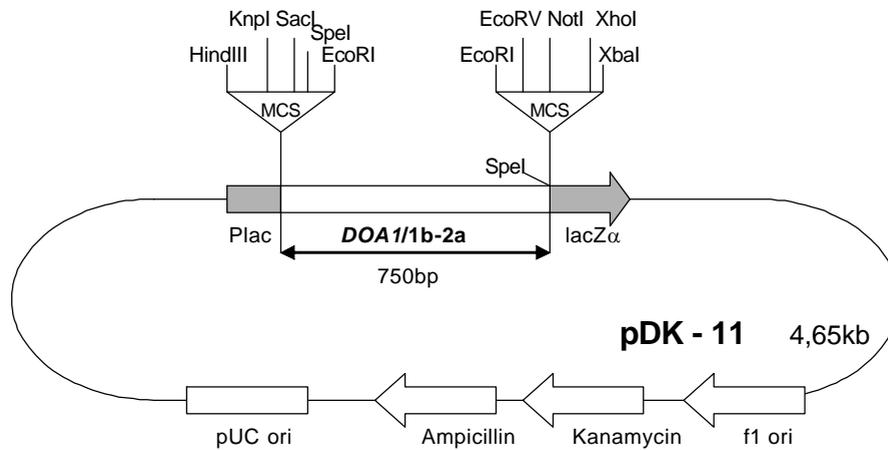


Ausführlicher Plasmidname: pMB7-DOA1/3-4

Beschreibung: Der Vektor pMB7 wurde mit HindIII und Sal I geöffnet und in den so geöffneten Vektor das mit den gleichen Enzymen aus pDK-9 herausgeschnittene *DOA1*-Fragment (500bp) ligiert.

Kontrollrestriktion: HindIII / Sal I → 6,6kb (Plasmid) + 500bp (Insert)

EcoRI → 1,6kb + 2,8kb + 2,6kb

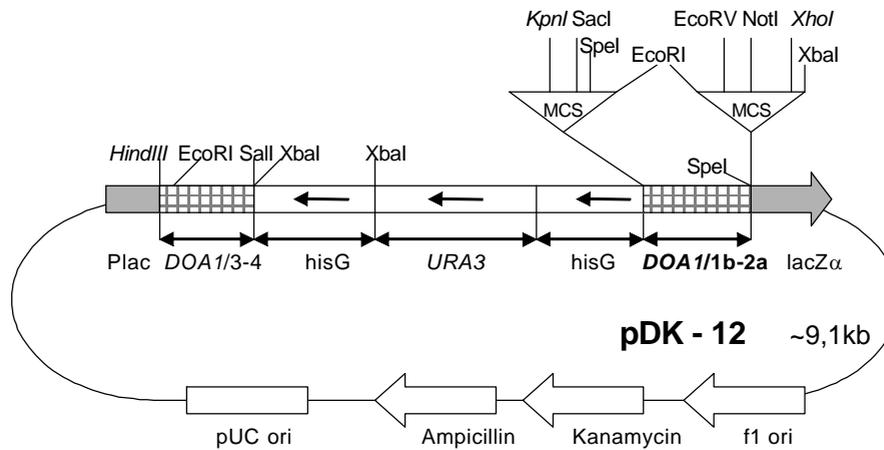


Ausführlicher Plasmidname: pCR2.1-TOPO-DOA1/1b-2a

Erläuterungen: Mit den Primern DOA1-1b (fwd.) und DOA1-2a (rev.) wurde aus gen. DNA von SC5314 ein Fragment amplifiziert und in pCR2.1-TOPO kloniert. Die SpeI Schnittstelle in Primer DOA1-1b ist in der genomischen Sequenz vorhanden.

