

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Molekulare Charakterisierung der Carboanhydrase Nce103
im Kontext des CO₂ induzierten Polymorphismus
in *Candida albicans*

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius – Maximilians – Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Torsten Klengel

aus München

Würzburg, Februar 2008

Referent: Professor Dr. med. Matthias Frosch
Korreferent: Professor Dr. rer. nat. Joachim Morschhäuser
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 2009

Der Promovend ist Arzt.



Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Invasive Pilzinfektionen	1
1.2. <i>Candida</i> und Candidiasis	2
1.3. Therapie von <i>Candida</i> Infektionen	5
1.4. Morphogenese bei <i>Candida albicans</i>	7
1.4.1. <i>RASI/CPHI</i> Kaskade	10
1.4.2. <i>RIM20/RIM101</i> Kaskade	12
1.4.3. Matrix/ <i>CZFI</i> Kaskade	13
1.4.4. cAMP/ <i>PKA</i> Kaskade	13
1.5. <i>Cryptococcus neoformans</i> als Ursache invasiver Pilzinfektionen	15
1.6. CO ₂ ist ein potenter Induktor hyphalen Wachstums in <i>Candida albicans</i>	16
1.7. Carboanhydrasen	18
1.8. Eine Adenylylase als CO ₂ Sensor ?	19
1.9. Hypothese und Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Geräte	22
2.2. EDV	23
2.3. Internetressourcen	24
2.4. Bezugsfirmen	24
2.5. Verbrauchsmaterialien	24
2.6. Kits	25
2.7. Enzyme	25
2.8. Kulturbedingungen	26
2.9. Nährmedien	26
2.10. Lösungen und Puffer	27
2.11. Stämme, Plasmide und Vektoren	32
2.11.1. <i>Candida albicans</i> Stämme	32
2.11.2. <i>Cryptococcus neoformans</i> Stämme	36

2.11.3. <i>Escherichia coli</i> Stämme	36
2.11.4. Kommerziell erhältliche Plasmide	36
2.11.5. Weitere verwendete Plasmide	37
2.12. Phenolextraktion	40
2.13. Fällung und Präzipitation von DNA und RNA	41
2.14. Darstellung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese	
in Agarosegelen	41
2.14.1. DNA – Gelelektrophorese	41
2.14.2. RNA – Gelelektrophorese	42
2.15. Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	
und enzymatischen Reaktionen	43
2.16. Gewinnung genomischer DNA aus <i>Candida albicans</i>	43
2.16.1. Mechanische Aufspaltung der Hefezellwand mit	
Glaskugeln	43
2.16.2. Enzymatische Aufspaltung der Hefezellwand mit Lyticase	44
2.17. Gewinnung von Gesamt – RNA aus <i>Candida albicans</i>	45
2.18. Gewinnung genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.19. Gewinnung von Plasmid – DNA aus <i>E. coli</i>	46
2.20. Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA	46
2.21. Restriktionsverdau	47
2.22. Southern-Blot	48
2.23. Northern-Blot	49
2.24. Radioaktive Hybridisierungen	49
2.25. Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	50
2.26. Ligation von DNA Fragmenten	52
2.27. Dephosphorylierung von DNA Enden	53
2.28. Herstellung stumpfer Fragmentenden (<i>blunten</i>)	53
2.29. Präparation von <i>E. coli</i> Zelllysaten mittels Ultraschall zur	
Gesamtproteingewinnung	53
2.30. Aufreinigung von Proteinen mittels GST und Glutathion Sepharose	54
2.31. SDS-PAGE und Western-Blot	54
2.32. Stopped – Flow Enzymkinetik	56

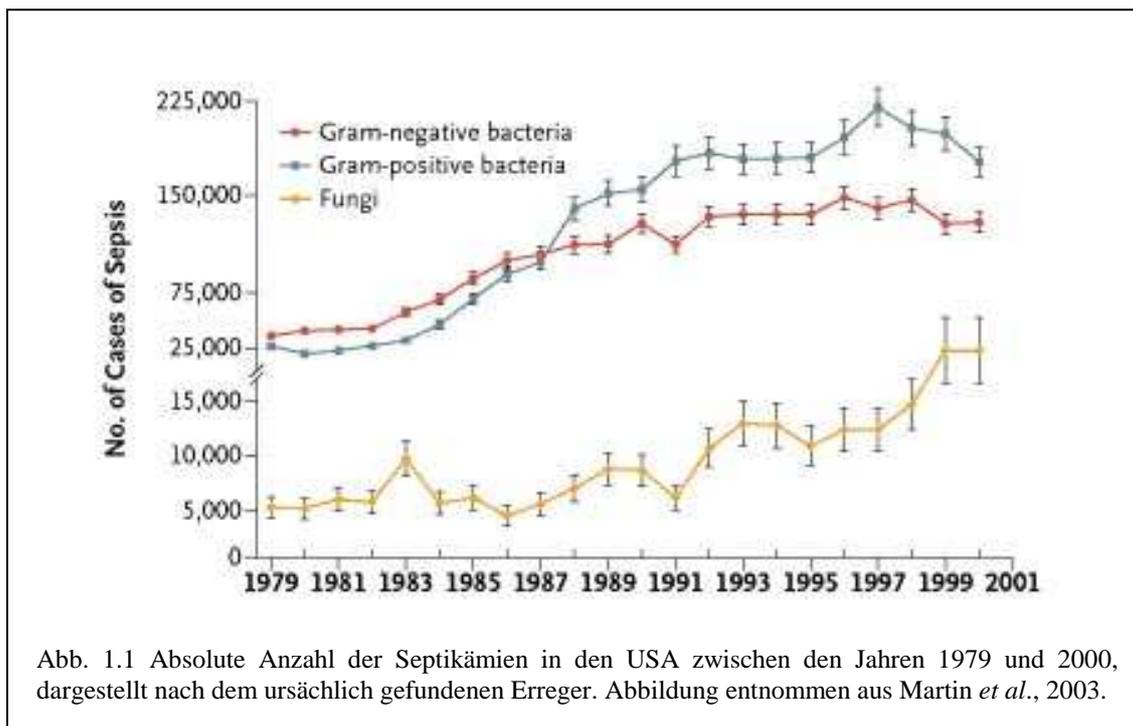
2.33. Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen	58
2.34. Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	58
2.35. Klonierung von PCR Fragmenten mittels Invitrogen TOPO TA Cloning	58
2.36. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation und Hitzeschock	59
2.37. Transformation von <i>Candida albicans</i> mittels Lithiumacetat und Elektroporation	60
3. Ergebnisse	62
<hr/>	
3.1. Identifizierung einer potentiellen Carboanhydrase in <i>Candida albicans</i>	62
3.2. Klonierung von <i>Candida albicans</i> <i>NCE103</i>	62
3.3. Expression und Aufreinigung von CaNCE103p als GST – Fusionsprotein in <i>E. coli</i>	65
3.4. <i>CaNCE103</i> kodiert eine funktionsfähige Carboanhydrase	67
3.5. Disruption von <i>NCE103</i> in <i>C. albicans</i>	69
3.5.1. Herstellung PCR – basierter Disruptionskassetten und Disruption von <i>NCE103</i> in <i>C. albicans</i> BWP17	69
3.5.2. Herstellung des <i>NCE103</i> Ura – Blasters und Disruption von <i>NCE103</i> in <i>C. albicans</i> CAI4	74
3.6. Expression von <i>CaNCE103</i> unter dem konstitutiv aktiven Promotor <i>EF1α</i>	77
3.7. Northernblot Analysen	78
3.8. Phänotypische Charakterisierung der <i>C. albicans</i> <i>nce103Δ/nce103Δ</i> Disruptionsmutante	80
3.9. Carboanhydrasen von <i>E. coli</i> und Mensch können <i>CaNCE103</i> nicht ersetzen	86
3.10. NCE – GFP Fusion	87
3.11. Aquaporine als potentielle CO ₂ Kanäle in <i>Candida albicans</i>	89

3.12. Klonierung und Expression der katalytischen Region von <i>Cryptococcus neoformans</i> Adenylylcyclusase <i>CAC1</i> in <i>C. albicans</i> CR276	89
3.13. Expression und Aufreinigung von CnCac1p als GST – Fusionsprotein in <i>E. coli</i>	91
4. Diskussion	93
4.1. CO ₂ als Umweltsignal	93
4.2. Identifikation einer Carboanhydrase in <i>Candida albicans</i>	95
4.3. <i>CaNCE103</i> , eine funktionsfähige Carboanhydrase	97
4.4. Funktionsanalyse von <i>CaNCE103</i> – wozu Carboanhydrasen ?	98
4.5. Expressionsanalysen – <i>CaNCE103</i> ein Virulenzfaktor	101
4.6. <i>Cryptococcus neoformans</i> Adenylylcyclusase detektiert CO ₂ in <i>C. albicans</i> <i>cdc35Δ/cdc35Δ</i>	104
4.7. CO ₂ / HCO ₃ ⁻ aktiviert Adenylylcyclusasen	105
4.8. Aquaporine greifen nicht in den CO ₂ Fluss von <i>C. albicans</i> ein	106
5. Zusammenfassung	108
Literaturverzeichnis	110
Abbildungsverzeichnis	130
Abkürzungsverzeichnis	132
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Invasive Pilzinfektionen

Die Inzidenz invasiver Pilzinfektionen, insbesondere in der Population schwerkranker Patienten, ist während der letzten Jahrzehnte weltweit kontinuierlich angestiegen (Martin *et al.*, 2003; Clark und Hajjeh, 2002; Fridkin und Jarvis, 1996; vgl. auch Abb. 1.1). Unter den dabei isolierten Erregern sind *Candida* spp., *Aspergillus* spp. und *Cryptococcus* spp. in der Mehrzahl der Fälle ursächlich zu finden, wobei gleichzeitig eine Zunahme seltenerer Klassen wie Zygomyceten verzeichnet und eine Verschiebung der Häufigkeiten beobachtet wurde (Pfaller und Diekema, 2007; Warnock, 2007; Enoch *et al.*, 2006; Nucci und Marr, 2005; Bille *et al.*, 2005; Fridkin, 2005; Clark und Hajjeh, 2002).



Der Zuwachs an Patienten, welche sich Transplantationen (Organtransplantationen und Stammzelltransplantationen), Krebstherapien und immunsuppressiven Therapien unterziehen aber auch die wachsende Zahl frühgeborener Kinder und die steigende Anzahl der AIDS Patienten werden als Ursache dieser Entwicklung angesehen. Weitere Risikofaktoren sind u.a. die Dialysebehandlung, parenterale Ernährung, die Anlage

zentralvenöser Katheter, der Einsatz von Breitbandantibiotika und Sterioden, großflächige Verbrennungen, Diabetes mellitus, die Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung und umfassende chirurgische Interventionen (Eggimann *et al.*, 2003; Clark und Hajjeh, 2002). Es sind insbesondere die nosokomialen Pilzinfektionen bei Risikopatienten, die ein zunehmendes medizinisches und auch wirtschaftliches Problem darstellen. Neue, invasive und mit einer Immunsuppression einhergehende Therapiestrategien tragen zu einer Vergrößerung der Anzahl potentiell gefährdeter Patienten bei. Bei dem oben genannten Patientenkollektiv verlaufen diese Infektionen schnell progressiv, besonders schwer und entziehen sich häufig einer korrekten Diagnose und Behandlung. Prädominant findet sich bei den lebensbedrohlichen invasiven Pilzinfektionen nach wie vor *Candida albicans* mit einer Häufigkeit von ca. 50% der Fälle als Ursache (Pfaller und Diekema, 2007; Perloth *et al.*, 2007; Tortorano *et al.*, 2006).

1.2. *Candida* und Candidiasis

Bereits Hippokrates und Galen beschrieben das Krankheitsbild des Soor, wobei das auslösende Agens, ein polymorpher Pilz, erst 1846 durch Berg in korrekten kausalen Zusammenhang zur Erkrankung gebracht wurde. Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde der Name *Candida albicans* (abgeleitet von lat. *toga candida*, der weißen Robe der Kandidaten für den römischen Senat) von Berkhout für den im Tiermodell pathogenen Pilz vorgeschlagen und 1954 als *nomen conservandum* bestätigt (Calderone, 2002). In der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts konnten durch Fortschritte in der Taxonomie, Biochemie, Mikroskopie und vor allem der Molekularbiologie entscheidende Schritte zur weiteren Erforschung dieses Keimes gemacht werden, was zur Identifizierung von zur Zeit über 200 verschiedenen Spezies der Gattung *Candida* führte (Eggimann *et al.*, 2003). Die Gattung *Candida* gehört phylogenetisch zur Familie der *Saccharomycetaceae*, die wiederum zur Ordnung der *Saccharomycetales* und zur Klasse *Ascomycetes* (Sprosshefen) der Abteilung *Ascomycota* (Schlauchpilze) gezählt werden (Guarro *et al.*, 1999).

Candida als ein Teil der mikrobiellen Flora von ca. 71% der gesunden Bevölkerung besiedelt Haut, Gastrointestinal- , Genitourinal- und auch den

Respirationstrakt, kann aber ebenso in der Umwelt, insbesondere auf Oberflächen gefunden werden (Mavor *et al.*, 2005; Eggimann *et al.*, 2003). In Kultur bildet *Candida* cremefarbene bis gelbliche Kolonien, die von ihrer Oberflächenbeschaffenheit von glatt bis faltig gestaltet sein können. *Candida* ist Pathogen und Kommensale zugleich. Es wird geschätzt, dass die Mehrzahl der *Candida* – Infektionen auf eine opportunistische Infektion zurückzuführen sind, wobei das breite Spektrum der *Candida* Erkrankungen auch auf die diversen kommensalen Wirtsnischen zurückzuführen ist (Calderone, 2002). Heute werden insbesondere die Arten *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* und *C. lusitaniae* von den insgesamt ca. 20 als humanpathogen definierten Spezies isoliert (Pfaller und Diekema, 2007; Fridkin, 2005). Insbesondere *Candida albicans* wird als der wichtigste humanpathogene Pilz erachtet, was sich in der dominanten Isolierung dieses Keimes widerspiegelt (Pfaller und Diekema, 2007; Tortorano *et al.*, 2006; Edmond *et al.*, 1999).

Candida spp. stellen gemeinsam mit *Escherichia coli* die vierthäufigste Ursache von Septikämien an US – amerikanischen Krankenhäusern dar, dies entspricht 9,5% aller beobachteten Septikämien (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Die Daten aus Europa sehen *Candida* spp. als siebthäufigste Ursache von Septikämien, mit einer Häufigkeit von 2,9% aller registrierten Septikämien (Marchetti *et al.*, 2004). Eine weitere multinationale Studie in Europa fand die Candidaemie mit einer Häufigkeit von 0,2 – 0,4 pro 1000 Patientenaufnahmen verglichen zu 0,46 pro 1000 Aufnahmen in den USA (Tortorano *et al.*, 2004). Zusammenfassend liegt die aktuelle Inzidenz der *Candida* – Infektion, bezogen auf 100.000 Einwohner, bei 8-10/100.000 Personen/Jahr. Die höchste Inzidenz an Septikämien von 75/100.000 Personen/Jahr findet sich bei Neugeborenen, gefolgt von alten Menschen mit einer Inzidenz von 45/100.000 Personen/Jahr (Tortorano *et al.*, 2006; Bille *et al.*, 2005; Clark und Hajjeh, 2002). Die angegebenen Inzidenzraten sind möglicherweise unzureichend, da eine Septikämie durch die positive Blutkultur definiert wird. Es ist jedoch bekannt, dass zwischen 30 und 50% aller autoptisch belegten invasiven Candidiasis – Fälle mit negativen Blutkulturen einhergehen (Kami *et al.*, 2002; Berenguer *et al.*, 1993). Somit ist die Inzidenz der invasiven *Candida* Infektion, definiert durch positive Blutkulturen, wahrscheinlich unterschätzt.

Die Verteilung der isolierten *Candida* Spezies unter den Patientenpopulationen ist keineswegs homogen und stabil: Wird *C. albicans* in der Gesamtschau der Isolate zu über 50% der Fälle isoliert, werden in der wachsenden Subpopulation der Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen in der Mehrzahl der Fälle alternative Spezies, im Besonderen *C. glabrata* (und zunehmend auch *Aspergillus* spp. und *Mucor* spp.) diagnostiziert, *C. parapsilosis* wird mit der höchsten Frequenz in Frühgeborenen gefunden, *C. dubliniensis* insbesondere im Oropharynx HIV positiver Patienten. Mit zunehmenden Alter der Patienten steigt der Anteil der *C. glabrata* Isolate und der Anteil der *C. parapsilosis* Isolate sinkt. In den letzten Jahren ist zudem eine Abnahme der absoluten *C. albicans* - und ein Anstieg der *C. glabrata* Septikämien zu verzeichnen (Tortorano *et al.*, 2006; Kauffman, 2005; Nucci und Marr, 2002; Trick *et al.*, 2002). Die Gesamtmortalität der *Candida* Septikämien liegt bei ca. 38%, wobei die Mortalität bei *C. krusei*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* bei bemerkenswerten 55%, 45% bzw. 41% liegt (Tortorano *et al.*, 2006; Clark und Hajjeh, 2002). Insgesamt zeigt sich eine große Streubreite bei Angaben zur Gesamtmortalität von *Candida* Infektionen, was auf die Grunderkrankungen der Patienten, die isolierten *Candida* Spezies und weitere Faktoren zurückzuführen ist.

Candida Erkrankungen der Haut und Schleimhaut manifestieren sich im Allgemeinen als erosive Candidiasis und Soor, einem Krankheitsbild welches bereits im Altertum beschrieben wurde und durch weiße, schwer abstreifbare Beläge der Schleimhaut der Mundhöhle, der Zunge und des Ösophagus gekennzeichnet ist. Dieses Krankheitsbild tritt vornehmlich bei HIV positiven Patienten im AIDS Stadium, bei immunsupprimierten Patienten und Diabetikern auf (Calderone, 2002). Eine weitere medizinisch und wirtschaftlich bedeutende Manifestation ist die *Candida* - Vulvovaginitis. Exakte Daten zur Epidemiologie dieser Erkrankung fehlen, jedoch wird geschätzt, dass 70 bis 75% der weiblichen Bevölkerung mindestens eine Episode vulvovaginaler Candidiasis, meist im gebärfähigen Alter durchläuft (Sobel, 2007). Bei 40 bis 50% der Patientinnen werden wiederholte Infektionen beobachtet, zwischen 5 und 8% der Patientinnen erleben bis zu vier Episoden pro Jahr, hingegen man bei 20% (Streubreite zwischen 10 und 80%) der asymptomatischen Frauen *Candida* spp. vaginal nachweisen kann (Sobel, 2007). Die invasive Candidiasis ist ein zunehmendes Problem bei der Behandlung immunkompromittierter Patienten. Dabei muss man zwischen der

Candidaemie, der Isolierung von *Candida* aus dem Blut und der disseminierten Candidiasis, also der Infektion verschiedener Organe innerhalb des Körpers unterscheiden (Eggimann *et al.*, 2003).