Kontrollrestriktion: EcoRI --> 750bp

SpeI --> 750bp

DOA1-Disruptionskassette:**Ausführlicher Plasmidname:**

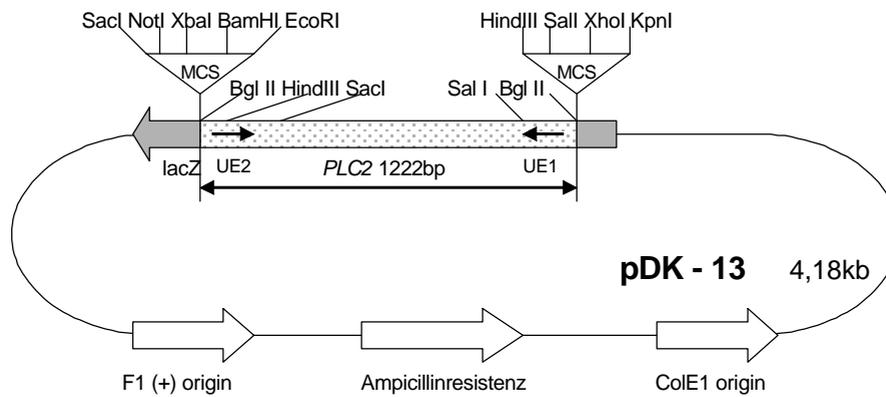
pCR2.1-TOPO-DOA1/1b-2a-hisG-URA3-hisG-DOA1/3-4

Beschreibung: Aus pDK-10 wurde mit den Enzymen HindIII und KpnI ein Fragment (DOA1/3-4-hisG-URA3-hisG) ausgeschnitten und in den ebenso geöffneten Vektor pDK11 ligiert.

Kontrollrestriktion: HindIII / XhoI → Disruptionskassette mit 5,22kb + Plasmidrest 3,9kb

XbaI → 1,4kb + 3,2kb + 4,4kb

EcoRI → 750bp + 1,6kb + 2,8kb + 3,9kb



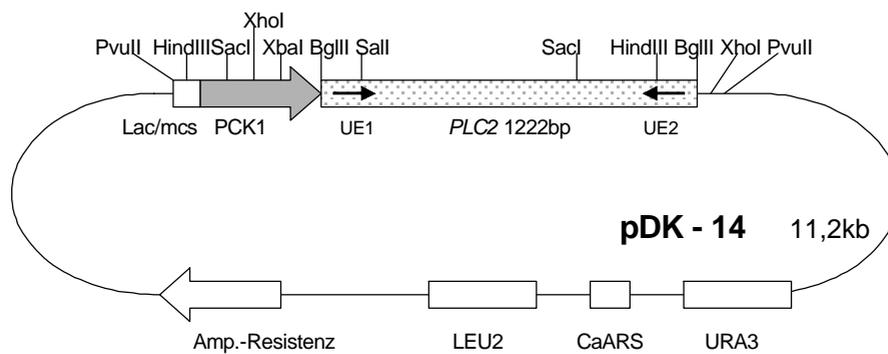
Ausführlicher Plasmidname: pBS II-SK (+)-PLC2-lang (Pfu)

Beschreibung: Mit den Primern PLC2-UE1 und PLC2-UE2 wurde das *PIPLC2*-Gen mit der Pfu-Polymerase amplifiziert und an beiden Enden des Fragments eine Bgl II-Schnittstelle durch die Primer eingefügt. Das PCR-Produkt wurde in den mit EcoRV geöffneten Vektor pBS II –SK (+) ligiert. PLC2-UE1 ist komplementär zum ATG in der in PubMed veröffentlichten Sequenz.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 1222bp Insert + 2958bp Plasmid

HindIII → 1011bp (orientierungsabhängig)

SacI → 467bp (orientierungsabhängig)

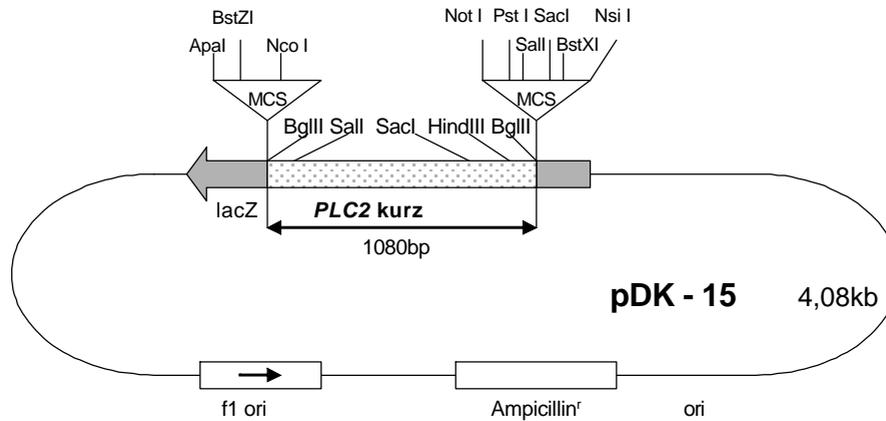


Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-PLC2-lang (Pfu)

Beschreibung: Aus dem Plasmid pDK-13 wurde über die BglII-Schnittstellen das Gen *PIPLC2* herausgeschnitten und in das BglII geöffnete Plasmid ligiert.

Kontrollrestriktion: BglII → 1222bp (Fragment) + 9980bp (Plasmid)

HindIII → 2,4kb (orientierungsabhängig)



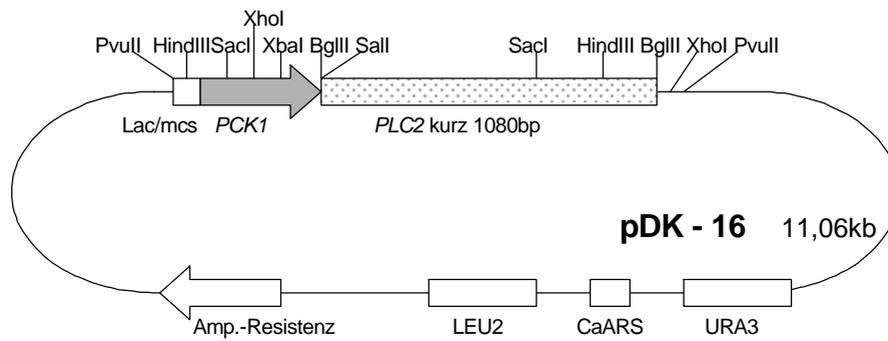
Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T-PLC2-kurz

Beschreibung: Mit den Primern PLC3-UE1 und PLC2-UE2, die beide die Schnittstelle Bgl II ans Ende einfügen, wurde das kurze Stück des *PIPLC2*-Gens, mit dem zweiten ATG (laut Andaluz *et al.* 2001) beginnend, amplifiziert und in das Plasmid pGEM-T ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 1080bp (Insert) + 3kb (Plasmid)

Sal I → 1062bp (orientierungsabhängig) + Rest

SacI → ~500bp (orientierungsabhängig) + Rest



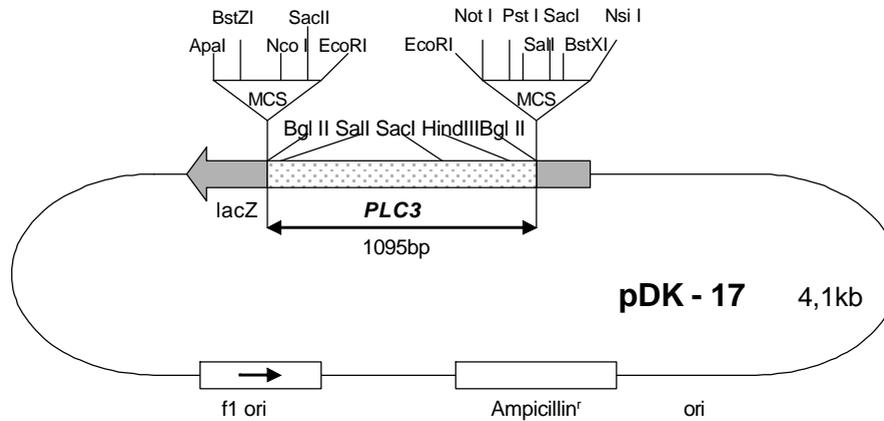
Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-PLC2-kurz

Beschreibung: aus dem Plasmid pDK-15 wurde die kurze Version des *PIPLC2*-Gens mittels *BglII* herausgeschnitten und in das mit *BglII* geöffnete Plasmid pBI-1 hinter den PCK-Promotor ligiert.