1.3. Therapie von *Candida* Infektionen

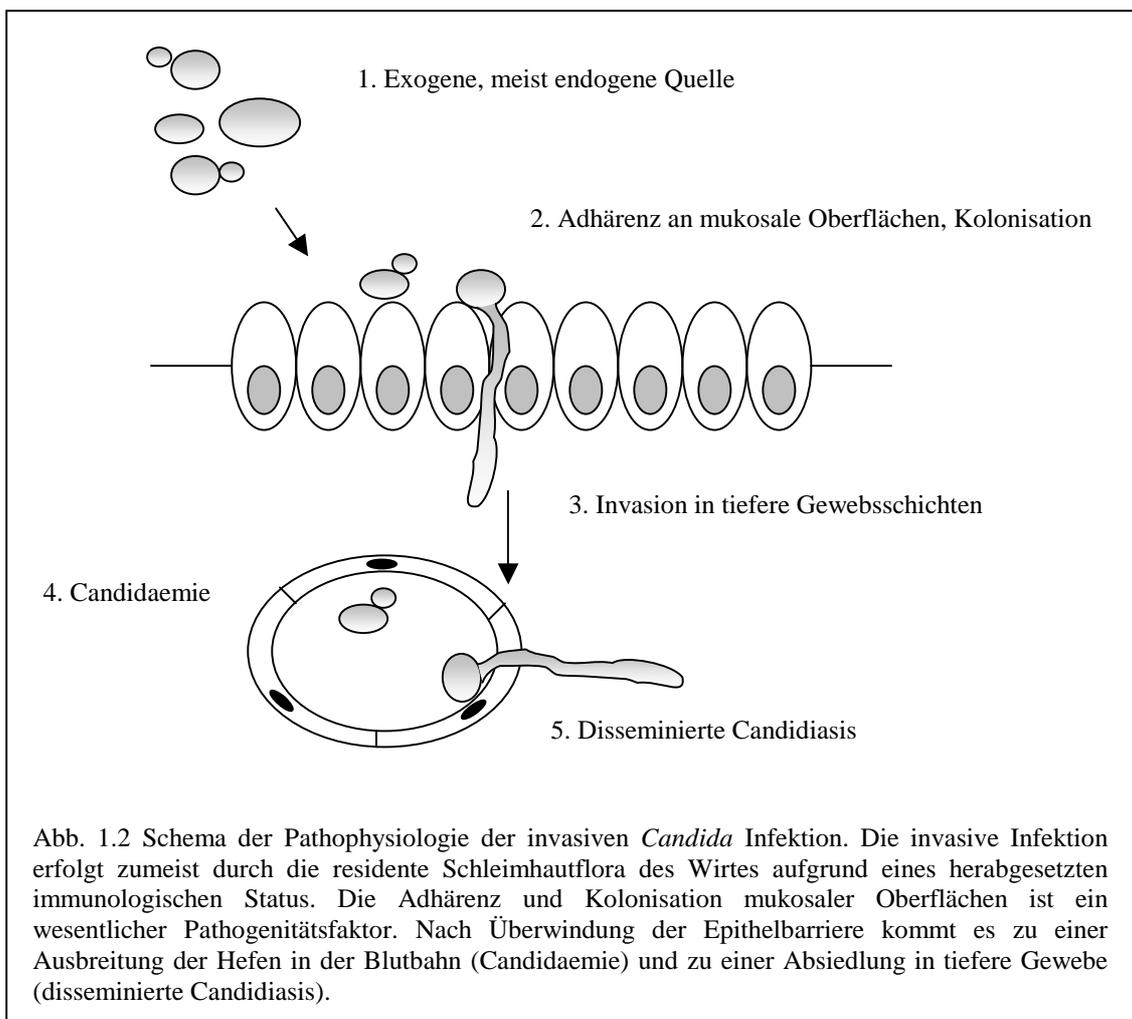
Die oropharyngeale und ösophageale *Candida albicans* - Infektion kann sowohl lokal als auch systemisch behandelt werden, wobei bei lokaler Applikation auf ausreichende Kontaktzeit der Arzneien mit der Schleimhautoberfläche zu achten ist. Lokal anzuwendende Medikamente schließen Amphotericin B und Nystatin ein. Auch Azolderivate wie Fluconazol und Itraconazol-Lösungen werden verwendet. Systemisch zu verabreichende Medikamente schließen Voriconazol, Caspofungin und (liposomales) Amphotericin B ein (Böhme *et al.*, 2003). Systemische *Candida albicans* - Infektionen können mit Fluconazol behandelt werden, alternativ (liposomales) Amphotericin B, Voriconazol oder Caspofungin (Pappas *et al.*, 2004; Böhme *et al.*, 2003). Diese groben Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämato-Onkologie (DGHO) und der Infectious Disease Society of America (IDSA) müssen jedoch anhand der Grunderkrankung des Patienten und des isolierten Erregers angepasst werden. So kann beispielsweise Amphotericin B aufgrund seiner Nephrotoxizität nur eingeschränkt eingesetzt werden und zeigt Fluconazol keine sichere Wirksamkeit bei einigen *Candida* Spezies (Petrikos und Skiada, 2007; Pappas *et al.*, 2004). Die Wirkungsweise der Azolderivate beruht auf der Hemmung des Cytochrom P450 (CYP P450) Enzyms 14 α – Demethylase, welches die Synthese von Ergosterol aus Lanosterol ermöglicht und für den Aufbau der Zellmembran von Bedeutung ist. Trotz höherer Affinität zur fungalen 14 α – Demethylase greifen diese Medikamente in den humanen Steroidstoffwechsel ein. Zu den älteren Azolderivaten gehören die Imidazolderivate Ketoconazol und Miconazol. Neuere Triazole wie Fluconazol und Voriconazol weisen eine höhere Affinität zu fungalen Enzymen auf, was in einer höheren Verträglichkeit dieser Medikamentengruppe resultiert. Wichtige Nebenwirkungen der Azole sind die Lebertoxizität und die aus dem Abbau der Substanzen über CYP P450 abhängige Kaskaden resultierenden Medikamentenwechselwirkungen mit anderen über diesen Weg verstoffwechselten Medikamenten, wie z.B. Rifampicin (Chen und Sorrell, 2007;

Petrikkos und Skiada, 2007). Zur Gruppe der Polyenantimykotika gehören Amphotericin B und Nystatin. Amphotericin B besitzt ein breites Anwendungsspektrum in der Behandlung von Pilzinfektionen, wechselwirkt mit der Ergosterinfraktion der Pilzmembran und führt durch Porenbildung zur Permeabilitätssteigerung der Membran für K^+ und damit konsekutiv zum Zelltod. Die durch fehlende orale Bioverfügbarkeit gekennzeichnete Substanz kann lokal oder systemisch verabreicht werden, wobei die Hauptnebenwirkungen in der bereits erwähnten Nephrotoxizität und einer möglichen Thrombophlebitis nach Infusion liegen. Neue Formulierungen wie liposomales Amphotericin B besitzen ein reduziertes Nebenwirkungsspektrum (Chen und Sorrell, 2007). Neue Entwicklungen der Gruppe der Echinokandine, wie z.B. Caspofungin oder Micafungin hemmen das Enzym $\beta - (1, 3 -) D -$ Glukan Synthase, welches im Aufbau der Zellwand integriert ist. Die menschlichen Zellen besitzen keine Zellwand, was für ein günstiges Nebenwirkungsprofil dieser Medikamentengruppe spricht. Weiterhin werden die Echinokandine nicht über CYP P450 Enzyme abgebaut, somit spielen Medikamenten – Interaktionen wie z.B. bei den Azolen keine wesentliche Rolle. Typische Nebenwirkungen dieser Gruppe sind Histamin verursachte Hautausschläge und Irritationen sowie Fieber (Chen und Sorrell, 2007). Weitere Antimykotika wie Allylamine (Terbinafin) greifen in die Sterolbiosynthese ein und spielen lediglich bei Dermatomykosen durch Dermatophyten eine Rolle. Auch 5 – Fluorocytosin, was mit der Nukleinsäuresynthese interferiert, spielt als Einzelsubstanz aufgrund hoher Resistenzraten keine Rolle und wird nur in Verbindung mit Amphotericin B und Azolderivaten eingesetzt. Die Suszeptibilität von *Candida* spp. zu Antimykotika ist insgesamt uneinheitlich. Mechanismen, die zur abgeschwächten Wirkung von Antimykotika führen sind Veränderungen der Zellwand oder der Zellmembran mit der Folge einer verringerten Aufnahme der Medikamente, Effluxproteine, welche die Medikamente effektiv aus der Zelle pumpen, Überexpression von Zielstrukturen und Mutationen in den Zielstrukturen der Medikamente, die zu einer gesteigerten Resistenz führen. Weiterhin spielen die Aktivierung alternativer Signalwege, die zu einem gesteigerten Metabolismus der Medikamente führen und die Bildung von Medikamenten - Vakuolen eine Rolle (Eggimann *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen Signifikanz humanpathogener Pilze und der zunehmenden Problematik

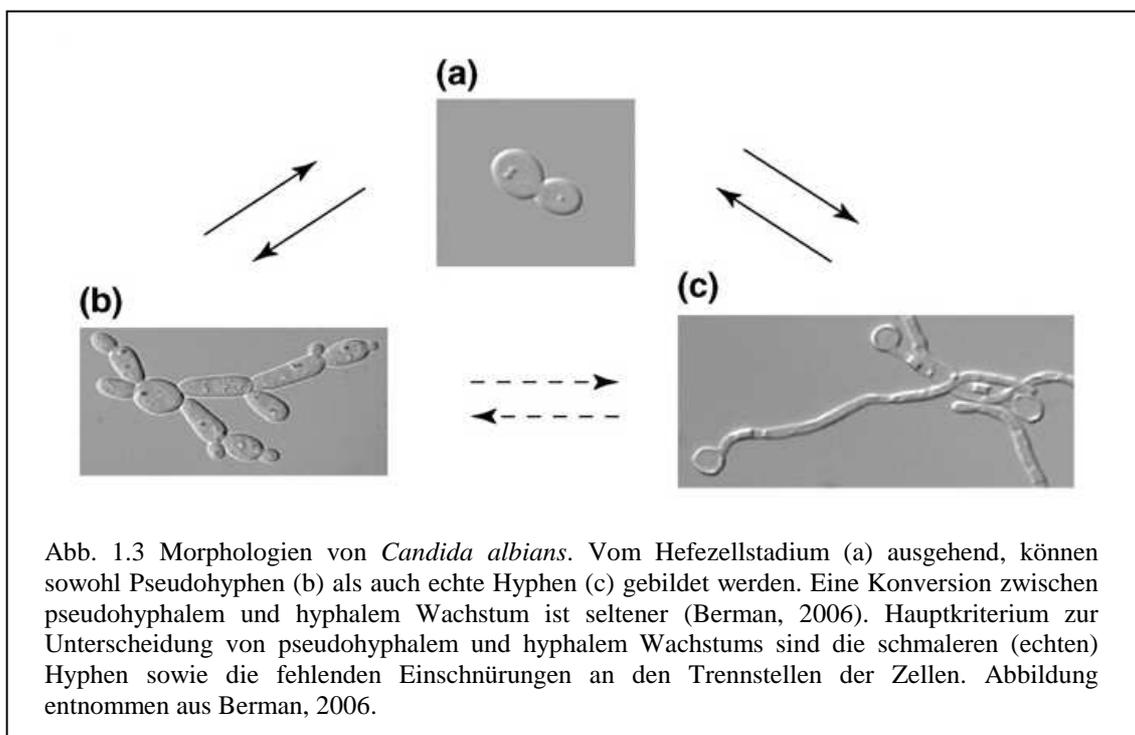
behandlungsresistenter Infektionen ist die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien und Arzneien von eminenter Bedeutung.

1.4. Morphogenese bei *Candida albicans*

Neben den oben genannten Faktoren der Grunderkrankung des Patienten, welche die Kolonisation und Infektion mit *Candida albicans* begünstigen, besitzt *C. albicans* eine Vielzahl von Mechanismen, sich dem humanen Wirt und den hochgradig verschiedenen Wirtsnischen anzupassen, was als eine grundlegende Komponente des Erfolges dieser Gattung gesehen wird. *C. albicans* weist Virulenzfaktoren, welche zur Kolonisation von Haut und Schleimhaut, zur Überwindung von Membranbarrieren und zur Dissemination im Körper befähigen, vor (Calderone und Fonzi, 2001) (vgl. Abb. 1.2).



Es sollte hervorgehoben werden, dass oberflächliche Pilzinfektionen ohne Invasion und Dissemination in tiefere Gewebsschichten zumeist lokalen, in jedem Fall keinen lebensbedrohlichen Charakter besitzen. Hingegen verlangen die potentiell letalen invasiven Mykosen eine Verbreitung in tiefere Gewebe des Körpers (Gow *et al.*, 2002). Die Vielseitigkeit und auch der herausragende Erfolg dieser Spezies hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten zunehmend wissenschaftliches Interesse geweckt. Zu den im Allgemeinen akzeptierten Virulenzfaktoren zählt die Fähigkeit, an Wirtsgeweben zu adhären und einen Biofilm zu bilden. Biofilme, welche auch besonders auf avitalem Material wie Plastikkathetern und Implantaten gefunden werden, sind der Therapie durch antimikrobielle Substanzen unzureichend zugänglich und schwer zu eradizieren (Segal, 2005). Weiterhin spielen hydrolytische Enzyme, wie sekretorische Aspartatproteinasen (SAP) und Phospholipasen, bei der Adhäsion und Gewebsinvasion eine herausragende Rolle (Naglik *et al.*, 2003; Ghannoum, 2000). Als einen zentralen Virulenzfaktor sieht man die Fähigkeit, zwischen verschiedenen phänotypischen Wachstumsformen (Hefezelle, Pseudohyphe, echte Hyphe und andere Phänotypen) zu wechseln, was unter dem Begriff Polymorphismus subsummiert wird (Whiteway und Bachewich, 2007) (vgl. Abb. 1.3).



Unter den pathogenen *Candida* spp. sind lediglich *C. albicans* und *C. dubliniensis* zum Polymorphismus befähigt (Calderone, 2002). Der reversible Übergang vom Wachstum als Hefe zum elongierten, filamentösen Wachstum spiegelt einerseits die Anpassung an den Wirtsorganismus wieder, kann andererseits aber nicht generell mit gesteigerter Virulenz verknüpft werden. Wahrscheinlich spielen beide Wachstumsformen für die Entwicklung und Progression der Infektion eine Rolle, sind also als Komponente, nicht jedoch als Ursache zu sehen (Gow *et al.*, 2002; Calderone und Fonzi, 2001). Die Hyphenform wurde mit einer erhöhten Adhärenz an das Epithelium des Wirtes assoziiert (Staab *et al.*, 1999) und ermöglicht dem Pilz, die Epithelbarriere zu penetrieren und in tiefere Gewebsschichten zu gelangen (Brown und Gow, 1999). Der Wechsel zum filamentösen Wachstum wird durch verschiedene Umweltsignale initiiert (Ernst, 2000; Brown und Gow, 1999). Serum, als sehr komplexes Medium, ist der stärkste bekannte Induktor der Hefe – Hyphen Morphogenese. In Kultur kann die Filamentation durch die Regulation der Temperatur und des pH Wertes des Mediums induziert werden. Buffo *et al.* zeigten 1984, dass bei einer Temperatur von 37°C und einem pH Wert des Mediums über 6 die Keimschlauchbildung induziert wird. Temperaturen unter 37°C und ein pH unter 6 begünstigen das Wachstum in Hefeform (Buffo *et al.*, 1984). Weitere Induktoren des filamentösen Wachstums sind u.a. *N*-acetylglucosamin, Estrogene und Progesterone sowie Nährstoffmangelmedien (Ernst, 2000; Brown and Gow, 1999) (vgl. auch Abb. 1.4).

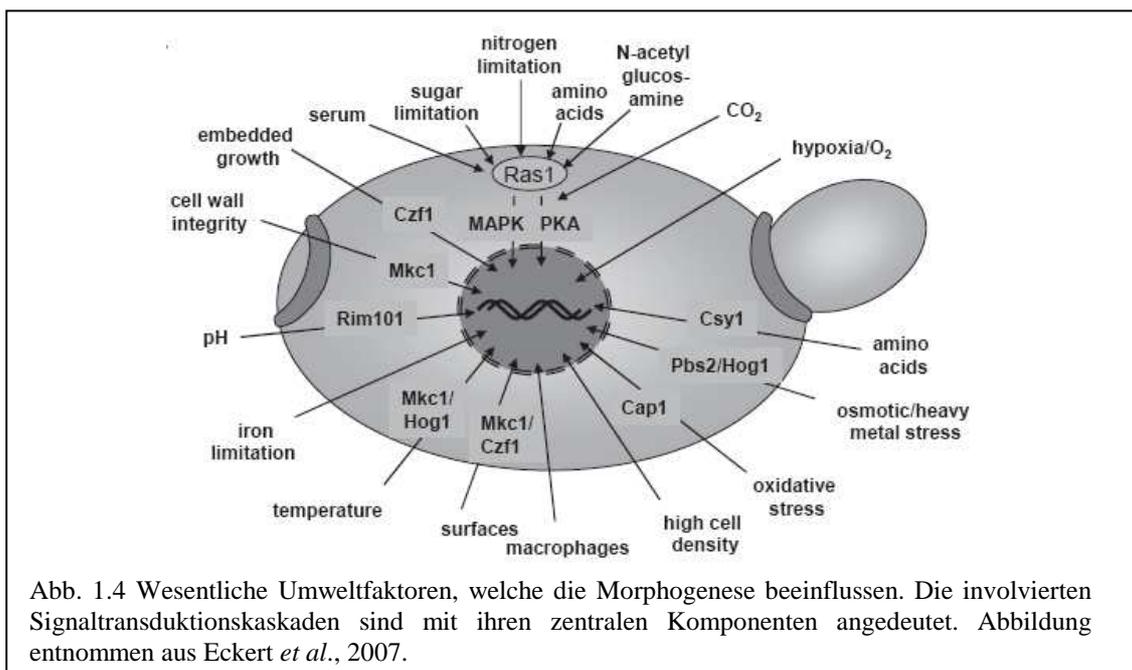


Abb. 1.4 Wesentliche Umweltfaktoren, welche die Morphogenese beeinflussen. Die involvierten Signaltransduktionskaskaden sind mit ihren zentralen Komponenten angedeutet. Abbildung entnommen aus Eckert *et al.*, 2007.

Durch Vergleiche zum Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* konnten in *Candida albicans* wesentliche Regulationsmechanismen der Morphogenese verdeutlicht werden. Beispielsweise können *ste12Δ/ste12Δ*, *phd1Δ/phd1Δ* Mutanten in *S. cerevisiae* keine Pseudohyphen ausbilden. Analog konnte für *C. albicans* gezeigt werden, dass *cph1Δ/cph1Δ*, *efg1Δ/efg1Δ* (Cph1p ist homolog zu Ste12p, Efg1p homolog zu Phd1p) defiziente Mutanten nicht zum filamentösen Wachstum befähigt und im murinen Tiermodell avirulent sind (Lo *et al.*, 1997). Auf die wesentlichen Signaltransduktionskaskaden zur positiven Regulation der Morphogenese in *C. albicans* soll im Folgenden eingegangen werden, wobei die vielfach verwobenen Kaskaden vereinfacht dargestellt werden.

1.4.1. RAS1/CPHI Kaskade

In Eukaryonten sind MAPK (mitogen – activated protein kinase) Kaskaden wesentliche Signaltransduktionswege, die eine Vielzahl von Signalen von der Zelloberfläche in den Zellkern vermitteln (Biswas *et al.*, 2007). Liu *et al.* konnten 1994 zeigen, dass die Deletion des *S. cerevisiae* *STE12* Homolog *CPHI* in *C. albicans* mit einer reduzierten Fähigkeit zur Ausbildung von Pseudohyphen einhergeht. Cph1p agiert unter Nährstoffmangelbedingungen als Transkriptionsfaktor und induziert pseudohyphales Wachstum (Ernst, 2000). Dabei ist Cph1p das Effektorprotein des MAPK Signalweges (Whiteway, 2000). Feng *et al.* (1999) und Leberer *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Ras1p, ein membranständiges G - Protein, was einerseits in einer inaktiven GDP gebundenen Form, andererseits nach Stimulation als aktive GTP-gebundene Form vorliegt, den MAPK Signalweg aktiviert. Aktiviertes Ras1p gibt Umweltsignale wiederum durch die Aktivierung von Cdc42p, einem G – Protein, welches durch GDP – GTP – Austausch mit Hilfe von Cdc24p aktiviert wird, an den MAPK Signalweg weiter. Ushinsky *et al.* konnten im Jahr 2002 *CDC42* eine essentielle Rolle für das Hyphenwachstum in *C. albicans* zuweisen. Als folgendes Signalelement wurden anhand von Homologen in *S. cerevisiae* die Cst20p (Ste20p) Kinase und die Hst7p (Ste7p) Kinase identifiziert. Die Disruption dieser beiden Gene resultiert in einer abgeschwächten Filamentation auf festem Medium im Vergleich zum Wildtyp (Köhler und Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996). Csank *et al.* konnten 1998 zeigen, dass Cek1p

(Erk1p), welches Cph1p aktiviert, Hst7p nachgeschaltet ist und für die Filamentation unter Mangelbedingungen und festem Medium notwendig ist. Wird *CEK1* disrupted, resultiert eine abgeschwächte Virulenz im Mausmodell einer systemischen Infektion mit *Candida* (Román *et al.*, 2007). Nichtsdestotrotz filamentieren alle Nullmutanten der zentralen MAPK/*CPH1* Kaskade nach Induktion durch Serum, was auf alternative Kaskaden schließen lässt (Biswas *et al.*, 2007). Zusätzlichen Einfluss auf die Cek1p MAPK Kaskade übt Farnesol als *quorum sensing* Molekül aus. Farnesol wird von *Candida albicans* bei hoher Zelldichte sezerniert und inhibiert dabei das filamentöse Wachstum (Oh *et al.*, 2001). Die Zugabe von Farnesol zum Medium reprimiert die Expression von *CPH1* und *HST7* (Sato *et al.*, 2004) (vgl. Abb. 1.5).