Kontrollrestriktion: *BglII* → 1080bp (Insert) + 9980bp (Plasmid)

HindIII → ~2,2kb (orientierungsabhängig) + Rest

XhoI → 1,8kb + Plasmidrest



Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy – PLC3

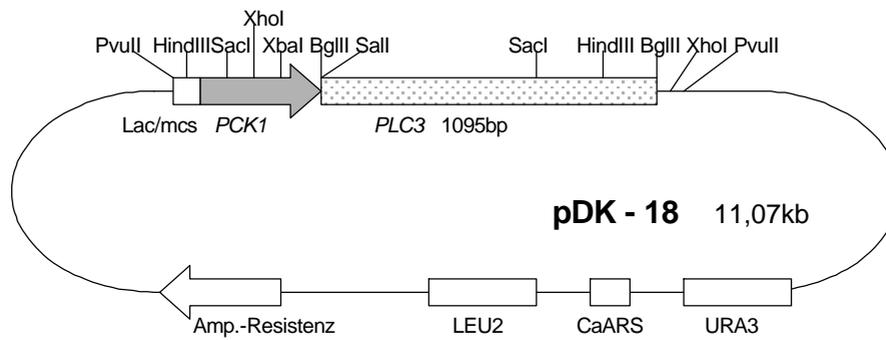
Beschreibung: Mit den Primern PLC3-UE1 und PLC3-UE2 wurde das mit *PLC3* bezeichnete Gen aus genomischer DNA von SC5314 amplifiziert und an den Enden des PCR-Produktes die Schnittstellen für Bgl II eingefügt. Das PCR-Produkt wurde dann in das Plasmid pGEM-T Easy ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 1095bp + 3015bp

HindIII → linearisiertes Plasmid

SacI → 230bp

Sal I → 1100bp

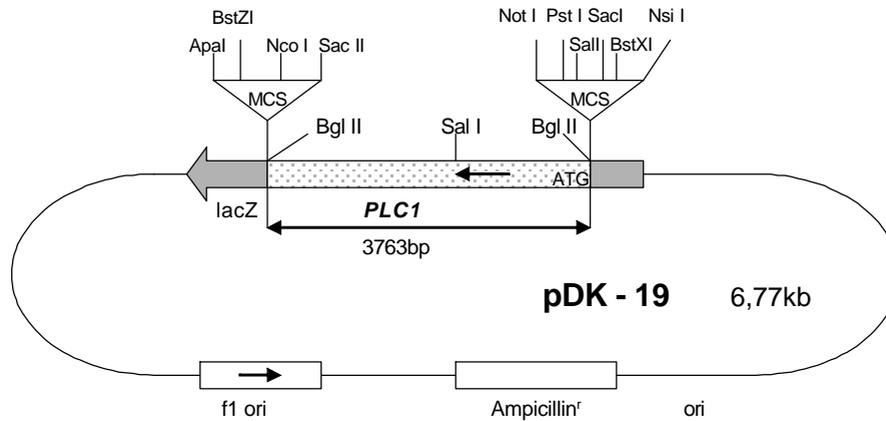


Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-PLC3

Beschreibung: Das *PLC3*-Gen wurde mit Bgl II aus dem Plasmid pDK-17 herausgeschnitten und in das mit Bgl II geöffnete Plasmid pBI-1 ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 1095bp (Insert) + 9980bp (Plasmid)

HindIII → ~2,2kb (orientierungsabhängig) + Rest

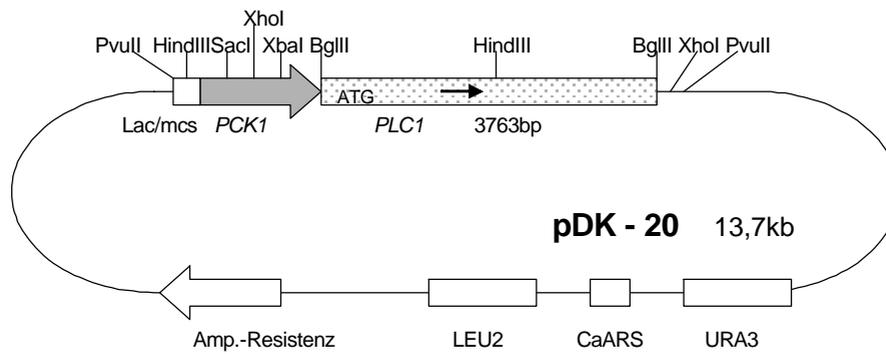


Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T- PLC1

Beschreibung: Mit den Primern PLC1-UE1 und PLC1-UE2 wurde aus genomischer DNA von SC5314 das *PLC1*-Gen amplifiziert und Bgl II-Schnittstellen an den Enden des PCR-Produktes eingefügt. Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid pGEM-T ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 3763bp

Sal I → 1760bp orientierungsabhängig

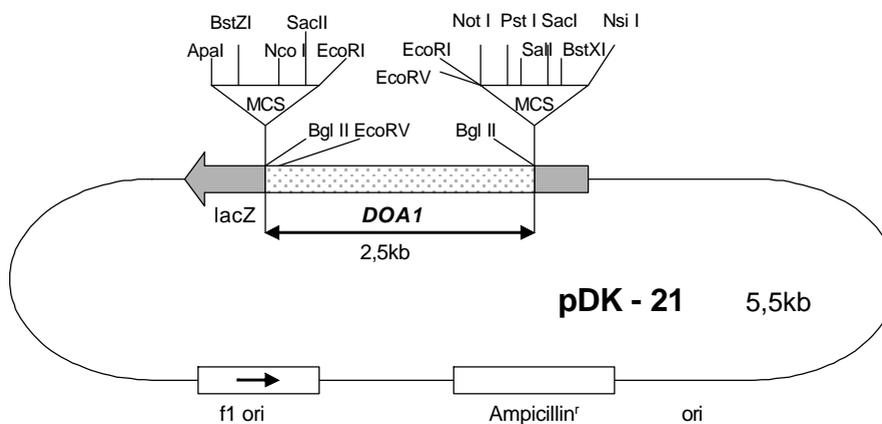


Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-PLC1

Beschreibung: Das *PLC1*-Gen wurde mit Bgl II aus dem Plasmid pDK19 herausgeschnitten und in das mit Bgl II geöffnete Plasmid pBI-1 ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 3763bp + 9980bp

HindIII → ~3,6kb + Rest

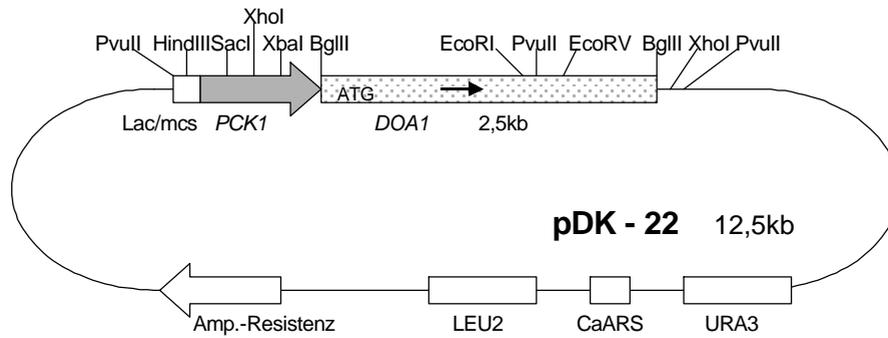


Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-DOA1

Beschreibung: Mit den Primern DOA1-UE1 und DOA1-UE2 wurde das ganze Gen *DOA1* inkl. ca. 200bp nach dem STOP-Codon mit dem Long Expand Kit (Roche) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T Easy ligiert. Die Primer fügten an den Insertenden die Bgl II - Schnittstellen ein.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 2500bp Insert + 3015bp Plasmid