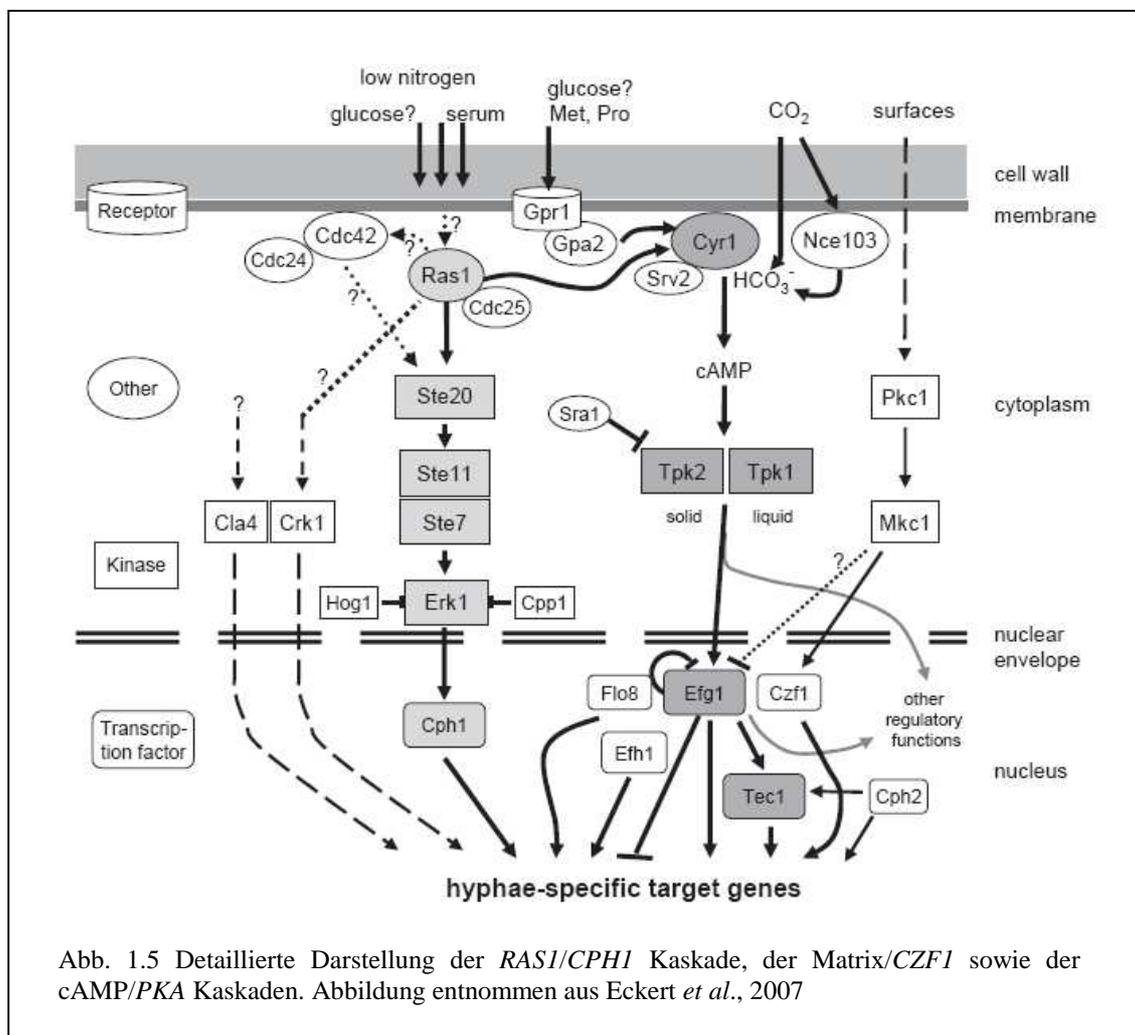


Abb. 1.5 Detaillierte Darstellung der *RAS1/CPH1* Kaskade, der Matrix/*CZF1* sowie der cAMP/*PKA* Kaskaden. Abbildung entnommen aus Eckert *et al.*, 2007

1.4.2. RIM20/RIM101 Kaskade

Der pH Wert des Mediums hat profunden Einfluss auf das Filamentationsverhalten in *C. albicans* (Buffo *et al.*, 1984; De Bernardis *et al.*, 1998). In saurem Milieu wächst *Candida* bevorzugt als Hefe, hingegen im neutralen bzw. alkalischen Bereich ein filamentöses Wachstum zu beobachten ist. Ein Schlüsselenzym in diesem pH sensitiven Regelkreis ist Rim101p, ein Transkriptionsfaktor, der direkt Hyphen - spezifische Gene aktivieren kann. Rim101p zeichnet eine Zink-Finger Domäne und die Aktivierung durch einen proteolytischen C - terminalen Verdau aus. Weiterhin kennzeichnet Rim101p (in Zusammenspiel mit Rim8p, Rim13p und Rim20p) die Regulation zweier funktionell homologer pH responsiver Gene: *PHR1* wird exprimiert, wenn der pH Wert des Mediums über 5,5 liegt. Hingegen kann die *PHR2* Expression nur unter einem pH von 5 des Mediums detektiert werden (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlshlegel und Fonzi, 1997). Funktionell zeichnen sich diese beiden Glycosidasen durch die Verknüpfung der $\beta - 1, 3 -$ Glucane und $\beta - 1, 6 -$ Glucane der Zellwand aus (Fonzi, 1999). Rim101p wird konstitutiv exprimiert, jedoch bei einem pH $>5,5$ durch eine C - terminale Prozessierung aktiviert. Die nun aktive Form bewirkt als Transkriptionsfaktor die Expression von *PHR1* und Hyphen - spezifischen Genen, während die Expression von *PHR2* reprimiert wird, was in der Transition zum filamentösen Wachstum resultiert. Umgekehrt wird Rim101p bei pH $< 5,5$ nicht prozessiert und infolgedessen die Expression von *PHR1* nicht verstärkt. Die Expression von *PHR2* ist unter diesen Bedingungen nicht reprimiert und resultiert daher im Hefe-Wachstum (vgl. Abb. 1.6).

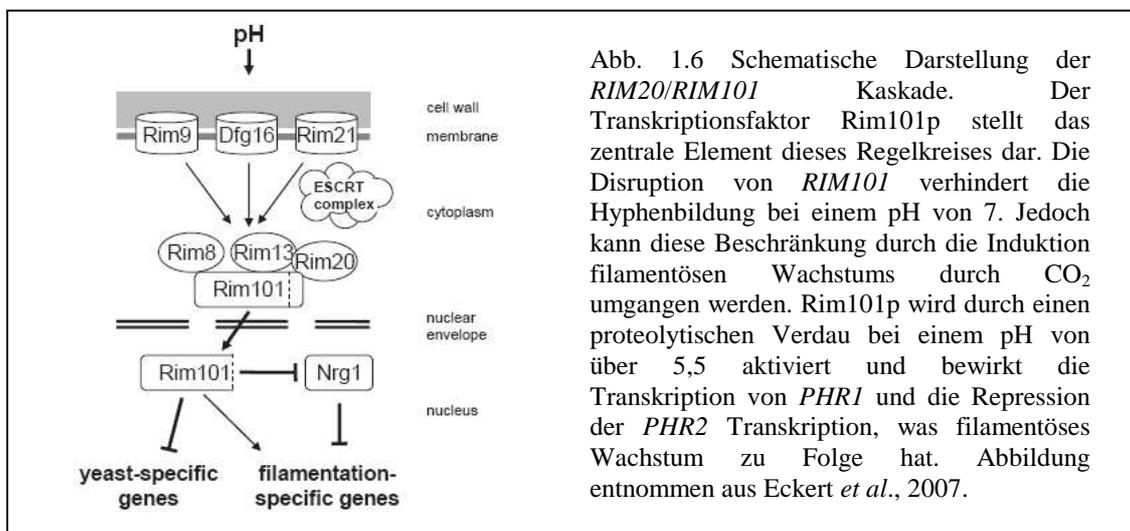


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der *RIM20/RIM101* Kaskade. Der Transkriptionsfaktor Rim101p stellt das zentrale Element dieses Regelkreises dar. Die Disruption von *RIM101* verhindert die Hyphenbildung bei einem pH von 7. Jedoch kann diese Beschränkung durch die Induktion filamentösen Wachstums durch CO_2 umgangen werden. Rim101p wird durch einen proteolytischen Verdau bei einem pH von über 5,5 aktiviert und bewirkt die Transkription von *PHR1* und die Repression der *PHR2* Transkription, was filamentöses Wachstum zu Folge hat. Abbildung entnommen aus Eckert *et al.*, 2007.

1.4.3. Matrix/CZF1 Kaskade

Brown Jr. *et al.* erkannten 1999, dass *C. albicans* filamentöses Wachstum zeigt, wenn die Zellen in Agar eingebettet sind. Am Wildtypstamm SC5314 zeigte die Gruppe, dass Zellen auf der Oberfläche nährstoffreichen Agarmediums bei 25°C in Hefeform glatte Kolonien ausbildet. Hingegen zeigten Zellen, die in den Agar eingelassen wurden bei konstant gleichen Bedingungen bereits nach 48 Stunden zu fast 100% filamentöses Wachstum. Diese Beobachtung konnte sowohl mit anderen Wildtypstämmen als auch unter verschiedenen Agarmedien wiederholt werden. Diese Fähigkeit beruht zu großen Teilen auf dem Transkriptionsfaktor Czf1p, einem Zink – Finger Protein (Brown Jr. *et al.*, 1999). In einer späteren Publikation konnte die Gruppe zeigen, dass Czf1p die hemmende Wirkung von Egf1p auf die Filamentation von eingebetteten Zellen aufhebt (Giusani *et al.*, 2002). Dieser Signaltransduktionsweg steht exemplarisch für die Fähigkeit von *C. albicans*, die physikalischen Gegebenheiten der Umwelt wahrzunehmen und spezifisch darauf zu reagieren (vgl. Abb. 1.5).

1.4.4. cAMP/PKA Kaskade

Die cAMP/PKA Kaskade (cyclisches AdenosinMonoPhosphat/ ProteinKinase A) stellt einen zentralen Signalweg der Morphogenese in *C. albicans* dar, was sich beispielsweise durch die Induktion hyphalen Wachstums durch exogenes cAMP verdeutlichen lässt. Ebenso führt die Hemmung von cAMP Phosphodiesterasen zu einer Hefe – Hyphen Transition (Biswas *et al.*, 2007). *RAS1* als übergeordneter Regulator hyphalen Wachstums kann, wenn konstitutiv aktiv, filamentöses Wachstum induzieren, hingegen eine Disruption von *RAS1* in *C. albicans* zu einem Defekt des hyphalen Wachstums führt (Feng *et al.*, 1999). Der morphologische Defekt einer *RAS1* Deletion kann durch die Zugabe von cAMP zum Medium kompensiert werden (Biswas *et al.*, 2007). Neben *RAS1* haben Gpa2p gekoppelt an den G – Protein Rezeptor Gpr1p Einfluss sowohl auf den MAPK als auch auf den cAMP/PKA Signalweg (Liu, 2001). Vergleichbar mit *RAS1* besitzt *C. albicans* eine einzelne Adenylylcyclase (*CDC35*, *CYRI*), die nicht für das Wachstum an sich, jedoch für hyphales Wachstum essentiell ist (Rocha *et al.*, 2003). Einfluss auf diesen cAMP Signalweg nehmen Srv2p, ein

Adenylylcyclase assoziiertes Protein und zwei Phosphodiesterasen (Pde1p und Pde2p). Srv2p reguliert die Aktivität der Adenylylcyclase und ist für ein Wildtyp-typisches Filamentationsverhalten und Virulenz im Mausmodell erforderlich (Bahn und Sundstrom, 2001). Auch der Phänotyp einer *srv2Δ* Deletion kann durch die Zugabe von exogenem cAMP aufgehoben werden. Insbesondere *PDE2* reguliert den cAMP Haushalt der Hefezelle: Die Disruption von *PDE2* resultiert in einem Überangebot an cAMP und einer Hyperfilamentation, die jedoch mit einer Avirulenz im Modell einer systemischen *Candida* – Infektion einhergeht (Bahn *et al.*, 2003). Effektormolekül von intrazellulär generiertem cAMP ist die Proteinkinase A (PKA), deren aktives Zentrum durch die Modifikation von regulatorischen Domänen aktiviert wird. In *C. albicans* sind es *TPK1* und *TPK2*, welche beide die Bildung von Hyphen nach Stimulation durch cAMP fördern (Biswas *et al.*, 2007). *Tpk1Δ* Nullmutanten können auf festem Medium keine Hyphen ausbilden, jedoch in flüssigem Medium hyphales Wachstum zeigen. Im Gegensatz dazu können *tpk2Δ* Nullmutanten auf festem Medium filamentieren, sind aber in flüssigem Medium dazu nicht in der Lage (Sonneborn *et al.*, 2000). Der cAMP/PKA Signalweg mündet in *EFG1*, einem *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor, der Hyphen – spezifische Gene aktiviert. Efg1p besitzt eine Proteinkinase A Phosphorylierungsstelle (Threonin 206), welche wahrscheinlich die Signaltransduktion von Tpk2p vermittelt. Eine Mutation der entsprechenden Aminosäure resultiert in einer Inaktivierung von Efg1p (Sonneborn *et al.*, 2000). Nullmutanten dieses Transkriptionsfaktors können unter den meisten Filamentation begünstigenden Bedingungen (inklusive Serum) kein hyphales Wachstum zeigen (Biswas *et al.*, 2007) (vgl. auch Abb. 1.5).

Die angeführten Signalkaskaden stehen exemplarisch für die Fähigkeit von *C. albicans*, sehr unterschiedliche biophysikalische und chemische Umwelteinflüsse wahrzunehmen und gezielt darauf zu reagieren. Die Vernetzung einzelner Kaskaden reflektiert zudem die hochentwickelte Anpassung des Keimes an die vielfältigen Wirtsnischen.

1.5. *Cryptococcus neoformans* als Ursache invasiver Pilzinfektionen

Cryptococcus neoformans ist weltweit in immuninkompetenten Patienten zu isolieren und wird meist durch Inhalation akquiriert (Enoch *et al.*, 2006; Nucci und Marr, 2005; vgl. Abb. 1.7). Unspezifische Beschwerden wie Husten oder Fieber können insbesondere in HIV seropositiven Patienten in eine das AIDS Stadium definierende *Cryptococcus* - Meningitis übergehen. Gehen die Infektionen mit *Cryptococcus* aufgrund der breiten Verfügbarkeit wirksamer antiretroviraler Medikamente in den Industriestaaten zurück, ist die Inzidenz in den afrikanischen Ländern mit hoher HIV Rate ansteigend (Warnock, 2007). Dabei erreichen die unter den lokalen Gegebenheiten behandelten *Cryptococcus* – Meningitiden eine Mortalität von 83 – 100% (Clark und Hajjeh, 2002). Auch *Cryptococcus* ist zur Veränderung seiner Zellmorphologie durch die Bildung einer Polysaccharidkapsel befähigt (Zaragoza *et al.*, 2003). Die Kapselbildung hat zentralen Einfluss auf die Virulenz dieses Keimes, was sich in der Beobachtung widerspiegelt, dass unbekapselte Mutanten avirulent sind (Granger *et al.*, 1985).

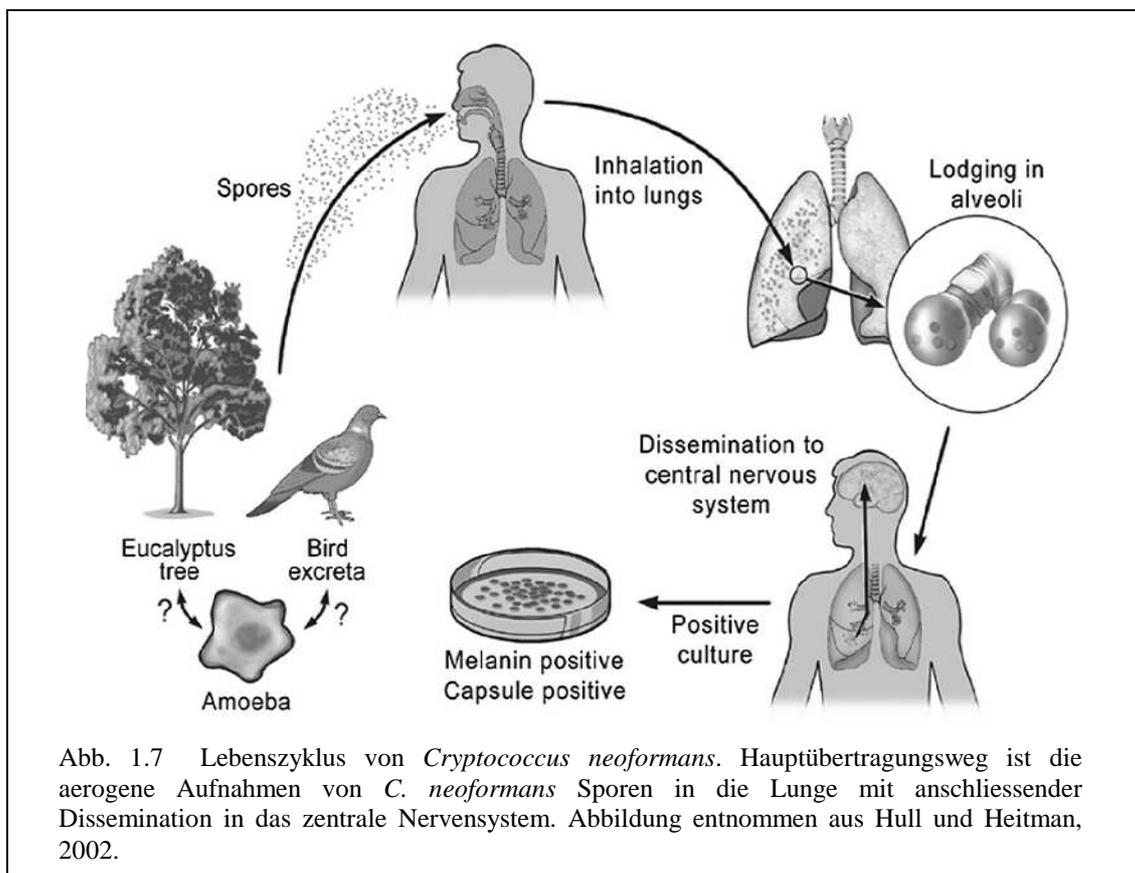


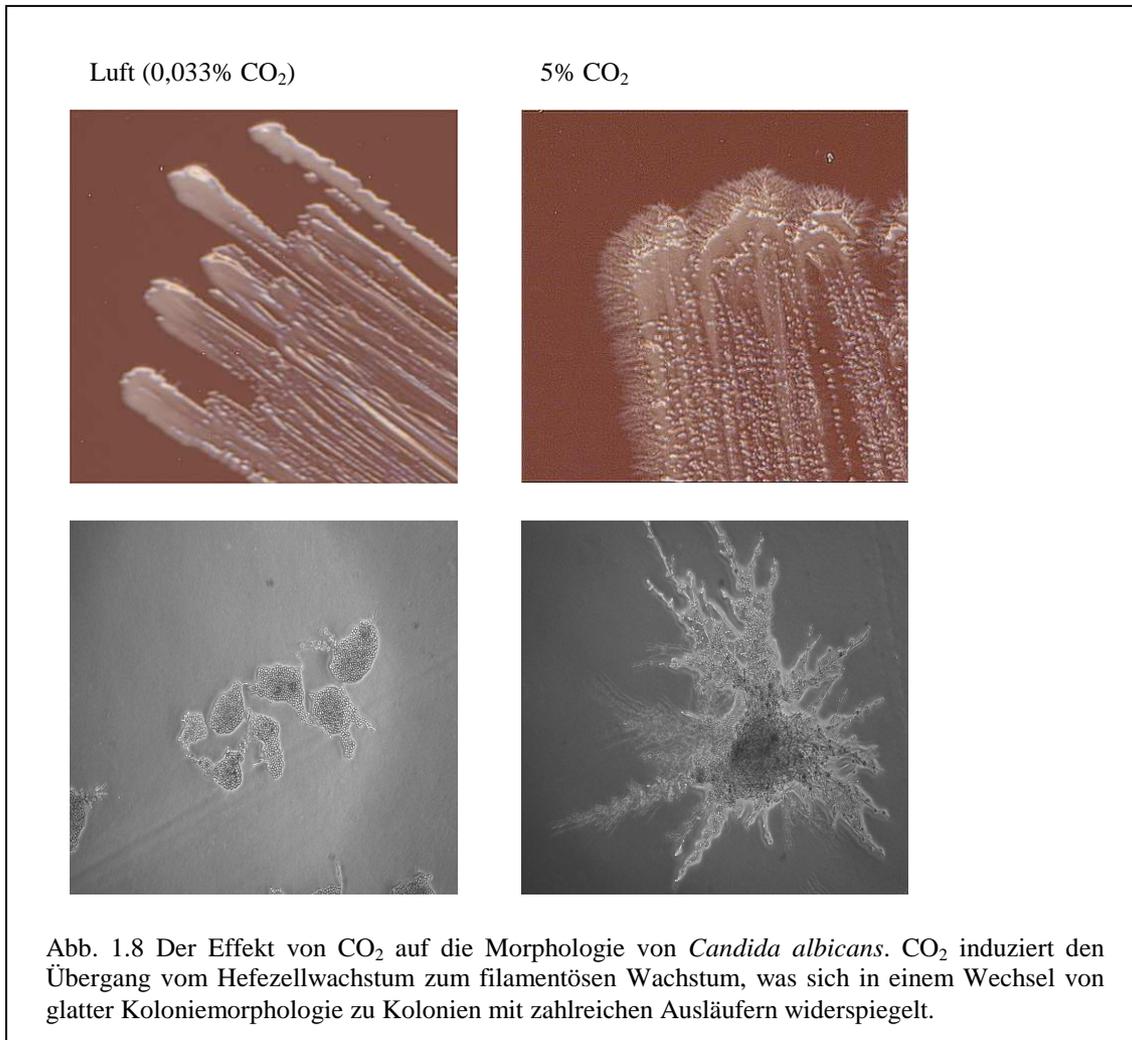
Abb. 1.7 Lebenszyklus von *Cryptococcus neoformans*. Hauptübertragungsweg ist die aerogene Aufnahme von *C. neoformans* Sporen in die Lunge mit anschließender Dissemination in das zentrale Nervensystem. Abbildung entnommen aus Hull und Heitman, 2002.