EcoRV → 2260bp + ~3240bp



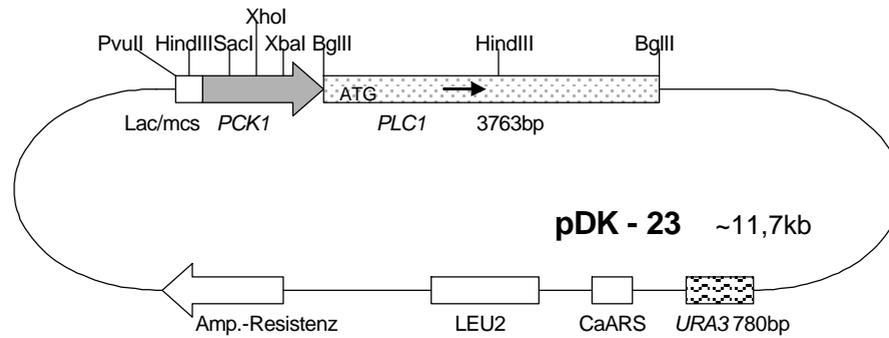
Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-DOA1

Beschreibung: Aus dem Plasmid pDK - 21 wurde mit dem Enzym Bgl II das Insert (*DOA1*- Gen) herausgeschnitten und in den mit dem gleichen Enzym geöffneten Vektor pBI-1 ligiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 2500bp Insert + 10kp Plasmid

EcoRV → ~5,5kb + ~7kb

PvuII → ~3,5kb + 9kb



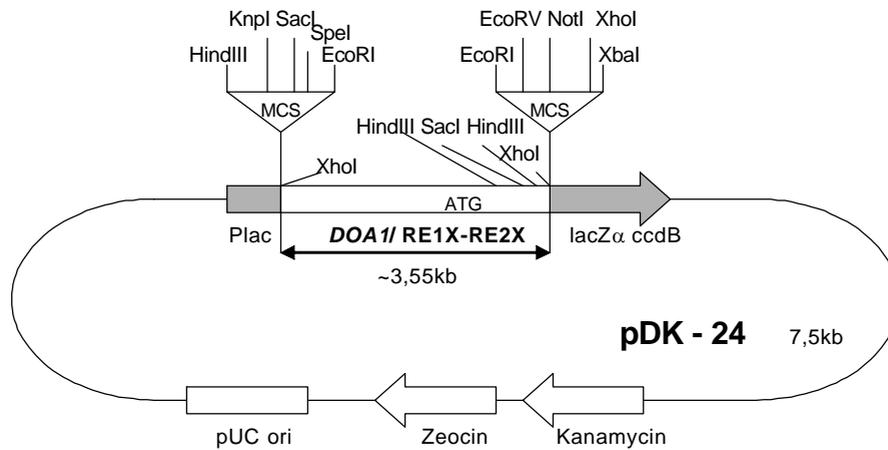
Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-PLC1-URA3kurz

Beschreibung: Das Plasmid wurde um ca. 2kb verkleinert, einschließlich 580bp vom *URA3* - Gen, durch eine Long Expand Kit - PCR mit den Primern PLC1-UE2 und URA 1b fwd. und anschließender Religation.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 3763bp + 9980bp

EcoRI + XbaI → linearisiertes Plasmid

(statt ~4,5kb + ~9,2kb bei pDK - 20)



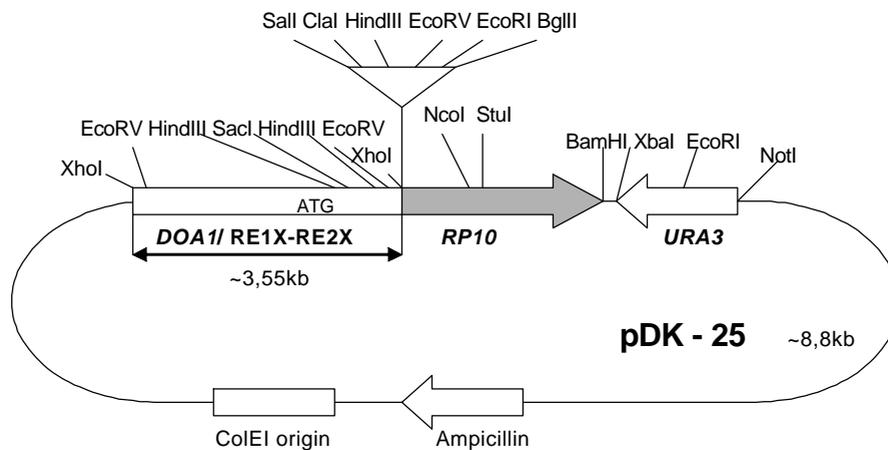
Ausführlicher Plasmidname: pCR-Blunt II-TOPO-DOA1-RE-XhoI

Beschreibung: Mit den Primern DOA1-RE1X und DOA1-RE2X wurde aus genomischer DNA von SC5314 das Gen *DOA1* mit zusätzlichen 1034bp vor dem ATG und 210bp nach dem STOP-Codon mittels Pfu-Polymerase amplifiziert und in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO ligiert. Die Primer fügten dabei an den Enden des PCR-Produktes jeweils eine XhoI-Schnittstelle ein.

Kontrollrestriktion: XhoI → 3,55kb + 3,51kb

Hind III → 2,8kb + ~400bp + 3,9kb

SacI → 3,05kb + ~4kb



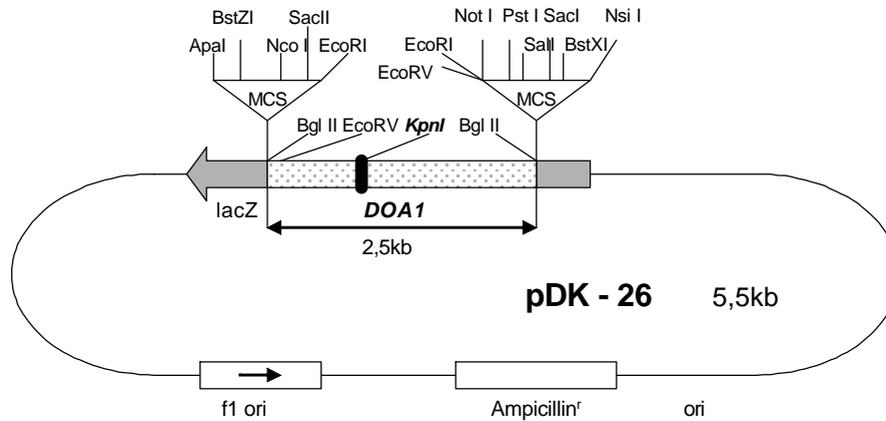
Ausführlicher Plasmidname: pCIP10-DOA1-RE-XhoI

Beschreibung: Aus dem Plasmid pDK - 24 wurde mit einem XhoI - SphI - Verdau (bessere Unterscheidung der bei XhoI-Verdau fast gleich großen Banden) das Insert isoliert und in den mit XhoI geöffneten Vektor ligiert. Für die anschließende Transformation des Plasmides pDK - 25 in *Candida albicans* können die Schnittstellen NcoI und / oder StuI verwendet werden.