Im Jahr 1985 konnte durch Granger und Kollegen gezeigt werden, dass CO₂ profunden Einfluss auf die Kapseldicke hat. Zaragoza *et al.* zeigten 2003, dass die Induktion der Kapselbildung durch CO₂ nicht *RAS1* abhängig geschieht, aber auf die Adenylylcyclase *CAC1* angewiesen ist. Zudem konnte durch Alspaugh *et al.* (2002) verdeutlicht werden, dass *cac1Δ* Nullmutanten nicht in der Lage sind, eine Kapsel auszubilden bzw. Melanin als zweiten wesentlichen Virulenzfaktor zu bilden.

1.6. CO₂ ist ein potenter Induktor hyphalen Wachstums in *Candida albicans*

Bereits 1978 beschrieben Allen und King die Beobachtung, dass okklusive Verbände die Suszeptibilität der Haut für Pilzinfektionen (Dermatophyten und *Candida*) erhöhen. Ihre Hypothese begründete diesen Effekt mit steigenden CO₂ Partialdrücken unter den z.T. luftdicht verschlossenen Plastikverbänden. CO₂, so ihre These, induziert hyphales Wachstum in *Candida* bzw. die Ausbildung von Conidien, was letztendlich zu einer Mazeration der Hautoberfläche und zu einer Infektion führt. Mock *et al.* beschrieben 1990 die CO₂ abhängige Induktion der Keimschlauchbildung *in vitro* in *Candida albicans*. Dabei unterstrichen Mock und Kollegen, dass unter atmosphärischen Bedingungen oder CO₂ freier Atmosphäre keine Keimschlauchbildung stattfindet. In dieser Arbeit fanden die Autoren eine optimale CO₂ Konzentration von 10% CO₂ zur Induktion von Keimschläuchen innerhalb von 3 Stunden. Konzentrationen von über 20% zeigten eine Inhibition des Wachstums der Zellen an sich. Um einen Sauerstoffmangeleffekt auszuschließen, ersetzten Mock *et al.* bis zu 20% der Atmosphäre mit N₂, was jedoch keinen Effekt auf die Morphologie der Zellen hatte. Es war also das CO₂, nicht ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck, der die Keimschlauchbildung induzierte. In der Arbeit von Mock konnte Natriumbikarbonat (NaHCO₃⁻) zumindest teilweise den durch CO₂ induzierten Phänotyp nachbilden. 2005 konnte Sheth *et al.* in einer Studie anhand von 208 klinischen Isolaten von *C. albicans* auf Kochblutagar zeigen, dass 6% CO₂ in diesen Stämmen ein robustes Signal darstellt, um filamentöses Wachstum zu induzieren (vgl. Abb. 1.8). Weiterhin wurden 175 alternative *Candida* Stämme getestet, wobei 98,3% dieser Isolate keine hyphale Morphologie ausbildeten. Zwei Isolate von *C. dubliniensis* und ein Isolat *C. tropicalis* zeigten eine schwach ausgeprägte Filamentation nach längerem Bebrüten unter 6%

CO₂. Die Induktion der Keimschlauchbildung durch CO₂ stellt einen im humanen Wirt wesentlichen Prozess dar, betrachtet man die über 150fach höhere CO₂ Konzentration im Menschen (ca. 5%) gegenüber der Atmosphäre.

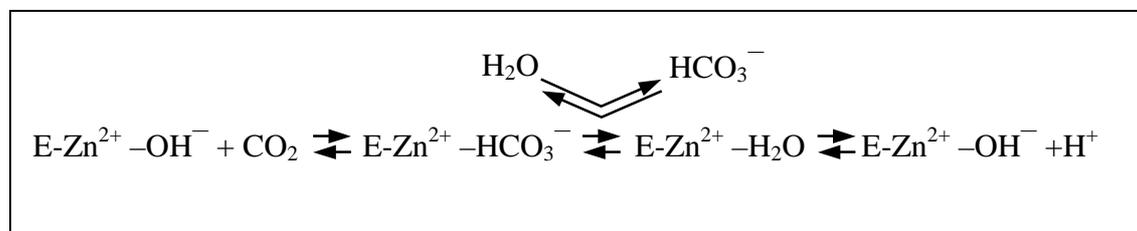


Neben *Candida albicans* kann man auch in *Coccidioides immitis* bei Inkubation unter 10% CO₂ Veränderungen der Morphologie feststellen (Lones und Peacock, 1959), wie es auch für *Mucor* beschrieben wurde (Bartnicki-Garcia und Nickerson, 1962). Weiterhin zeigt *Cryptococcus neoformans* unter erhöhtem CO₂ Partialdruck eine Dickenzunahme der Polysaccharidkapsel (Granger *et al.*, 1985; vgl. Abschnitt 1.5). In einem Modell der vaginalen *Candida* – Infektion fanden Persi *et al.* (1985), dass CO₂ die Fähigkeit einiger getesteter *C. albicans* Stämme zur Adhäsion an vaginale Epithelzellen erhöht. Persi und Kollegen schlossen aus ihren Beobachtungen, dass CO₂ möglicherweise für die Adhäsion und Pathogenese der *Candida* - Infektion eine

tragende Rolle spielt und wiesen darauf hin, dass während der Schwangerschaft und auch bei Patienten mit Diabetes mellitus eine CO_2 Retention vorliegt, welche die Infektion mit *Candida* begünstigen kann.

1.7. Carboanhydrasen

Carboanhydrasen (Synonym: Carboanhydratasen, Carbonathydrolasen) sind zinkhaltige Metalloenzyme, welche die Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- beschleunigen. Erstmals wurden Carboanhydrasen (CA) 1933 in bovinen Erythrozyten beschrieben (Meldrum und Roughton, 1933). Die katalytische Reaktion lässt sich wie folgt darstellen:



Das chemisch langsame Equilibrium zwischen CO_2 und HCO_3^- wird enzymatisch um bis zu 10^7 fach beschleunigt (Stryer, 1996). Dabei ist die zinkabhängige Hydratisierung von CO_2 über die evolutionär und strukturell unterschiedlichen Klassen konserviert (Liljas und Laurberg, 2000). Man unterscheidet heute α -CA (11 Isoenzyme in Säugern, einzelne Algen), β -CA (höhere Pflanzen, Algen, Bakterien, Archaeen) und γ -CA (niedere Bakterien). Die Existenz weiterer distinkter Alloenzyme (δ – Klasse in *Thalassiosira weissflogii*, einer Kieselalge, ε – Klasse in *Halothiobacillus neapolitanus*, einer Blaualge) wird diskutiert (So *et al.*, 2004; Hewett-Emmett und Tashian, 1996; Smith *et al.*, 1999; Tripp *et al.*, 2001). Die einzelnen CA Klassen haben strukturell kaum Gemeinsamkeiten, was als ein Beispiel für Konvergenz in der Evolution gesehen wird. Jedoch komplexieren alle Enzymklassen ein einzelnes Zinkatom als Cofaktor in ihrem aktiven Zentrum (Tripp *et al.*, 2001; Smith und Ferry, 2000). Für die α – β – und γ – Klasse nimmt man aufgrund von Studien zur Enzymkinetik an, dass sie einen gleichartigen Reaktionsmechanismus besitzen: Zuerst erfolgt ein nukleophiler Angriff eines an Zink gebundenen Hydroxidions auf CO_2 , in einem zweiten Schritt wird das aktive Zentrum durch die Ionisation eines an Zink gebundenen Wassermoleküls wiederhergestellt (Tripp *et al.*, 2001). Für die β – Klasse der CA wurden die

Aminosäurereste für die Komplexierung von einem Zinkatom mit zwei Cysteinresten und einem konservierten Histidin bestimmt (Tripp *et al.*, 2001). Ein globales Alignment der bekannten β – CA zeigte, dass außer den drei für die Zinkbindung konservierten Aminosäurereste nur zwei weitere Aminosäurereste (Aspartat und Arginin) komplett konserviert sind (Tripp *et al.*, 2001; Cronk *et al.*, 2001). Neben der Funktion von CA im pH Puffersystems des Blutes, während der Atmung und der Nierenfunktion sind verschiedene, z.T. essentielle metabolische Prozesse sind auf die Bereitstellung von CO_2 bzw. HCO_3^- angewiesen. Jedoch diffundiert freies CO_2 schneller aus der Zelle heraus, als es im Metabolismus ersetzt werden kann. Es wird daher vermutet, dass CA unter anderem für die Fixation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ in der Zelle verantwortlich sind (Smith *et al.*, 1999).

Saccharomyces cerevisiae exprimiert eine Carboanhydrase (ScNce103p) der β – Klasse deren Enzymaktivität erst 2004 nachgewiesen werden konnte (Clark *et al.*, 2004; Amoroso *et al.*, 2004). Eine homozygote Deletionsmutante wurde zuerst durch einen aeroben Wachstumsdefekt und fehlender antioxidativer Aktivität beschrieben (Götz *et al.*, 1999). Der gezeigte Wachstumsdefekt konnte durch die Expression von β -CA von *Medicago sativa*, Tabak oder *E. coli* komplementiert werden (Götz *et al.*, 1999; Slaymaker *et al.*, 2002; Cronk *et al.*, 2001).

1.8. Eine Adenylylcyclase als CO_2 Sensor ?

Es ist bekannt, dass CO_2 die Enzymaktivität von Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) durch die Bildung eines Carbamatrestes an einem Lysin des aktiven Zentrums modifizieren kann (Spreitzer und Salvucci, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass Cyanobakterien Kohlenstoff – Konzentrations – Mechanismen (CCM – inorganic carbon concentrating mechanism) besitzen, um eine konstante Kohlenstoffversorgung sicherzustellen (Badger und Price, 2002). Die genauen Mechanismen der Kohlenstoffrezeption und der weiteren Signaltransduktion sind unverstanden. In Säugern liegt inorganischer Kohlenstoff bei physiologischem pH in Form von HCO_3^- prädominant vor. Chen *et al.* (2000) konnten zeigen, dass HCO_3^- in physiologischen Konzentrationen direkt die Bildung von cAMP durch eine lösliche Adenylylcyclase (soluble Adenylylcyclase – sAC) stimulieren kann. Die lösliche AC

unterscheidet sich strukturell, molekular und biochemisch von den bis dahin bekannten membrangebundenen, G-Protein gekoppelten Adenylylcyclasen (Buck *et al.*, 1999). Die transmembrangebundenen Adenylylcyclasen (tmAC) sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die eine Vielzahl von externen Stimuli (z.B. durch Hormone) vermitteln. Dabei werden rezeptorgebundene G – Proteine aktiviert, die ihrerseits zur cAMP Generierung durch die tmAC und infolge dessen z.B. zur Aktivierung von Phosphokinasen oder Ionenkanälen führen. Hingegen zeigten sich sAC insensitive gegenüber der Aktivierung durch G – Proteine oder Forskolin. *Vice versa* wurde gezeigt, dass tmAC nicht durch HCO_3^- in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Chen *et al.*, 2000). In der Analyse der Aminosäurestruktur der humanen sAC zeigte sich, dass diese den Adenylylcyclasen der Blaualgen näher verwandt ist, als den humanen tmAC und anderen eukaryotischen AC (Buck *et al.*, 1999). Gleichzeitig sind sAC, im Gegensatz zu tmAC, in ihrer Lokalisation nicht auf die Zytoplasmamembran beschränkt. Zippin *et al.* konnten 2003 nachweisen, dass sAC sowohl im Nukleus als auch an Mitochondrien vorkommen und damit direkt und gezielt Zellfunktionen beeinflussen kann. Neben den humanen sAC wurden Bikarbonat responsive Adenylylcyclasen auch in Cyanobakterien, *Mycobacterium tuberculosis* und Pilzen beschrieben (Cann *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004), was auf eine evolutionär konservierte und grundlegende Funktion hinweist.

Candida albicans besitzt eine einzelne Adenylylcyclase (*CDC35*, *CYR1*), welche für das Wachstum nur bedingt, für die Filamentation unter verschiedenen Bedingungen jedoch essentiell ist (Rocha *et al.*, 2001; vgl. Abschnitt 1.4.4.). In *cdc35Δ* Nullmutanten konnte in der Arbeit von Rocha keine meßbare Konzentration von cAMP nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass *CDC35* die einzige Adenylylcyclase in *C. albicans* darstellt. Zudem war die Nullmutante in einem murinen Infektionsmodell avirulent, was auf die zentrale Bedeutung dieses Enzyms während der Morphogenese hindeutet.

1.9. Hypothese und Zielsetzung dieser Arbeit

CO_2 stellt in *Candida albicans* ein robustes Umweltsignal dar, welches filamentöses Wachstum induziert. Gleichzeitig kann CO_2 durch das Enzym Carboanhydrase in die intrazellulär prädominant vorkommende Kohlenstoffverbindung HCO_3^- umgewandelt

werden. Ferner wurde gezeigt, dass HCO_3^- spezifisch Adenylylcyclasen aktivieren kann. In diesem Kontext soll in der vorliegenden Arbeit die Hypothese der CO_2 induzierten Morphogenese unter Vermittlung einer Carboanhydrase und einer Adenylylcyclase in *Candida albicans* untersucht werden. Folgende Zusammenhänge sollen verdeutlicht werden:

- Identifikation möglicher Carboanhydrasen in *C. albicans* homolog zu *Saccharomyces cerevisiae* *ScNCE103*.
- Molekulare und funktionelle Charakterisierung der gefundenen Carboanhydrasen *in vitro* sowie *in vivo* durch homozygote Disruption in *C. albicans*.
- Untersuchung der funktionellen Relevanz der gefundenen Carboanhydrasen im Kontext des CO_2 induzierten Polymorphismus.
- Untersuchung der funktionellen Relevanz von Aquaporinen im Kontext des CO_2 induzierten Polymorphismus.
- Klonierung und Expression der katalytischen Domäne der *Cryptococcus neoformans* Adenylylcyclase *CAC1* in *C. albicans* CR276 (*cdc35Δ/cdc35Δ*) zur Klärung einer generellen Bedeutung der fungalen Adenylylcyclase im Kontext des CO_2 induzierten Polymorphismus.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Autoklaven	Classic 2100, Prestige Medical, Blackburn, UK
Brutschränke	Kelvitron t, Heraeus, Hanau, Deutschland Research CO ₂ Incubator, LEEC, Nottingham, UK GP Incubator, Genlab, Widness, UK
Eismaschine	AF 20, Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Elektrophoresekammern	Fisherbrand HU6, HU10, HU13, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK
Elektroporationsgeräte	Bio-Rad Pulse Controller 1652068, Gene Controller 1652077, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK/ Hercules, CA, USA
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette 0,2cm und 0,1cm, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK
Geldokumentationssystem	BioView Gel System Mini, Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Heizblöcke	Dry Block 08-3, Techne, Stone, UK Test Tube Heater SHT 10, Stuart Scientific, Redhill, UK
Hybridisierungsöfen	HB1000 Hybridizer, UVP, Upland, Cambridge, UK
Kühlschrank, Gefrierschrank	4°C, -20°C Whirlpool Compact Combi, USA -80°C New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA
Magnetrührer	SM5, Stuart Scientific, Redhill, UK SWT320, Gallenkamp, Sanyo E&E Europe, Loughborough, UK
Mikroskop	Zeiss West Germany 478028, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera	Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrowelle	M1733N TDS, Samsung, Chertsey, UK
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR-Thermocycler	Primus, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
pH - Meter	Basic Meter PB11, Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Proteinblot - Apparatur	Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK

Proteingelelektrophoresekammer	Criterion Cell, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK
Röntgenfilmentwickler	Compact X4 Xograph Imaging Systems, Tetbury, UK
Röntgenfilmkassette	R2000 18x14 und 24x30, Kodak, USA
Schüttelinkubatoren	Orbital Incubator, Gallemkamp, Sanyo E&E Europe, Loughborough, UK Reciprocal Mixer, Denley, Billingham, UK
Spannungsgeräte	Thermo EC Electrophoresis Power Supply, EC250-90, EC 105, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK
Spektrophotometer	DU 530 Life Science UV/Vis, Beckman Coulter, High Wycombe, UK
Stopped-Flow Technik: Stopped Flow SF-61 DX2 Control Unit Cn61 XnHg Lampe	HI-TECH Scientific, Salisbury, UK
Ultraschall Desintegrator	Soniprep 150, MSE, London, UK
UV Lampe	UVL-28 Assembly Long Wave, Upland, Cambridge, UK
UV – Crosslinker	CL-1000, UVP, Upland, Cambridge, UK
Vortexer	Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA Whirlimixer, Fisons Scientific Apparatus, Loughborough, UK
Waagen	Feinwaage EK 2000, A&D, Tokyo, Japan/ Abingdon, UK CP224S, Satorius AG, Göttingen, Deutschland/ Epsom, UK
Wasserbad/Schüttler	Innova 3100, New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA
Zentrifugen	Microfuge 18, Beckman Coulter, High Wycombe, UK Centaur 1, MSE, London, UK Mikro 200/200R, Hettrich AG, Häch, Schweiz BR 401 refrigerated centrifuge, Denley, Billingham, UK

2.2. EDV

PC mit Scanner und Drucker	Dell Ltd., UK
Redasoft Plasmid 1.1	Redasoft, Toronto, Canada
pDRAW32 1.0	AcaClone Software, www.acaclone.com

Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation, Redmond, USA
KinetAsyst3	HI-TECH Scientific, Salisbury, UK
Graph Pad Prism 3.0	Graph Pad Software, San Diego, USA
Mozilla Firefox 1.0	Mozilla Europe, Paris, Frankreich

2.3. Internetressourcen

Candida Genome Database: http://www.candidagenome.org/
Multialign Interface: http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html
ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server: http://expasy.org/
Fungal Genome Resource: http://gene.genetics.uga.edu/
DNA Manipulation: http://www.vivo.colostate.edu/molkit/manip/index.html
Frameplot: http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl
Kyte-Doolittle Hydrophathy Plot: http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm
NCBI Pubmed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed

2.4. Bezugsfirmen

Chemikalien und Komponenten wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, Warrington, UK	Roche, West Sussex, UK
Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK	Sigma-Aldrich, Gillingham, UK
Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Difco Laboratories, BD Biosciences, Oxford, UK	Invitrogen, Paisley, UK
Eurogentec, Southampton, UK	Jencons, Leighton, UK
Fisher Scientific, Loughborough, UK	Qiagen, Crawley, UK
ICN Biomedicals, Cambridge, UK	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
New England Biolabs, Hitchin, UK	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
Promega, Southampton, UK	Sequenzierungen wurden ausgeführt von: Lark Technologies, Takeley, UK

2.5. Verbrauchsmaterialien

Hybond N und P PVDF Nylonmembranen, Amersham Biosciences, UK
Whatman Papier, Blotting Cellulose, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK

Criterion XT Bis-Tris 4%-12% Precast Protein Gel, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK
Röntgenfilme (ECL Detection Kit) Amersham Biosciences, UK
Elektroporationsküvetten, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK
Criterion XT Sample Buffer, Reducing Agent, MOPS Running Buffer, Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK
Bakterienfilter, Minisart, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
GENBox Generatoren für anaerobe und mikroaerophile Bedingungen, bioMérieux, Frankreich
CO ₂ Gas, BOC Gases, Guilford, UK
Glasskugeln (Durchmesser 4mm), Sigma-Aldrich, Gillingham, UK
Agarplatten (Kochblutagar), BD Biosciences, Oxford, UK

Eppendorfgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml, PCR Reaktionsgefäße 0,2ml, Falcon Rörchen 15ml und 50ml, Schraubgefäße 2ml, Objektträger, Petrischalen, Glaswaren, Pipettenspitzen und Einmalpipetten wurden vom lokalen Laborbedarfsanbieter bezogen.