Kontrollrestriktion: XhoI → 5,2kb + 3,55kb

HindIII → 2 Fragmente mit ~400bp + 8kb

EcoRV → 3,1kb + ~5,7kb



Ausführlicher Plasmidname: pGEM-T Easy-DOA1-KVL

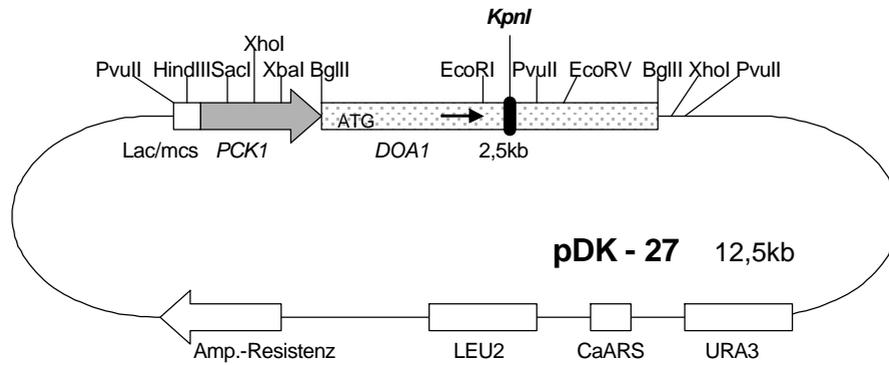
Beschreibung: Unter Verwendung des Plasmides pDK21 als Template und den Primern DOA1-k1a fwd. und rev. wurde das Plasmid aus dem DOA1- Gen heraus mittels inverser PCR (Long Expand Kit) amplifiziert und dabei 75bp aus dem Gen deletiert (KVL-site im Protein). Das lineare PCR-Produkt trug an den Enden je eine von den Primern eingefügte KpnI-Restriktionsschnittstelle und wurde über diese nach einem KpnI- Verdau zum Plasmid pDK - 26 religiert.

Kontrollrestriktion: Bgl II → 2,5kb Insert + 3015bp Plasmid

EcoRV → 2260bp + ~3240bp

KpnI → 5,5kb (linearisiertes Plasmid)

KpnI + Bgl II → ~3kb + ~1,9kb + ~620bp



Ausführlicher Plasmidname: pBI-1-DOA1-KVL

Beschreibung: Aus dem Plasmid pDK - 26 wurde mit dem Enzym Bgl II das Insert herausgeschnitten und in den mit dem gleichen Enzym geöffneten Vektor pBI-1 ligiert.

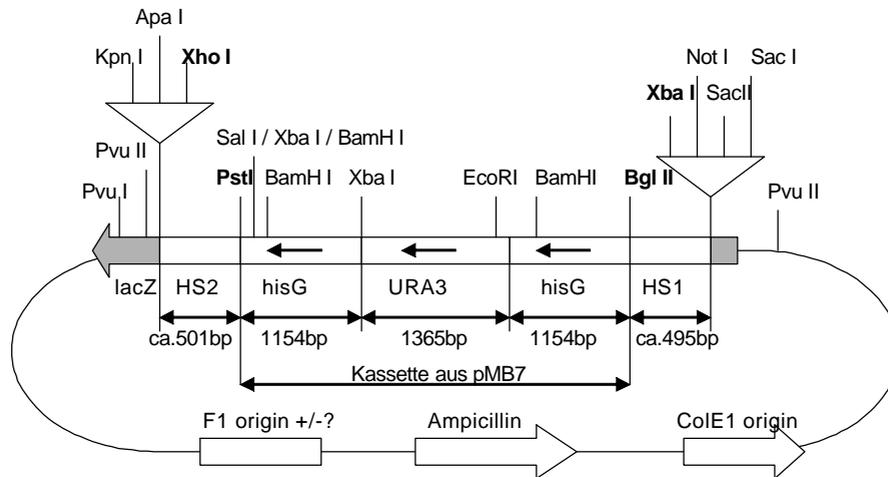
Kontrollrestriktion: Bgl II → 2500bp Insert + 10kp Plasmid

EcoRV → ~5,5kb + ~7kb

PvuII → ~3,5kb + 9kb

KpnI + Bgl II → 1,9kb + 620bp

+ Doppelbande bei ca. 5kb (Plasmidrest)

pDS952

Grundgerüst des Vektors ist pBluescript (+/- unbekannt), in dessen MCS über *XbaI*-*XhoI* ein Fragment des Contigs 6-2335 eingefügt wurde, wohinein über *PstI* - *BglII* die Disruptionskassette aus pMB7 kloniert wurde. HS1 ist die Sequenz von bp 9821 des Contigs bis etwa Startcodon der *PI-PLC1* und HS2 die Sequenz von etwa dem Stoppcodon der *PI-PLC1* bis zum bp 14120 des Contigs.

HS = homologe Sequenz