2.6. Kits

QIAprep Spin MINIPrep Kit, Qiagen	Qiagen RNeasy Kit, Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen	Stratagene PrimeIt Labeling Kit, Stratagene
Qiagen PCR Purification Kit, Qiagen	TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen
QIAquick Gel Purification Kit, Qiagen	

2.7. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden, soweit nicht anders angegeben, von New England Biolabs bezogen. Eine Auflistung der verwendeten Enzyme ist unter 2.21. angeführt. Weiterhin wurden verwendet:

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Roche	RNase I, Invitrogen
T4 DNA Ligase, Roche	DNase I, Invitrogen
Taq DNA Polymerase, Roche	Lyticase, Sigma
Proteinase K, Promega	Mung Bean Nuclease, New England Biolabs
Bovine Carboanhydrase II, Sigma	

2.8. Kulturbedingungen

Candida wurde bei 30°C auf YNB Agar, *E. coli* bei 37°C auf LB Agar gezüchtet. Zur Bebrütung unter einem erhöhten CO₂ Partialdruck wurde Kohlendioxid in einer Konzentration von 5% ± 0,2% zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 4°C aufbewahrt oder mit 25% Glycerin (*Candida*) bzw. 15% Glycerin (*E. coli*) versetzt und bei -80°C verwahrt.

2.9. Nährmedien

LB (lysogeny broth oder Luria-Bertani) Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl in Aqua dest. ggf. Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zur Selektion von plasmidtragenden <i>E. coli</i> Stämmen
SOC Medium	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl 20mM Glucose 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ in Aqua dest.
SOB Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ in Aqua dest.
5-FOA Agarplatten	1,7g YNB (Difco) 1g 5-Fluoroorotsäure (FOA) 50mg Uridin 20g Glucose 5g Ammoniumsulfat

Fortsetzung: 5-FOA Agarplatten	in 500ml Aqua dest. lösen, sterilfiltrieren und anwärmen, 15g Agar in 500ml Aqua dest. autoklavieren und beide Lösungen bei ca. 50°C mischen und in sterile Petrischalen geben.
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	DMEM 13,38g HEPES 35,7g Glucose 15,5g ad 1L Aqua dest. mit NaOH bzw. HCl pH einstellen und steril filtrieren
YEPD	20g Glucose 10g Bactopepton 10g Hefeextrakt in Aqua dest.
YNB Medium	YNB (Difco) nach Angaben des Herstellers
YNB Medium mit Einstellung des pH Wertes	20g Glucose 5g Ammoniumsulfat 35,7g HEPES-Puffer 1,7g YNB (Difco) ad 1L Aqua dest. mit NaOH bzw. HCl pH einstellen und steril filtrieren

Die flüssigen Nährmedien wurden durch den Zusatz von 15g Agar auf einen Liter Medium verfestigt.

Auxotrophe *Candida* Stämme wurden wie folgt supplementiert:

<i>ura3Δ</i> -Uridin Auxotrophie	Stocklösung: 10mg/ml, Endkonzentration im Medium: 25µg/ml Uridin
<i>his1Δ</i> -Histidin Auxotrophie	Stocklösung: 50mg/ml, Endkonzentration im Medium: 20µg/ml Histidin
<i>arg4Δ</i> -Arginin Auxotrophie	Stocklösung: 50mg/ml, Endkonzentration im Medium: 20µg/ml Arginin

E. coli wurde auf das Vorhandensein einer Ampicillinresistenz selektioniert. Dazu wurde Ampicillin (100 µg/ml) dem Medium zugegeben.

2.10. Lösungen und Puffer

10x Lithiumacetat	1M Stocklösung in Aqua dest., pH 7,5
-------------------	--------------------------------------

1x TE	10mM Tris-HCl Buffer pH 8,0 1mM EDTA
20x SSC	3M NaCl 0,3M NaCitrat in Aqua dest., pH 7
DNA Marker	1 kb DNA Ladder, Promega
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Roche) äquimolare Stocklösung zu 10mM in Aqua dest.
DTT	Dithiothreitol, Stocklösung 1M in Aqua dest.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Stocklösung 1M pH 8 in Aqua dest., autoklaviert
EtBr	Ethidiumbromid 10mg/ml Stocklösung
Ethanol	96% und 70%
Glycerin	50% Stocklösung in Aqua dest., sterilfiltriert
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid als Induktor der β -Galaktosidaseaktivität in <i>E. coli</i> , 1M Stocklösung in Aqua dest.
Natriumacetat	NaOAc 3M pH 5,2 zur Fällung von Plasmid DNA
PEG	50% Polyethylenglycol 4000 in Aqua dest.
Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol	im Verhältnis 25:24:1 (vol/vol/vol)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, 100mM Stocklösung in Isopropanol, abgedunkelt bei -20°C gelagert
SDS	(<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) Natriumdodecylsulfat, Stocklösung 20% in Aqua dest.
Sorbitol	Stocklösung 2M in Aqua dest., sterilfiltriert
TB	10mM HEPES 15mM CaCl ₂ 250mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ in Aqua dest.
Tris-HCl Puffer	1M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl in Aqua dest., pH 7,5 und pH 8

Für die Gelelektrophorese DNA:

50x TAE Puffer	2M Tris 100mM EDTA 5,71 Vol% Eisessig in Aqua dest.
6x DNA Blaumarker	50mM Tris pH 8 50mM EDTA 40% Sucrose 1% SDS 0,25% Bromphenolblau in Aqua dest.

Für RNA Arbeiten:

DEPC behandeltes Wasser (DEPC-H ₂ O)	1ml DEPC (Diethyl-Pyrocabonate) in 1000ml Aqua dest. für 12 Stunden auf dem Magnetrührer gemischt und anschließend autoklaviert
10x MOPS Puffer	200mM MOPS (3-N-[Morpholino]propansulfonsäure) 50mM NaOAc 10mM EDTA mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt DEPC-H ₂ O ad 1000ml lichtgeschützt gelagert
5x RNA Blaumarker	650ul Formamide, deionisiert 250ul 100% Glycerol 100ul Bromphenolblau 4ul Ethidiumbromid 1ul DEPC

Für die gDNA Extraktion aus Candida:

Blue Buffer	2% Triton X-100 1% SDS 100mM NaCl 10mM Tris Buffer pH 8,0
-------------	--

Fortsetzung: Blue Buffer	1mM EDTA Aqua dest. ad 50ml
Lyticaselösung	1M Sorbitol 50mM K ₃ PO ₄ pH 7,5 50mM DTT 1500 U/ml Lyticase (Sigma) in Aqua dest.
Lösung 1	50mM EDTA 0,2% SDS in Aqua dest.

Für die *E. coli* gDNA Präparation:

Proteinase K (Promega)	4mg/ml im 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM CaCl ₂
CTAB Lösung	2 % (w/v) CTAB (Cetylhexatrimethylammoniumbromid) 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 20 mM EDTA 1,4 M NaCl

Für die Plasmid-DNA Präparation:

Lösung 1	50mM Glucose 25mM Tris pH 8 10mM EDTA
Lösung 2	0,2N NaOH 1% SDS
Lösung 3	5M KAc 11,5ml Eisessig Aqua dest. ad 100ml

Für den Southernblot:

20x SSC	3M NaCl 0,3M NaCitrat in Aqua dest., pH 7
---------	---

Church Puffer	7% SDS 1% BSA 500mM EDTA 250mM NaPO ₄ pH 7,2 in Aqua dest.
---------------	---

Für die *Candida* LiAc Transformation:

Lösung 1	1x TE 1x LiAc
Lösung 2	1x TE 1x LiAc 40% PEG in Aqua dest.

Für die Lyse von *E. coli* mittels Ultraschall:

Lysepuffer	50mM Tris Puffer pH 7,5 150mM NaCl 5mM DTT 1mM PMSF
------------	--

Für die Stopped – Flow Experimente:

Puffer A	100mM TAPS (N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure) 200mM NaSO ₄ 2mM ZnSO ₄ 2mM MgSO ₄ 200µM m-Kresolpurpur
----------	---

Für den Western Blot:

TBS	20mM Tris 500mM NaCl
-----	-------------------------

Fortsetzung TBS	in Aqua dest., pH 7,5
TTBS	0,2% (vol/vol) Tween-20 in TBS
Blocklösung	5% Trockenmilch in TTBS

2.11. Stämme, Plasmide und Vektoren

2.11.1. *Candida albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Auxo- trophie	Ausgangsstamm	Quelle
SC5314		keine	Wildtyp	Gillum <i>et al.</i> , 1984
CAI4	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434</i>	Uridin	SC5314	Fonzi und Irvine, 1993
CAI4 nce103Δ-URA3	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG- URA3-hisG</i>	keine	CAI4	Diese Arbeit
CAI4 nce103Δ-hisG	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG</i>	Uridin	CAI4 nce103Δ- URA3	Diese Arbeit
CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-URA3	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG- URA3-hisG</i>	keine	CAI4 nce103Δ- hisG	Diese Arbeit
CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG</i>	Uridin	CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-URA3	Diese Arbeit
CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-pSM-2	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/URA3</i>	keine	CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit
CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-NCE103	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG/</i>	keine	CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit

Fortsetzung CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-NCE103	<i>nce103Δ::hisG/ NCE103/URA3</i>			
CAI4 NCE overexpression	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434 nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ TEF2pr::NCE103/ URA3</i>	keine	CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit
CAI4 NCEGFP	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ NCE103/GFP/URA3</i>	keine	CAI4 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit
BWP17	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/ his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG</i>	Uridin, Arginin, Histidin	RM1000	Wilson <i>et al.</i> , 1999
BWP17 nce103Δ	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/ his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG/ nce103::ARG4</i>	Uridin, Histidin	BWP17	Diese Arbeit
BWP17 nce103Δ/ nce103Δ	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/ his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG/ nce103::ARG4/ nce103::HIS1</i>	Uridin	BWP17 nce103Δ	Diese Arbeit
BWP17 nce103Δ/ nce103Δ-pSM-2	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/</i>	keine	BWP17 nce103Δ/ nce103Δ	Diese Arbeit

Fortsetzung BWP17 nce103Δ/ nce103Δ-pSM-2	<i>his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG/ nce103::ARG4/ nce103::HIS1/URA3</i>			
BWP17 nce103Δ/ nce103Δ/ NCE103	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/ his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG/ nce103::ARG4/ nce103::HIS1/ NCE103/URA3</i>	keine	BWP17 nce103Δ/ nce103Δ	Diese Arbeit
BWP17 NCE overexpression	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ his1::hisG/ his1::hisG/ arg4::hisG/ arg4::hisG/ nce103::ARG4/ nce103::HIS1/ TEF2pr::NCE103/ URA3</i>	keine	BWP17 nce103Δ/ nce103Δ	Diese Arbeit
JCO188	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ aqy1Δ::hisG/ aqy1Δ::hisG/URA3</i>	keine		Carbrey <i>et al.</i> , 2001
CR276	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ cdc35Δ::hisG/ cdc35Δ::hisG</i>	Uridin		Rocha <i>et al.</i> , 2001
CR276-F1R1	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ cdc35Δ::hisG/ cdc35Δ::hisG/URA3/ TEF2_{pr}::CAC1₁₈₂₄₋₂₂₇₁</i>	keine	CR276	Diese Arbeit
CR276-F2R1	<i>ura3::λimm434/</i>	keine	CR276	Diese Arbeit

Fortsetzung CR276-F2R1	<i>ura3::λimm434/ cdc35Δ::hisG/ cdc35Δ::hisG/URA3/ TEF2_{pr}::CAC1₁₇₂₁₋₂₂₇₁</i>			
CR276-V	<i>ura3::λimm434/ ura3::λimm434/ cdc35Δ::hisG/ cdc35Δ::hisG/URA3/ TEF2_{pr}</i>	keine	CR276	C. Ruoff, Medizinische Doktorarbeit, Universität Würzburg
CAR26	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/</i>	Uridin	CAR2	Ramon <i>et al.</i> , 1999
CAR26 nce103Δ-URA3	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG- URA3-hisG</i>	keine	CAR26	Diese Arbeit
CAR26 nce103Δ-hisG	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG</i>	Uridin	CAR26 nce103Δ- URA3	Diese Arbeit
CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-URA3	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG- URA3-hisG</i>	keine	CAR26 nce103Δ- hisG	Diese Arbeit
CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG</i>	Uridin	CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-URA3	Diese Arbeit

CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-pSM-2	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/URA3</i>	keine	CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit
CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-NCE103	<i>ura3Δ::λimm434/ ura3Δ::λimm434/ rim101Δ::hisG/ rim101Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ nce103Δ::hisG/ NCE103/URA3</i>	keine	CAR26 nce103Δ/ nce103Δ-hisG	Diese Arbeit

2.11.2. *Cryptococcus neoformans* Stämme

Stamm	Quelle
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC90112 (Serotyp A Referenzstamm)	D. Sanglard, Universität Lausanne

2.11.3. *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> EDCM636	λ ⁻ , Δ <i>fnr</i> -267, Δ <i>can-1::FLK2</i> (kan), <i>rph-1</i>	Merlin <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, UK
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	<i>D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173</i> <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, UK
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Ian Bloomfield, University of Kent, UK

2.11.4. Kommerziell erhältliche Plasmide

Plasmidbezeichnung	Quelle
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, UK

pBluescript II SK(+)	Stratagene, UK
pGEX 6P-2	Amersham Biosciences, UK

2.11.5. Weitere verwendete Plasmide

Plasmidbezeichnung	Charakteristika	Quelle
pCR2.1 BF-NCE2	ORF von <i>CaNCE103</i> mit den Primern NCE-BF und NCE2 amplifiziert	Diese Arbeit
pCR2.1 ΔB	pCR2.1 TOPO Plasmid, deletiert für die singuläre <i>BspHI</i> Schnittstelle (3046)	Diese Arbeit
pFA ARG4	<i>ARG4</i> Kasette tragendes <i>template</i> Plasmid	Gola <i>et al.</i> , 2003
pFA URA3	<i>URA3</i> Kasette tragendes <i>template</i> Plasmid	Gola <i>et al.</i> , 2003
pFA HIS1	<i>HIS1</i> Kasette tragendes <i>template</i> Plasmid	Gola <i>et al.</i> , 2003
pCR2.1 ΔB BF-NCE2	<i>SpeI-NCE103-SpeI</i> Fragment aus pCR2.1 BF-NCE2, ligiert in die <i>SpeI/XbaI</i> Schnittstelle von pCR2.1 ΔB	Diese Arbeit
pMB-7	Plasmid, welches den Ura-Blaster trägt	Fonzi und Irvine, 1993
pNCEX2-Blast	<i>blunt end</i> Ura-Blaster Kasette aus pMB-7 (<i>SalI/BglII</i> Doppelverdau, MBN Verdau) ligiert in die <i>blunt end BspHI</i> Schnittstellen von pCR2.1 ΔB BF-NCE2	Diese Arbeit
pCR2.1 AF-NCE2	ORF von <i>CaNCE103</i> mit den Primern NCE-AF und NCE2 amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pSM-2		El Barkani <i>et al.</i> , 2001
pSM-NCE	Ein 2,6kb <i>SpeI/XbaI NCE103</i> Fragment aus pCR2.1 AF-NCE2 wurde in die <i>SpeI</i> Schnittstelle	Diese Arbeit

Fortsetzung pSM-NCE	von pSM-2 ligiert	
pCR2.1 PstNCEHisTag	ORF von <i>CaNCE103</i> mit den Primern NCE-F-Pst und NCEHisTag amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pCR2.1 TEF2term	5' Terminatorregion des <i>TEF2</i> Gens mit den Primern XmaTef2t-F und PspOMITef2-R amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pBSK PstNCEHisTag	<i>SpeI-NCE103-XbaI</i> Fragment aus pCR2.1 PstNCEHisTag in die <i>SpeI/ XbaI</i> Schnittstellen von pBluescript II SK(+) ligiert	Diese Arbeit
pBSK PstNCEHisTag tef2term	<i>XmaI-TEF2-Terminatoregion-PspOMI</i> Fragment ligiert in die <i>PspOMI/XmaI</i> Schnittstellen von pBSK PstNCEHisTag	Diese Arbeit
pFM-2		Mühlschlegel und Fonzi, 1997
pFM-NCEoverexpression	pFM-2 mit <i>BamHI</i> geschnitten, gebluntet, erneut mit <i>PstI</i> geschnitten und der Vektor aufgereinigt. <i>PstI-NCE103/TEF2-Terminatorfragment-PvuII</i> wurde das aus pBSK PstNCEHisTag tef2term herausgelöst und in den pFM-2 Vektor ligiert	Diese Arbeit
pCR2.1 YadF	<i>E. coli YadF</i> mit den Primern YadF-F und YadF-R von genomischer DNA amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pFM-YadF	<i>NsiI-YadF-BglIII</i> Fragment aus pCR2.1 YadF in die <i>PstI/BamHI</i> Schnittstellen des pFM-2 Vektors ligiert	Diese Arbeit
pCASPh	Humane CAII	Mammalian Gene Collection (MGC), http://mgc.nci.nih.gov/
pFM-hCAII	<i>BglIII-CAII-EcoRV</i> Fragment aus	Diese Arbeit

Fortsetzung pFM-hCAII	pCASPh in die <i>Pst</i> I (blunted)/ <i>Bam</i> HI Schnittstellen von pFM-2 ligiert	
pCR2.1 NCEAgeI	ORF von <i>CaNCE103</i> mit den Primern NCE-AF und CaNCE- RageI amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
yEGFP3	Plasmid, welches das für <i>Candida</i> optimierte <i>GFP</i> Gen (<i>yEGFP3</i>) trägt	Cormack <i>et al.</i> , 1997
pCR2.1 AgeIGFP	ORF von <i>yEGFP3</i> mit den Primern GFP-FAgeI und GFPprev amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pCR2.1 NCEGFP	<i>Age</i> I- <i>NCE103</i> - <i>Xba</i> I Fragment aus pCR2.1 NCEAgeI in die <i>Xba</i> I/ <i>Age</i> I Schnittstellen des präparierten pCR2.1 AgeIGFP Vektors ligiert	Diese Arbeit
pSM-NCEGFP	<i>Spe</i> I NCE-GFP Fragment aus pCR2.1 NCEGFP in die <i>Spe</i> I Schnittstelle von pSM-2 ligiert	Diese Arbeit
pCR2.1 BamNCE	ORF von <i>CaNCE103</i> mit den Primern CaNCE-FBamGEX (ersetzt das Startcodon und enthält eine <i>Bam</i> HI Schnittsstelle) und NCE-BR amplifiziert, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pGEX-NCE	<i>Bam</i> HI- <i>NCE103</i> - <i>Eco</i> RI Fragment aus pCR2.1 BamNCE ligiert in die <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI von pGEX-6P-2 ligiert	Diese Arbeit
pCR2.1 F1R1His	Amplifikation des langen C- terminalen Fragmentes von <i>Cryptococcus neoformans CAC1</i> mit den Primern CnCACF1n und CnCAC1RHis, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pCR2.1 F2R1His	Amplifikation des kurzen C- terminalen Fragmentes von	Diese Arbeit

Fortsetzung pCR2.1 F2R1His	<i>Cryptococcus neoformans CAC1</i> mit den Primern CnCACF2n und CnCAC1RHis, in pCR2.1 TOPO	
pFM-CAC1 F1R1His	<i>SmaI</i> -CAClang- <i>BamHI</i> Fragment aus pCR2.1 F1R1His ligiert in die <i>PstI</i> (gebluntet)/ <i>BamHI</i> Schnittstelle von pFM-2	Diese Arbeit
pFM-CAC1 F2R1His	<i>SmaI</i> -CACkurz- <i>BamHI</i> Fragment aus pCR2.1 F2R1His ligiert in die <i>PstI</i> (gebluntet)/ <i>BamHI</i> Schnittstelle von pFM-2	Diese Arbeit
pCR2.1 F1R1GEX	Amplifikation des langen C-terminalen Fragmentes von <i>Cryptococcus neoformans CAC1</i> mit den Primern CnCACF1 und CnCAC1R, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pCR2.1 F2R1GEX	Amplifikation des kurzen C-terminalen Fragmentes von <i>Cryptococcus neoformans CAC1</i> mit den Primern CnCACF2 und CnCAC1R, in pCR2.1 TOPO	Diese Arbeit
pGEX-CAC-F1	<i>BamHI</i> - <i>CAC1</i> ₁₇₂₁₋₂₂₇₁ - <i>EcoRI</i> Fragment aus pCR2.1 F1R1GEX, ligiert in die <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> Schnittstellen von pGEX- 6P-2	Diese Arbeit
pGEX-CAC-F2	<i>BamHI</i> - <i>CAC1</i> ₁₇₈₂₄₋₂₂₇₁ - <i>EcoRI</i> Fragment aus pCR2.1 F1R1GEX, ligiert in die <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> Schnittstellen von pGEX- 6P-2	Diese Arbeit

2.12. Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient zur Aufreinigung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA sowie der Separation von Enzymen und anderen Proteinen von DNA. Dazu wird die Probe mit einem identischen Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol

(25:24:1) gut gemischt und zur Phasentrennung für 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält die aufgereinigte DNA und kann in ein neues Gefäß überführt, ggf. in einer weiteren Chloroformextraktion gesäubert und anschließend präzipitiert werden.

2.13. Fällung und Präzipitation von DNA und RNA

Zur Fällung von Nukleinsäuren wird die Probe mit dem 3-fachen Volumen eiskaltem 96% Ethanol vermischt. Nach Zugabe von 10% (vol/vol) 3M NaOAc wird das Gemisch für 15 min bei -20°C gelagert. Die Präzipitation erfolgt anschließend durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min. Das Pellet wird folgend mit dem doppeltem Ausgangsvolumen 70% Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipetiert und das Pellet im Heizblock bei 37°C getrocknet. Abschließend kann das Pellet im gewünschten Volumen Aqua dest., TE oder Tris Puffer aufgenommen werden.

2.14. Darstellung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen

Die größenabhängige Darstellung von Nukleinsäurefragmenten in Agarosegelsystemen zählt zu den Standardmethoden zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und RNA-Proben und ist ausführlich beschrieben (Schrumpf, 2002). Die Variation der Agarosegelkonzentration erlaubt eine Auftrennung der Fragmente zwischen 0,1 und 60 kb Größe. Als Standard wurde in dieser Arbeit die Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem 0,8%, RNA Fragmente in einem 1% Agarosegel eingesetzt. Kleinere Fragmente von einer Größe unter 500bp wurden in 2% Agarosegelen dargestellt.

2.14.1. DNA-Gelelektrophorese

Die entsprechende Menge Agarose wird in 1x TAE Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend auf ca. 40°C gekühlt. In der Folge wird die Agarose mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: $0,5 \mu\text{g/ml}$) versehen und in die

entsprechende Elektrophoresekammer gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation wird der Probenkamm entfernt und die Elektrophoresekammer mit 1x TAE Puffer (Laufpuffer) befüllt. Die Proben werden je nach Volumen mit Aqua dest. ergänzt, mit einem entsprechenden Volumen 6x DNA Blaumarker vermischt und in die Geltaschen gegeben. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bei Raumtemperatur und Spannungen zwischen 25V und 130V. Die Laufrichtung wird dabei von den negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der Anode bestimmt. Zur Größenbestimmung wird jeweils ein DNA Größenstandard (z.B. Promega 1kb DNA Ladder, Abb. 2.1) mitgeführt. Der Größenstandard erlaubt zudem aufgrund der bekannten Konzentration

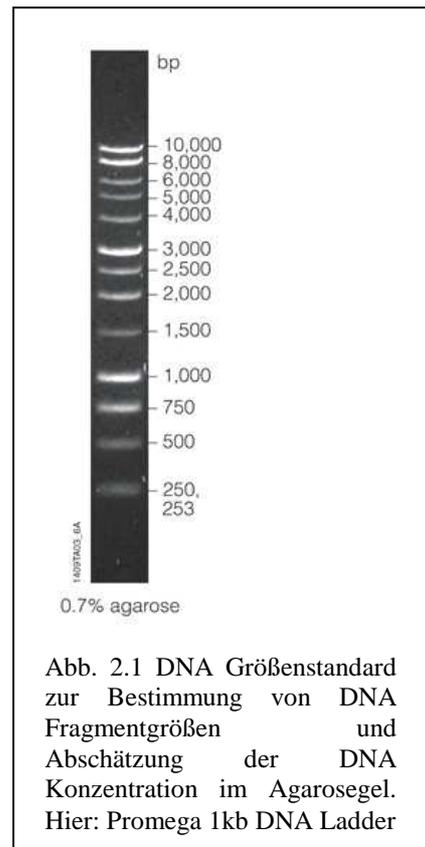


Abb. 2.1 DNA Größenstandard zur Bestimmung von DNA Fragmentgrößen und Abschätzung der DNA Konzentration im Agarosegel. Hier: Promega 1kb DNA Ladder

der Marker-DNA eine Abschätzung der geladenen DNA Menge der Probe. Die durch die interkalierten Ethidiumbromidmoleküle unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente werden elektronisch dokumentiert.

2.14.2. RNA Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNA Fragmenten wird 0,4g Agarose in 34ml DEPC behandeltem Aqua dest. (DEPC-H₂O) in einer Mikrowelle aufgekocht. Nachdem die Agarose auf ca. 50°C abgekühlt ist, werden 4ml 10x MOPS Puffer zugesetzt und gemischt. Die folgenden Arbeiten werden aufgrund der Toxizität der Reagenzien unter einem Abzug durchgeführt. Folgend werden 40µl DEPC und 2ml Formaldehyd (Methanal) zugegeben und gemischt. Nachdem die Agarose auf ca. 40°C abgekühlt ist, wird sie zur vollständigen Polymerisation in eine Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer wird 1x MOPS Puffer verwendet. Die RNA Proben werden mit 5x RNA Blaumarker gemischt und bei 65°C für 10min denaturiert. Nach anschließender Inkubation auf Eis

werden die Proben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 50V und wird anschließend elektronisch dokumentiert.

2.15. Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen

Die selektive Aufreinigung von Fragmenten aus einem Agarosegel wird mittels des Qiagen QIAquick Gel Purification Kit unter Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dazu muss das gewünschte Gelstück vor Anwendung des Kits unter langwelliger UV-Durchleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Das eluierte Produkt wird durch eine erneute Elektrophorese auf korrekte Größe und Menge untersucht. Das hier verwendete Kit wurde ebenso für die Aufreinigung von Fragmenten aus enzymatischen Reaktionen (z.B. PCR-Reaktionen, radioaktive Markierung von DNA-Sonden) benutzt.

2.16. Gewinnung genomischer DNA aus *Candida albicans*

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Hefezellen können verschiedene Protokolle angewendet werden, die sich u.a. in der Menge der gewonnenen gDNA unterscheiden. Genügen geringe gDNA Mengen z.B. für PCR-Arbeiten kann eine mechanische Aufspaltung der Hefezellen mittels Glaskugeln erfolgen. Werden größere Mengen gDNA benötigt, empfiehlt sich eine enzymatische Aufspaltung der Hefezellwand.

2.16.1. Mechanische Aufspaltung der Hefezellwand mit Glaskugeln

Unter sterilen Bedingungen wird eine Hefezellkultur in 15ml YEPD bei 30°C über Nacht bebrütet. Am Folgetag werden die Zellen zentrifugiert und das entstandene Pellet in 1ml Blue Buffer resuspendiert. Die Suspension wird in drei 2ml Eppendorfgläser unter Zugabe von ca. 0.3g Glaskugeln und 500µl Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25: 24: 1) aufgeteilt. Anschließend werden die Hefezellen durch Vortexen mechanisch aufgespalten. Dabei wird die Suspension im viermaligen Wechsel für 30 sec gevortext

und für 30 sec auf Eis gekühlt. Der dabei entstandene Zelldetritus wird bei 14000 rpm für 3 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wird ein gleiches Volumen eiskalter 96% Ethanol und 10% (vol/vol) 3M NaOAc zugegeben und vorsichtig gemischt, dabei wird die präzipitierte DNA als diskrete Trübung sichtbar. Die gewonnene DNA wird bei 14000 rpm für 15 min gefällt und mit 400µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird im Heizblock bei 37°C getrocknet und anschließend in 100µl TE resuspendiert.

2.16.2. Enzymatische Aufspaltung der Hefezellwand mit Lyticase

Unter sterilen Bedingungen wird eine Hefezellkultur in 15ml YEPD bei 30°C über Nacht angezchtet. Am Folgetag werden die Zellen zentrifugiert, mit 1ml 1M Sorbitol gewaschen und in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wird erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml Lyticaselösung resuspendiert. Die Suspension wird folgend bei 37°C unter Schütteln für 90 min inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und in 1ml 1M Sorbitol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 800µl Lösung 1 aufgenommen, 1ml Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wird im Anschluss für 5 min bei 6000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgen zwei Phenolextraktionen und eine Chloroformextraktion, deren wässriger Überstand zu Aliquots von 400µl in Eppendorfgefäße überführt wird. Zur Fällung wird 1ml eiskalter 96% Ethanol zugegeben und die DNA bei 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 500µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird nach dem Trocknen in 100µl TE oder Aqua dest. aufgenommen. Zusätzlich kann die enthaltene RNA durch Zusatz von 1µl/ml RNase I eliminiert werden.

2.17. Gewinnung von Gesamt-RNA aus *Candida albicans*

Alle für RNA Arbeiten benötigten Materialien werden – soweit möglich – vor der Benutzung in 0,2N NaOH für zwei Stunden eingelegt und gesäubert bzw. mit DPEC-H₂O gespült oder doppelt autoklaviert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans* wurde das Qiagen RNeasy Kit verwendet. Unter sterilen Bedingungen wird eine Hefezellkultur in 50ml YNB bei 37°C über Nacht angezüchtet. Am Folgetag werden 1×10^9 Zellen in 50ml YEPD Medium überführt und unter den gewünschten Bedingungen ($\pm 5\%$ CO₂) induziert. Die Induktion erfolgt bei 37°C für drei Stunden. Anschließend wird die Suspension bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 5ml verworfen. Die Zellen werden in der Folge in eine Schale mit flüssigem Stickstoff gegeben, mittels Mörser aufgebrochen und in drei 2ml Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wird 1ml RLT Puffer zugegeben und das Zellmaterial resuspendiert. Die Suspension wird in der Folge in Aliquots zu 700µl über eine QiaShredder Säule homogenisiert und in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von einem halben Volumen 70% Ethanol wird die Probe auf die RNeasy Säulen geladen und nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.18. Gewinnung genomischer DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* wird eine Kolonie des Stammes MG1655 unter sterilen Bedingungen in LB Medium angeimpft. Am Folgetag werden 567µl Zellsuspension mit 30µl 10% SDS und 3µl Proteinase K (4mg/ml Stammlösung) versetzt und für 2 Stunden bei 65°C inkubiert. Im Anschluss werden 100µl 5M NaCl zugefügt und vorsichtig gemischt, gefolgt vom Zusatz von 80µl CTAB Lösung. Der Ansatz wird anschließend erneut bei 65°C für 10min inkubiert. Folgend wird eine äquivalente Menge Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gut vermischt und für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit einer äquivalenten Menge Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10000 rpm für 5 min wird die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 0,6

Volumen Isopropanol vermischt. Die DNA wird im Anschluss durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 rpm sedimentiert. Das Pellet wird mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die DNA wird abschließend in 20µl Tris pH 7,5 resuspendiert.

2.19. Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Der das gewünschte Plasmid tragende *E. coli* Stamm wird unter sterilen Bedingungen und Selektionsdruck (Ampicillin) in LB Medium angeimpft und über 12 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Aufreinigung von Plasmid DNA wurde das Qiagen QIAprep Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Eine weitere, einfache und kostengünstige Methode ist die Präparation einer 1,5ml Bakterienkultur, die bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert wird. Anschließend wird das Pellet in 100µl Lösung 1 aufgenommen, resuspendiert und mit 200µl Lösung 2 versetzt. Die Probe wird für 10 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 150µl Lösung 3 und vorsichtiges Vermischen wird die Probe bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der anschließend gewonnene Überstand wird gefällt und später in 25µl Aqua dest. aufgenommen.

2.20. Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus einem Pool von Gesamt RNA wird das Invitrogen SuperScript III reverse Transkriptase Kit anhand des Herstellerprotokolls verwendet. Die extrahierte Gesamt RNA wird vor Verwendung durch einen DNaseI Verdau für gDNA depletiert. In dieser Arbeit wird 1µl oligo(dT)₂₀ Primer (50µM Stocklösung) mit ca. 1µg Gesamt RNA (in 11µl Volumen) und 1µl eines 10mM dNTP Mix vermischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf Eis gekühlt und 4µl 5x First-Strand Buffer, 1µl 0,1M DTT, 1µl RNaseOUT und 1µl SuperScript III zugegeben. Nachfolgend wird das Gemisch bei 50°C für 60 min inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 15min bei 70°C gestoppt.

2.21. Restriktionsverdau

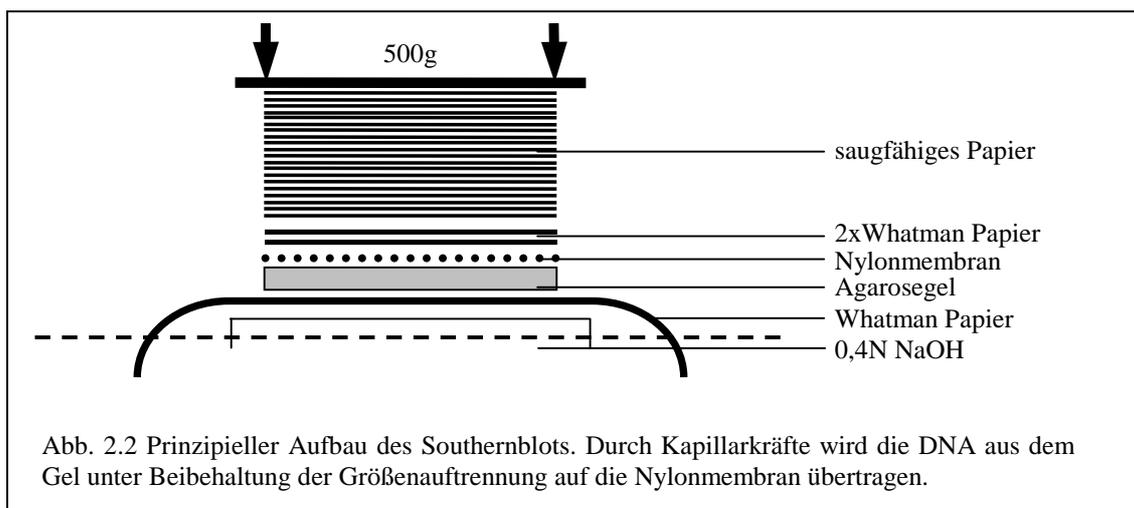
Restriktionsendonukleasen schneiden DNA selektiv an einer definierten Basenfolge. Sämtliche Verdauere werden in einem Volumen von 50µl angesetzt, wobei der vom Hersteller angegebene Puffer (ggf. mit BSA) verwendet wird. Es werden 10 – 20 U Enzym zugesetzt und der Verdau für mindestens 2 Stunden bei dem angegebenen Temperaturoptimum inkubiert. Der Verdau wird anschließend durch Hitzeinaktivierung über 20 min, Phenolextraktion oder durch Separation in einem Agarosegel gestoppt. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Enzym	Herkunft	Sequenz der Schnittstelle	Puffer und Reaktionstemperatur und Hitzeinaktivierung
<i>Age</i> I	<i>Ruegeria gelatinovora</i>	5'-ACCGG-3' 3'-TGGCCA-5'	NEBuffer 1 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	NEBuffer <i>Bam</i> HI + BSA bei 37°C, keine Hitzeinaktivierung
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	5'-AGATCT-3' 3'-TCTAGA-5'	NEBuffer 3 bei 37°C, keine Hitzeinaktivierung
<i>Bse</i> RI	<i>Bacillus species</i> R	5'-GAGGAG(N) ₁₀ -3' 3'-CTCCTC(N) ₈ -5'	NEBuffer 2 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Bsp</i> HI	<i>Bacillus species</i>	5'-TCATGA-3' 3'-AGTACT-5'	NEBuffer 4 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 64°C
<i>Dpn</i> I	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	CH ₃ 5'-GATC-3' 3'-CTAG-5' CH ₃	NEBuffer 4 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 80°C
<i>Eco</i> RI	<i>E. coli</i> RY13	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	NEBuffer <i>Eco</i> RI bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Eco</i> RV	<i>E. coli</i>	5'-GATATC-3' 3'-CTATAG-5'	NEBuffer3 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 80°C
<i>Nco</i> I	<i>Nocardia corallina</i>	5'-CC ^C / ₆ GG-3' 3'-GG ^G / ₆ CC-5'	NEBuffer 4 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Nde</i> I	<i>Neisseria dentrificans</i>	5'-CATATG-3' 3'-GTATAC-3'	NEBuffer 4 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Nhe</i> I	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>	5'-GCTAGC-3' 3'-CGATCG-5'	NEBuffer 2 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otditis-caviarum</i> (ATCC 14630)	5'-GCCGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'	NEBuffer 3 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Nsi</i> I	<i>Neisseria sicca</i>	5'-ATGCA ^T -3' 3'-TACGTA-5'	NEBuffer 3 bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Psp</i> OMI	<i>Pseudomonas species</i>	5'-GGGCCC-3' 3'-CCCCGG-5'	SEBuffer Y bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C

<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	NEBuffer 3 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 80°C
<i>Pvu</i> I	<i>Proteus vulgaris</i>	5'-CGATCG-3' 3'-GCTAGC-5'	NEBuffer 3 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 80°C
<i>Pvu</i> II	<i>Proteus vulgaris</i>	5'-CAGCTG-3' 3'-GTCGAC-5'	NEBuffer 2 bei 37°C, keine Hitzeinaktivierung
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	5'-GTCGAC-3' 3'-CAGCTG-5'	NEBuffer 3 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	NEBuffer 4 bei 25°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Spe</i> I	<i>Shaerotilus species</i>	5'-ACTAGT-3' 3'-TGATCA-5'	NEBuffer 2 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'-TCTAGA-3' 3'-AGATCT-5'	NEBuffer 2 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C
<i>Xma</i> I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	NEBuffer 4 + BSA bei 37°C, Hitzeinaktivierung bei 65°C

2.22. Southern-Blot

Nach einem Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen wird 10µg genomische DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation des Agarosegels erfolgt unter Zuhilfenahme eines Lineals, um die Fragmentgröße auf der Nylonmembran später mit dem Agarosegel vergleichen zu können. Das Agarosegel wird anschließend in 0,2M HCl für 15 min gewaschen, mit Aqua dest. gespült und erneut für 15 min in 0,4N NaOH gewaschen, dabei wird die DNA denaturiert. Anschließend erfolgt der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (*‚blot‘*). Der Aufbau und Prinzip des Southernblots ist in Abb. 2.2 dargestellt.



Nach erfolgreichem Blot über Nacht wird die Nylonmembran getrocknet und die DNA durch UV-Licht kovalent mit der Membran verbunden (*,crosslinken'*).

2.23. Northern-Blot

Alle für RNA Arbeiten benötigten Materialien werden – soweit möglich - vor der Benutzung in 0,2N NaOH für zwei Stunden eingelegt und gesäubert bzw. mit DPEC-H₂O gespült oder doppelt autoklaviert. Das Prinzip des Northernblots, bei dem RNA aus einem Gel auf eine Nylonmembran übertragen wird, ist dem des Southernblot gleich, jedoch wird das Gel nach der Elektrophorese lediglich 2x20 min in Aqua dest. gewaschen, da die RNA bereits denaturiert ist. Der Aufbau des Blots entspricht dem des Southernblots, es wird jedoch 6x SSC Transferpuffer verwendet. Nach dem Transfer über Nacht erfolgt das *,crosslinken'* der Nylonmembran unter UV-Licht.

2.24. Radioaktive Hybridisierungen

Arbeiten mit radioaktiven Materialien wurden in einem für diese Zwecke eingerichteten Labor durchgeführt. Die erforderlichen Sicherheitsbestimmungen der University of Kent, England wurden dabei strikt eingehalten.

Ein geeignetes DNA Fragment wird unter Verwendung des Random PrimeIt Labeling Kits (Stratagene) nach Angaben des Herstellers radioaktiv mit dCTP^{32*} markiert. Die Aufreinigung des jetzt aktiven Fragmentes erfolgt mit dem PCR Purification Kit (Qiagen). Vor der eigentlichen Hybridisierung wird die Sonde bei 95°C für 10 min denaturiert. Die Nylonmembran wird vor der Hybridisierung für 2 Stunden in Church Puffer bei 65°C inkubiert. Ein Rest von ca. 10ml Puffer wird belassen und die radioaktiv markierte und denaturierte Sonde in die Hybridisierungstrommel gegeben. Die Hybridisierung erfolgt unter fortlaufender Bewegung bei 65°C über Nacht. Am Folgetag wird die Membran mit 2x SSC Puffer gewaschen und erneut mit 2x SSC Puffer bei 65°C für 15 min inkubiert. Im Anschluss wird die Membran in Folie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette fixiert. Im Dunkelraum wird dann ein

Röntgenfilm platziert, der zwischen 6 und 12 Stunden exponiert wird. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt automatisiert.

2.25. Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dem Vervielfachen selektiver Nukleotidsequenzen unter Einsatz einer rekombinanten, hitzestabilen DNA Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Analog zur natürlichen Replikation wird ausgehend von synthetischen Oligonucleotiden (Primer) ein neuer, komplementärer DNA Strang synthetisiert. Durch die Wiederholung dieses Vorgangs wird die Nucleotidvorlage exponentiell amplifiziert (Schrimpf, 2002, Sambrook *et al.* 1989). Nachfolgend ist ein typischer PCR Ansatz beschrieben:

Template-DNA	1µl (entspricht 0,1 – 15ng Plasmid-DNA bzw. 0,1 – 250ng gDNA)
Upstream primer	0,5µl einer 100pmol/µl Stocklösung
Downstream primer	0,5µl einer 100pmol/µl Stocklösung
10x Reaktionspuffer (mit MgCl ₂)	5µl
dNTP Mix	1µl einer 10mM Stocklösung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Taq DNA Polymerase (Roche)	0.5µl (entspricht 2,5U/L)
Aqua dest.	ad 50µl

Das Reaktionsvolumen beträgt im Idealfall 50µl. Je nach Protokoll kann die Menge an MgCl₂ zwischen 1,5 – 5 mM variiert werden. Die Annealingtemperatur (T_m) wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$T_m = 81,5 + 41 \times \frac{GC}{n} - \frac{675}{n}$$

Ein möglicher Amplifikationszyklus im Thermocycler ist nachfolgend beschrieben:

Initiale Denaturierung (Aufbrechen der Doppelstrang DNA)	94°C	5 min	} 30 Zyklen
Annealing (Anlagerung der Oligonucleotide and die Matrize)	55°C	1 min	
Elongation (Synthese des komplementären DNA Stranges)	72°C	1-3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	4°C	~	

In dieser Arbeit wurden folgende Primer verwendet (Angaben der Oligonukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung):

Primername	Sequenz
NCE-BF	5' – GTGACTCTACTTACGTCAATACTTAC – 3'
NCE2	5' – GGCTAGTGGATGTGCCACTAA – 3'
S1-NCE (biomers.net GmbH, Ulm)	5' – GATCTTGTACTGAAAAAGATCAATCATTATTACTTGATAATAA TAACAACCTAAACGGGATGAATAATACCATTAAAACTCATCCGG TACGTGTTAGTTCGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTC – 3' Unterstrichen ist die zum Selektionsmarker homologe Sequenz
S2-NCE (biomers.net GmbH, Ulm)	5' – CCTCAAATTCATCTTGAGGAATCTCTACTTGAGATAAATAACCA GTTGCCACATCATATAACATCCCCAACTTCAATTTTCATTCTTC TTTAATGCAACTCTGATATCATCGATGAATTCGAG – 3' Unterstrichen ist die zum Selektionsmarker homologe Sequenz
NCE-AF	5' – CATCATCTTGAATAGGTGGACTAG – 3'
NCE-R	5' – GTACAAGAATAGTTTTGG – 3'
NCE-F-PstI	5' – TAT <u>CTGCAGAT</u> GGGTAGAGAAAATATTTTGAAATATCAATTG – 3' Unterstrichen ist eine <i>PstI</i> Schnittstelle
NCEHisTag	5' – TTAATGGTGATGGTGATGGTGATGAAGGTTATATTCTTCTTCAT CATG – 3' Unterstrichen ist ein 6x <i>His-Tag</i>
XmaI-Tef2t-F	5' – TA <u>ACCCGGGACTA</u> ATTAATACCTTTGTTTAAATAGTTGTG – 3' Unterstrichen ist eine <i>XmaI</i> Schnittstelle
PspOMITef2t-R	5' – AT <u>AGGGCCCTT</u> GGAATCAATAACGTGTGTTGGAG – 3' Unterstrichen ist eine <i>PspOMI</i> Schnittstelle

CaNCE-RAgeI	5' – <u>ATTACCGGTATGAGGGTTATATTCTTCTTCATCATG</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>AgeI</i> Schnittstelle
YadF-F	5' – CATATGAAAGACATAGATACACTCATCAGC – 3'
YadF-R	5' – AGATCTATTTGTGGTTGGCGTGTTTCA – 3'
GFP-FAgeI	5' – <u>ACCGGTGGCGGTTCTAAAGGTGAAGAATTATTC</u> ACT – 3' Unterstrichen ist eine <i>AgeI</i> Schnittstelle
GFPprev	5' – TTATTTGTACAATTCATCCATACCATGG – 3'
CaNCE-F BamGEX	5' – <u>GGATCCGGTAGAGAAAATATTTTGAAATATCAATTGG</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>BamHI</i> Schnittstelle
NCE-BR	5' – CTTGCATATTATGCAATTGGACGTTAG – 3'
CnCAC1Fn	5' – <u>CCCGGGACCTGCAGGATGCTTTCGAAGAGACACGATCCC</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>SmaI</i> Schnittstelle und ein artifizuell eingefügtes Startcodon (ATG)
CnCAC2Fn	5' – <u>CCCGGGACCTGCAGGATGTTTGCAATTTTCGTACGGAGCC</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>SmaI</i> Schnittstelle und ein artifizuell eingefügtes Startcodon (ATG)
CnCAC1RHis	5' – <u>GGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTATCGCGTTCTCTTCATC</u> TTTCC – 3' Unterstrichen ist eine <i>BamHI</i> Schnittstelle und ein 6x <i>His-Tag</i>
CnCAC1F	5' – <u>GGATCCACCTGCAGGCTTTCGAAGAGACACGATCCC</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>BamHI</i> Schnittstelle
CnCAC2F	5' – <u>GGATCCACCTGCAGGTTTGCAATTTTCGTACGGAGCC</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>BamHI</i> Schnittstelle
CnCAC1-R	5' – <u>GAATTCGGATCCTCATATCGCGTTCTCTTCATCTTTCC</u> – 3' Unterstrichen ist eine <i>EcoRI</i> Schnittstelle

2.26. Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation von DNA Fragmenten wird T4 DNA Ligase (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Steigerung der Effizienz wird der Vektor mittels SAP (Roche) dephosphoryliert, das zu ligierende DNA Fragment (*insert*) durch eine Phenolextraktion aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und in Aqua dest. resuspendiert. Nach der Ligation erfolgt die Transformation in kompetente *E. coli* Zellen.

2.27. Dephosphorylierung von DNA Enden

Nach Restriktionsverdauen mit einem einzelnen Enzym besitzen die freiliegenden 5' Enden der Schnittstellen Phosphatgruppen, die bei einer Ligation die Religation des Vektors ohne *insert* ermöglichen. Die terminale Phosphatgruppe am 5' Ende wird daher mittels Alkalischer Phosphatase vom Schimp (SAP) (Roche) nach Angaben des Herstellers entfernt. Im Anschluss wird die SAP hitzeinaktiviert und die Reaktion mittels Phenolextraktion aufgereinigt.

2.28. Herstellung stumpfer Fragmentenden (blunten)

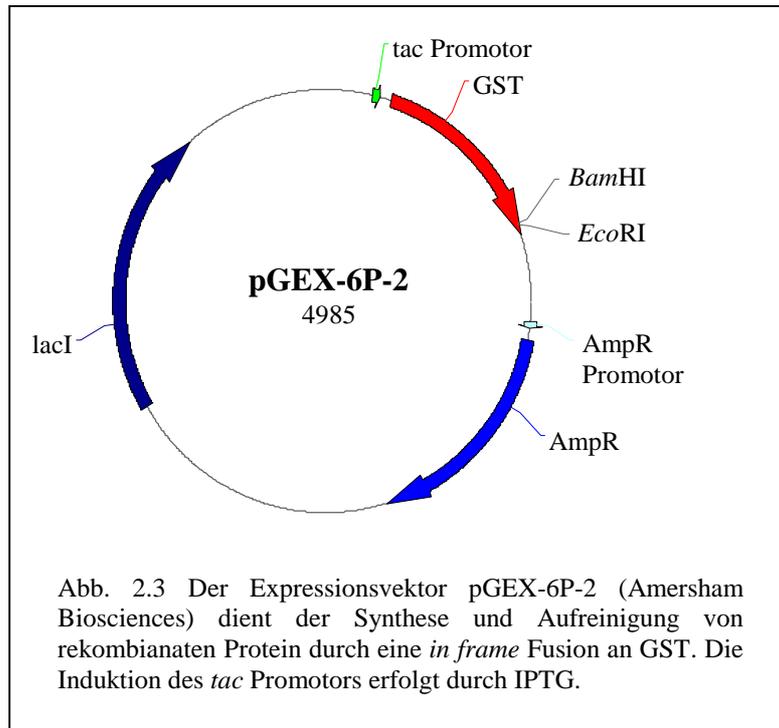
Nach Restriktionsverdau von Plasmid-DNA können die Überhänge am 3' bzw. 5' Enden der Schnittstellen (*sticky ends*) entfernt und in stumpfe Fragmentenden (*blunt ends*) überführt werden. Dazu wird Mung Bean Nuclease (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wird anschließend durch eine Phenolextraktion aufgereinigt.

2.29. Präparation von *E. coli* Zellysaten mittels Ultraschall zur Gesamtproteingewinnung

Die Zellkultur wird für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in eisgekühltem Lysepuffer im Verhältnis 1:3 resuspendiert. Die Suspension wird dann für 10 min auf Eis gekühlt und nachfolgend mit 10µl PMSF Stocklösung pro ml Zellsuspension versetzt. Die Zellen werden im Anschluss in Intervallen von 30 sec für 10 sec per Ultraschall lysiert. Dieser Vorgang wird 10fach wiederholt, wobei auf eine durchgehende Kühlung des Lysats zu achten ist. Der anfallende Zelldetritus wird durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm sedimentiert. Der Überstand wird für die Proteinisolierung verwendet.

2.30. Aufreinigung von Proteinen mittels GST und Glutathion Sepharose

Zur gezielten Synthese rekombinanten Proteins kann das Zielprotein durch Fusion an GST (Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum*), Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus und anhand affinitätschromatographischer Methoden aufgereinigt werden. Das offene Leseraster wird ohne

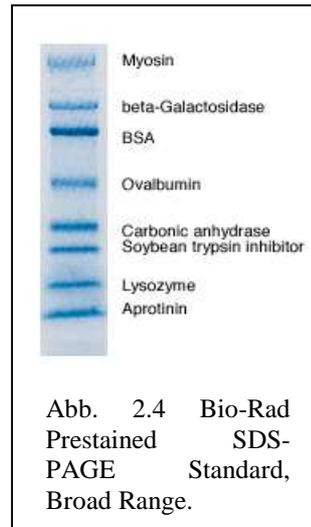


Startcodon, durch eine ‚*in frame*‘ Fusion an GST in den hier verwendeten Vektor pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences, Abb. 2.3) integriert. Das entstandene Fusionsgen wird im Anschluss sequenziert, um eine korrekte Fusion zu bestätigen. Zur optimalen Expression wird der Vektor in den *E. coli* Stamm BL21(DE) (Invitrogen) überführt. Orientierend kann man von 2,5µg Fusionsprotein pro ml Kultur ausgehen. Die gewünschte Menge LB-Selektivmedium wird mittels einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 30°C unter heftigem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 inkubiert. Anschließend wird die Expression unter Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) induziert. Nach 3 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mittels Ultraschall lysiert. Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences) wird nach Angaben des Herstellers in Säulen präpariert. Die Reinigung und Elution des Proteins wird bei 4°C nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

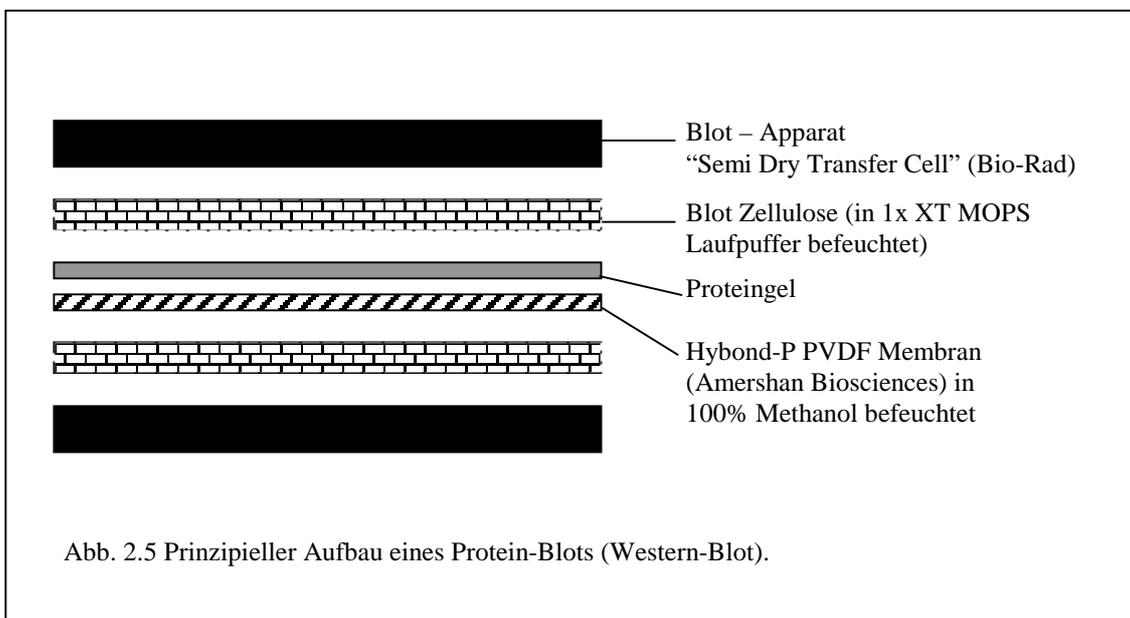
2.31. SDS-PAGE und Western-Blot

Die Konzentration des aufgereinigten GST-Fusionsprotein bzw. des Proteingehaltes im nativen Lysat wird anhand einer BSA Standardkurve im Spektrophotometer bei einer

Wellenlänge von 280nm orientierend bestimmt. Die Proben werden im Idealfall auf 45µg Protein in 15µl Aqua dest. verdünnt, mit 5µl 4x XT Sample Buffer und 1µl 20x XT Reducing Agent versetzt und auf Eis gekühlt. Im Anschluss werden die Proben für 5min bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Für die Proteinauftrennung im Gel (SDS-PAGE) wird das Criterion XT Bis-Tris 4%-12% Precast Gelsystem (Bio-Rad) mit 1x XT MOPS Laufpuffer verwendet. Nachdem die Proben zu 20µl aufgetragen sind, werden die Proteine im horizontalen Trennverfahren bei



145V aufgetrennt. Dabei wird ein Größenmarker (Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range, Bio-Rad, Abb. 2.4) mitgeführt. Zum Transfer der Proteine auf eine Membran wird das Gel im Anschluss aus der Kammer herausgenommen. Die PVDF Membran (Hybond-P PVDF, Amersham Biosciences) wird in 100% Methanol befeuchtet, unter das Gel geschoben und der Blot, wie in Abb. 2.5 dargestellt, aufgebaut. Die Proteine werden für 2 Stunden bei 15V und 400mA übertragen („geblottet“).

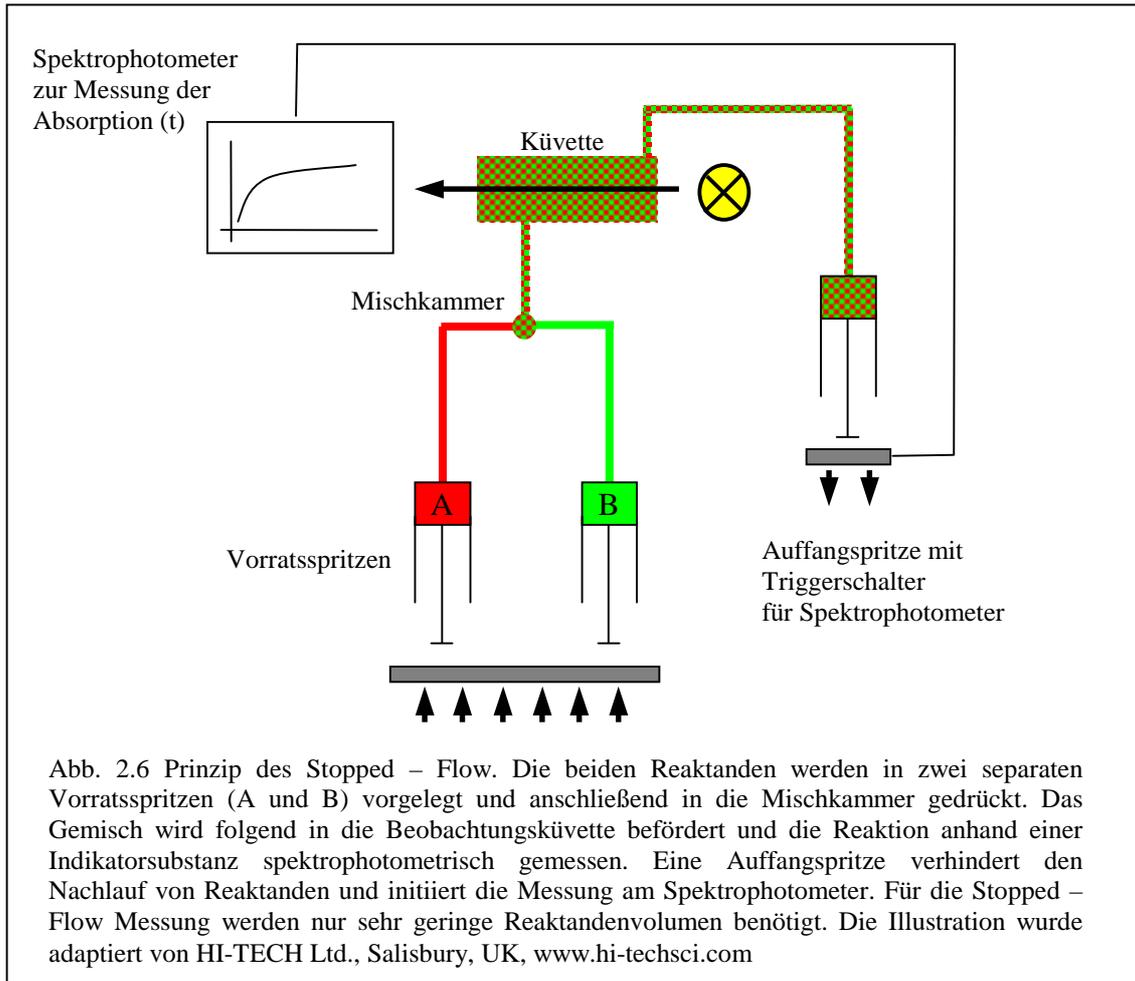


Im Anschluss können die Proteine durch Immunodetektion oder Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. 1g Coomassie – Blau (Coomassie Blue R-250, Bio-Rad) wird dazu in 400ml 100% Methanol und 100ml Essigsäure und 500ml

Aqua dest. gelöst. Die Membran (ggf. auch das native Proteingel) wird über Nacht in 100ml Coomassie Lösung unter Bewegung gefärbt und am Folgetag entfärbt (Lösung wie beschrieben, jedoch ohne Coomassie – Blau). Mittels der Coomassie Färbemethode werden unspezifisch alle Proteine angefärbt. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 0,1 – 2µg Protein. Eine weitaus sensitivere und spezifischere Methode ist die Detektion von Proteinen durch eine Antigen – Antikörper – Reaktion (Immunodetektion). Nach dem Blot werden die freien Bindungsstellen der Membran durch die Inkubation der Membran in Blocklösung für 2 Stunden besetzt. Die Blocklösung wird verworfen und die Membran zweimalig für 5 min in 1x TTBS gewaschen. Anschließend wird ein anti-GST-HRP Antikörper (Amersham Biosciences) in einer 1:5000 Verdünnung in 1% Milch - TTBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nachfolgend wird die Membran für 15 min in TTBS gewaschen. Der anti-GST Antikörper ist an *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt, welche 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) spezifisch zu einem braunen Farbstoff umsetzt und damit die GST-Proteine selektiv darstellt.

2.32. Stopped – Flow Enzymkinetik

Enzymatische Reaktionen können im Bereich von Millisekunden ablaufen und sind daher nur spezifischen Untersuchungsmethoden zugänglich. Die am häufigsten benutzte Technik, schnelle Enzymkinetiken zu untersuchen ist Stopped – Flow (Gibson und Milnes, 1964; Chance 2004). Dabei ist es essentiell, während der Reaktion eine möglichst hohe Anzahl an Messzeitpunkten zu generieren. Ebenso sollte die Mischung der Reaktionspartner abgeschlossen sein, bevor die Reaktion abgelaufen ist. Das Prinzip des Stopped - Flow beruht auf folgenden Schritten: Kleine Mengen zweier Reaktionspartner in Lösung werden innerhalb von msec in eine Misch- und Beobachtungskammer gedrückt und die Reaktion bis zum Erreichen des chemischen Gleichgewichts beobachtet und mit entsprechenden Modellen ausgewertet. Der Vorteil dieser Technik besteht in der sehr geringen Totzeit der Apparatur (je nach Hersteller im Bereich von msec, diese sollte kürzer als die Halbwertzeiten der betrachteten Reaktionen sein), und die Möglichkeit, enzymatische Reaktionen ebenfalls im (vielfach hochinteressanten) Bereich von msec zu beobachten.



Durch Messung der Fluoreszenz bzw. der Absorption einer Indikatorsubstanz ist es möglich, die Reaktion spektroskopisch zu quantifizieren (Abb. 2.6). Carboanhydrasen gehören zu den schnellsten bekannten Enzymen, die Konversion von CO_2 zu HCO_3^- erfolgt innerhalb von Sekunden. Als Reaktionslösungen wurden in dieser Arbeit CO_2 gesättigtes Wasser (durch 5minütiges Einblasen von CO_2 in Aqua dest.) und Puffer A zu gleichen Volumina verwendet. Bei der Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- und entsprechender Änderung des pH – Wertes der Reaktion, verändert m-Kresolpurpur sein Farbspektrum von Purpur zu Gelb und damit die Absorption bei 578nm im Spektrophotometer, was graphisch dargestellt wird.

2.33. Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Eine Kolonie XLI-blue MRF' (Stratagene) wird steril in 50ml LB Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Starterkultur wird am Folgetag in einem Liter LB Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Kultur wird anschließend für 30 min auf Eis gekühlt und in der Folge bei 3500 rpm, 4°C über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 50-100ml Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von einem Liter Aqua dest. gelöst und die Suspension auf Eis gekühlt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei den vorher beschriebenen Bedingungen, wird das Pellet in 500ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 40ml Aqua dest., versetzt mit 10% Glycerol, gelöst. Die Suspension wird in 50ml Falcon Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 2ml 10% Glycerol in Aqua dest. aufgenommen und Aliquots zu 80µl bei -80°C aufbewahrt.

2.34. Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Eine Kolonie XLI-blue MRF' (Stratagene) wird steril in 50ml SOB Medium angeimpft und über 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Kultur wird anschließend für 10 min auf Eis gekühlt und in der Folge bei 3000 rpm, 4°C über 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 40ml TB gelöst und die Suspension für 10 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation werden die Zellen in 10ml TB aufgenommen und DMSO bis zu 7 Vol% vorsichtig zugegeben. Nach 10 min Kühlung auf Eis werden die Zellen zu Aliquots von 80µl pipettiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Zellen erfolgt bei -80°C.

2.35. Klonierung von PCR Fragmenten mittels Invitrogen TOPO TA Cloning

Die *Taq* Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, die ein einzelnes Deoxyadenosin (A) an das 3' - Ende des synthetisierten PCR-Produktes hinzufügt. Der TA TOPO Vektor bietet komplementär ein einzelnes 3' Deoxythymidin (T), welches

dem PCR Fragment eine hocheffiziente Ligation in diesen Vektor ermöglicht. Die Verwendung erfolgte laut Herstellerangaben. Zur Steigerung der Effizienz wird die PCR Reaktion mit 0,5µl (10 U/L) *DpnI* versetzt, für 1 Stunde in 37°C inkubiert und anschließend hitzeinaktiviert, wodurch sämtliche methylierten DNA Fragmente der Template-DNA geschnitten wurden und damit die erfolgreiche Integration der PCR Fragmente in den Vektor gesteigert wurde. Im Anschluss wurde das pCR2.1-TOPO Konstrukt mittels Elektroporation bzw. Hitzeschocktransformation in *E. coli* TOP10 Stämme transformiert und nach Herstellerangaben weiterbehandelt.

2.36. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation und Hitzeschock

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode um Plasmid-DNA in das Zytoplasma elektrokompetenter *E. coli* Zellen einzubringen. Eine Standardreaktion setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

elektrokompetente Zellen	40µl
Plasmid	1µl DNA/ Ligationsmix (entspricht bei Plasmid-DNA 10ng, bei Ligationsmix 200ng)
Aqua dest.	9µl

Die DNA wird vorsichtig den bei -80°C gelagerten und auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen zugesetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz in die eisgekühlten Elektroporationküvetten (0,1 cm, Bio-Rad) überführt und unter den folgenden Bedingungen elektroporiert: Spannung: 1,5 kV, Widerstand 200 Ohm, Kapazität 25µF. Die Zellen werden im Anschluss unmittelbar in 500µl SOC Medium aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, welches bei 37°C für 1 h im Schüttler inkubiert wird. Anschließend erfolgt die Selektion auf entsprechendem Nährmedium.

Eine weitere, weniger effiziente, jedoch simplere Methode ist die Transformation chemisch kompetenter Zellen mittels Hitzeschock. Der Transformationsansatz ist prinzipiell gleich, die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen ersetzen die elektrokompetenten Zellen. Nachdem die Plasmid-DNA vorsichtig den eisgekühlten Zellen zugegeben wurde, wird der Ansatz für 30 sec bei 42°C inkubiert.

Die Zellen werden im Anschluss für zwei Minuten auf Eis gelagert und 250µl SOC Medium zugegeben, für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven Nährböden ausgestrichen.

2.37. Transformation von *Candida albicans* mittels Lithiumacetat und Elektroporation

1×10^8 Zellen einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes werden in 50ml frischen YEPD gegeben und bis zu einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml bei 37°C inkubiert (Logphase, nach 3-4 Stunden). Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, mit 40ml Aqua dest. gewaschen und mit Lösung 1 zu einer Konzentration von 2×10^9 Zellen/ml eingestellt. 15µl der linearisierten Plasmid-DNA (1µg) wird mit 70µl Zellsuspension, 10µl denaturierter Lachsperm-DNA und 350µl Lösung 2 gemischt und bei 37°C für 30 min geschüttelt. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 42°C für 3 min im Heizblock. Die Zellsuspension wird in der Folge kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 130µl Aqua dest. aufgenommen. Zur Selektion werden die Zellen im Anschluss auf YNB ohne Zusatz der Auxotrophie-Supplemente ausgestrichen. Es wird auf die Komplementation der vorher bestehenden Auxotrophie selektioniert (positive Selektion).

Eine effiziente Möglichkeit, Plasmid-DNA in *Candida* einzuschleusen, ist die Elektroporation (Staub *et al.*, 2001). Eine YEPD Übernachtskultur des Rezipientenstammes wird bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD_{600} 1,6 – 2,0 inkubiert. Die Zellen werden im Anschluss bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert und in 8ml Aqua dest. unter Zusatz von 1ml 10x TE pH 7,5 und 1ml 1M LiAc resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird 250µl 1M DTT zugegeben und erneut für 30 min inkubiert. Folgend wird die Suspension nach Zugabe von 40ml Aqua dest. zentrifugiert und mit 50ml eiskaltem Aqua dest und 10ml eiskaltem 1M Sorbitol gewaschen. Nach Zentrifugation wird das Pellet in 50µl 1M Sorbitol resuspendiert und auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz besteht aus 40µl Zellsuspension und 1µg Plasmid-DNA, welcher in die eiskühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm, Bio-Rad) überführt wird. Die Einstellung für die

Elektroporation sind: Spannung: 1,6kV, Widerstand: 200 Ohm, Kapazität: 25µF. Im Anschluss wird 450µl 1M Sorbitol zugegeben und Aliquots zu je 50µl auf Selektivmedium ausplatiert.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung einer potentiellen Carboanhydrase in *Candida albicans*

Ausgehend von der Hypothese, dass ScNce103p eine funktionelle CA in *Saccharomyces cerevisiae* darstellt, sollte nach homologen Genen in *Candida albicans* gesucht werden. Anhand der Aminosäuresequenz von *S. cerevisiae* NCE103 konnte durch ein BLASTp Suchverfahren eine zu ScNce103p homologe Sequenz in *C. albicans* identifiziert werden. Dabei wurde die Sequenz von ScNce103p (221 Aminosäuren) online auf der Seite der *C. albicans* Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/nph-blast>, Standardeinstellungen) als Vorlage benutzt (Arnaud *et al.*, 2007; Arnaud *et al.*, 2005). Die gefundene Proteinsequenz von CaNce103p mit 281 Aminosäuren zeigte eine 27,5%ige Identität zur Aminosäuresequenz von ScNce103p. Die Nukleotidsequenz zeigte eine Identität von 44,3% zu *ScNCE103* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html?>, Standardeinstellungen). Die ermittelte Aminosäuresequenz beinhaltet von Position 145 bis 165 ein konserviertes Motiv einer Carboanhydrase mit dem Muster [EQ]-[YF]-A-[LIVM]-x(2)-[LIVM]-x(4)-[LIVMF](3)-x-G-H-x(2)-C-G (vgl. Abb. 3.1). Die zur Bindung von Zink als Cofaktor essentiellen Aminosäurereste entsprechen dem Motiv einer β – CA und wurden bei CaNce103p mit Cys-106, His-166 und Cys-169 identifiziert (Smith und Ferry, 2000) (vgl. Abb. 3.2).

3.2. Klonierung von *Candida albicans* NCE103

Das vollständige offene Leseraster von *C. albicans* NCE103 (846bp) einschließlich flankierender Sequenzen wurde mittels des Primerpaares NCE-BF und NCE2 von genomischer DNA des Wildtypstammes SC5314 (Gillum *et al.*, 1984) amplifiziert und in pCR2.1-TOPO (Invitrogen TOPO TA Cloning) kloniert, um pCR2.1 BF-NCE2 zu generieren. Die entstandenen Stämme wurden durch einen diagnostischen *SpeI* Verdau identifiziert. Ein positiver Klon wurde sequenziert, anhand der *C. albicans* Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org>) auf Mutationen geprüft und für die folgenden Arbeitsschritte verwendet.

```

atgggtagagaaaatattttgaaatatcaattggaacatgatcatgaatctgatcttggt
M G R E N I L K Y Q L E H D H E S D L V
actgaaaaagatcaatcattattacttgataataataacaacctaaacgggatgaataat
T E K D Q S L L L D N N N N L N G M N N
accattaaaactcatccggtacgtggttagttcaggaaatcataataattttcctttcact
T I K T H P V R V S S G N H N N F P F T
ttatcttcagaatctacattacaagattttttaataataataaattttttgttgattcc
L S S E S T L Q D F L N N N K F F V D S
ataaaacataatcatggtaatcaaataatttgatttgaatgggtcaagggtcaatctcctcat
I K H N H G N Q I F D L N G Q G Q S P H
acattatggataggggtgtagtgattcaagagcagggtgatcaatgttttagctacattacca
T L W I G C S D S R A G D Q C L A T L P
ggagaaatatttggttcatagaaacattgctaataatagtcaatgccaatgatataagtagt
G E I F V H R N I A N I V N A N D I S S
caaggggttatacaatttgcattgatgtattaaaagtgaaaaaaatcattgtttgggt
Q G V I Q F A I D V L K V K K I I V C G
catactgattggtgggtatttgggcatcattatcaaagaaaaaaattggtgggtgtttaa
H T D C G G I W A S L S K K K I G G V L
gatttatgggttaaataccagtttagacatattcgtgctgctaatttaaaattattagaagaa
D L W L N P V R H I R A A N L K L L E E
tataatcaagatcctaaattaaggccaaaaaattggctgaattaaatgtcattttcttct
Y N Q D P K L K A K K L A E L N V I S S
gtaacagcattgaaaagacatcctagtgctagtggtgcattaaagaagaatgaaattgaa
V T A L K R H P S A S V A L K K N E I E
gtttgggggatggttatatgatgtggcaactggttatttatctcaagtagagattcctcaa
V W G M L Y D V A T G Y L S Q V E I P Q
gatgaatttgaggattttattccatggttcgatgatgaacatgatgaagaagaatataaccct
D E F E D L F H V H D E H D E E E Y N P
cattga
H -

```

Abb. 3.1 DNA Sequenz und Aminosäuresequenz von *C. albicans* NCE103, identifiziert durch ein BLASTp Suchverfahren der *C. albicans* Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/nph-blast>) unter Nutzung der *Saccharomyces cerevisiae* NCE103 Aminosäuresequenz als Vorlage. Der unterstrichene Anteil der AS-Sequenz von Position 145 bis 166 entspricht einem konservierten Motiv einer Carboanhydrase der β -Klasse (Arnaud *et al.*, 2005; Smith und Ferry, 2000).

```

SpCA  -----MPDRKRRIEEIDHQDETIIDREASTASPVSGAG-----
EcYadF -----
CaNCE  ---MGRENI LKYQLEHDHESDLVTEKDQSLLLDNNNNLNGMNNTIKTHPVRVSS
ScNCE  -----MSATESSS-----
MsCA   MANQSSELAIEQLKLLREKEELNEVATTKLEELLEVELQG-----

SpCA  -----KIDQNGEIKDLLERNLTSQQTSRKY-PSFFTATKDIQTTPQVLWIG
EcYadF -----MKDIDTLISNNALWSKMLVEED-PGFFEKLAQAQKPRFLWIG
CaNCE  GNHNNFPFTLSSESTLQDFLNKKFFVDSIKHNHGNQIFDLNGQGQSPHTLWIG
ScNCE  -----IFTLSHNSNLQDILAANAKWASQMNNIQPTWFPDHNAGQSPHTLFIG
MsCA  -----CHPQPIDPAEQRIIDGFTYFKLNNFNKNPELYDRLAKGQSPKFMVFA

SpCA  CDSRSVPETTLNLNLPGEV FVHRNIANVVPRSDINALA----VMEYSVTVLKVK
EcYadF CDSRSVPAERLTGLEPGELFVHRNVANLVIHTDLNCLS----VVQYAVDVLVEVE
CaNCE  CDSRAGDQCLATL-PGEIFVHRNIANIVNANDISSQG----VIQFAIDVLKVK
ScNCE  CDSRYNENCLGVL-PGEVFTWKNVANICHSEDLTLKA----TLEFAIICLKVN
MsCA  CDSRSVSPSII LNFQGEAFKVRNIANMVPFNLRYSGVGATFEYAITALKVE
*

SpCA  HIIIVCGHYGCGGVAALGPNLNN-----LLDHWLRHIRDVIEDNREELDAIE
EcYadF HIIICGHYCGGVQA AVENPELG-----LINNWLLHIRDIWFKHSSLLG--E
CaNCE  KIIIVCGHTDCGGI WASLSKKKIG-----VLDLWLNPNVRHIRAANLKLLEEYN
ScNCE  KVIICGHIDCGGIKTCLTNQREALPKVNC SHLYKYLDIDTMYHEESQNLIH-L
MsCA  SILVI GHSRCGGISRLM SHPEDGS--APYDFIDDWVKIG-LSSKVKVLK GHEC
* *

SpCA  DPQLRLK--LAELNTRAC AISVTRVGFVREAMEK-RGLQVHGWYIDLSNGQIKK
EcYadF MPQERRLDTLCELNVMEQVYNLGHSTIMQSAWKRQKVTIHGWAYGIHDGLLRD
CaNCE  QDPKLRKLAELNVISSVTALKRHP SASVALKK-NEIEVWGMLYDVATGYLSQ
ScNCE  KTOREKSHYLSHCNVKROFNRIENPTVQTAVQN-GELQVYGLLYNVEDGLLQT
MsCA  NDFKEQCKFCEMDSVNNSLVNLKTYPYVDSEIRN-ENLALLGGYYDFVNGEFKL

SpCA  LDITDAIKKAKYGTYS-----
EcYadF LDVTATNRETLEQRYRHGISNLK LKHINH
CaNCE  VEIPQDEFEDLFHVHDEHDEEY NPH----
ScNCE  VSTYTKVTPK-----
MsCA  WKYKTHVTKSVTIPLNGFDMTK-----

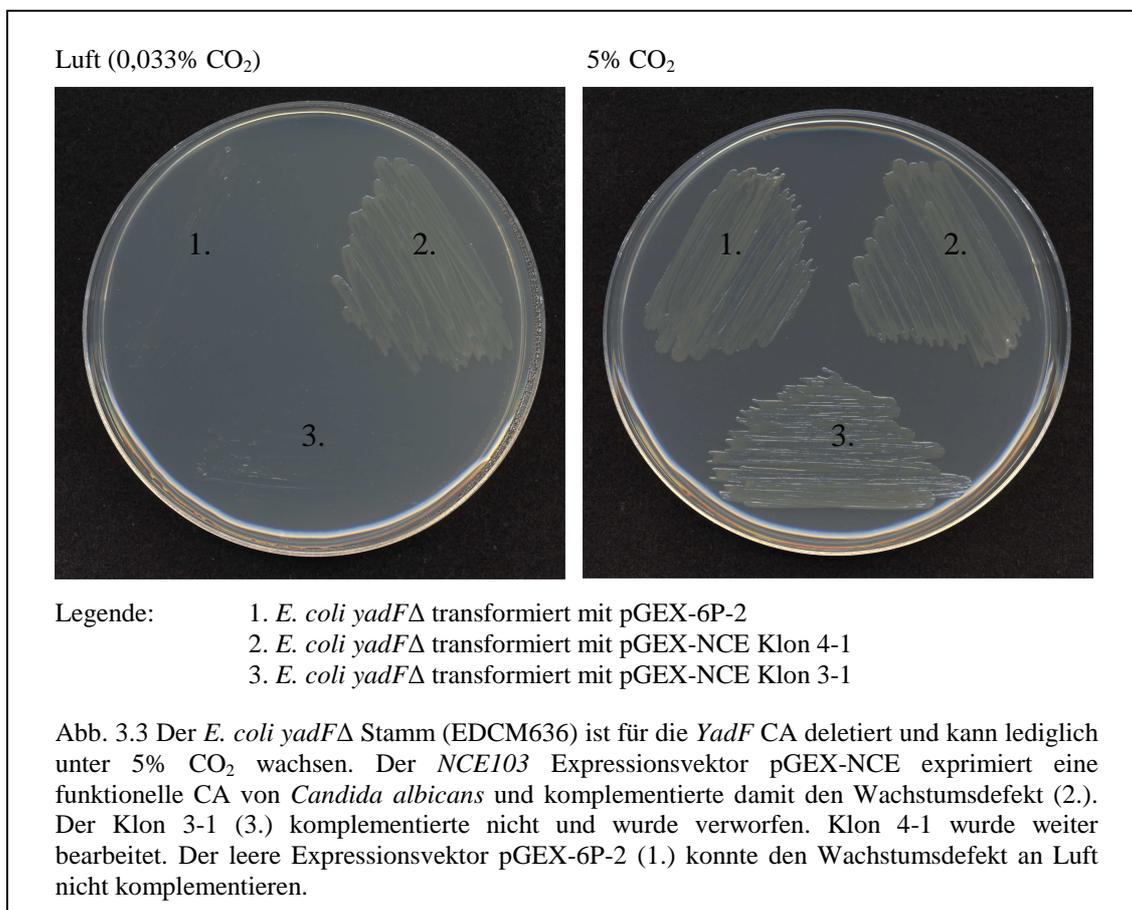
```

Abb. 3.2 Das globale Alignment von CA verschiedener Spezies (SpCA = *Schizosaccharomyces pombe* CA; EcYadF = *E. coli* *YadF* CA; CaNCE = *Candida albicans* Nce103p CA; ScNCE = *Saccharomyces cerevisiae* Nce103p CA; MsCA = *Medicago sativa* CA) zeigt die Konservierung essentieller Aminosäurereste zur Komplexierung von Zink als Cofaktor (Smith und Ferry, 2000; Cronk *et al.*, 2001). Die zur Bindung von Zink als Cofaktor notwendigen Aminosäurereste werden bei CaNce103p mit Cys-106, His-166 und Cys-169 identifiziert und sind in der Abbildung mit Sternen gekennzeichnet. Das Alignment wurde mittels ClustalW online (http://vega.igh.cnrs.fr/bin/nph-clustalw_query.pl, Standardeinstellungen) durchgeführt und graphisch dargestellt.

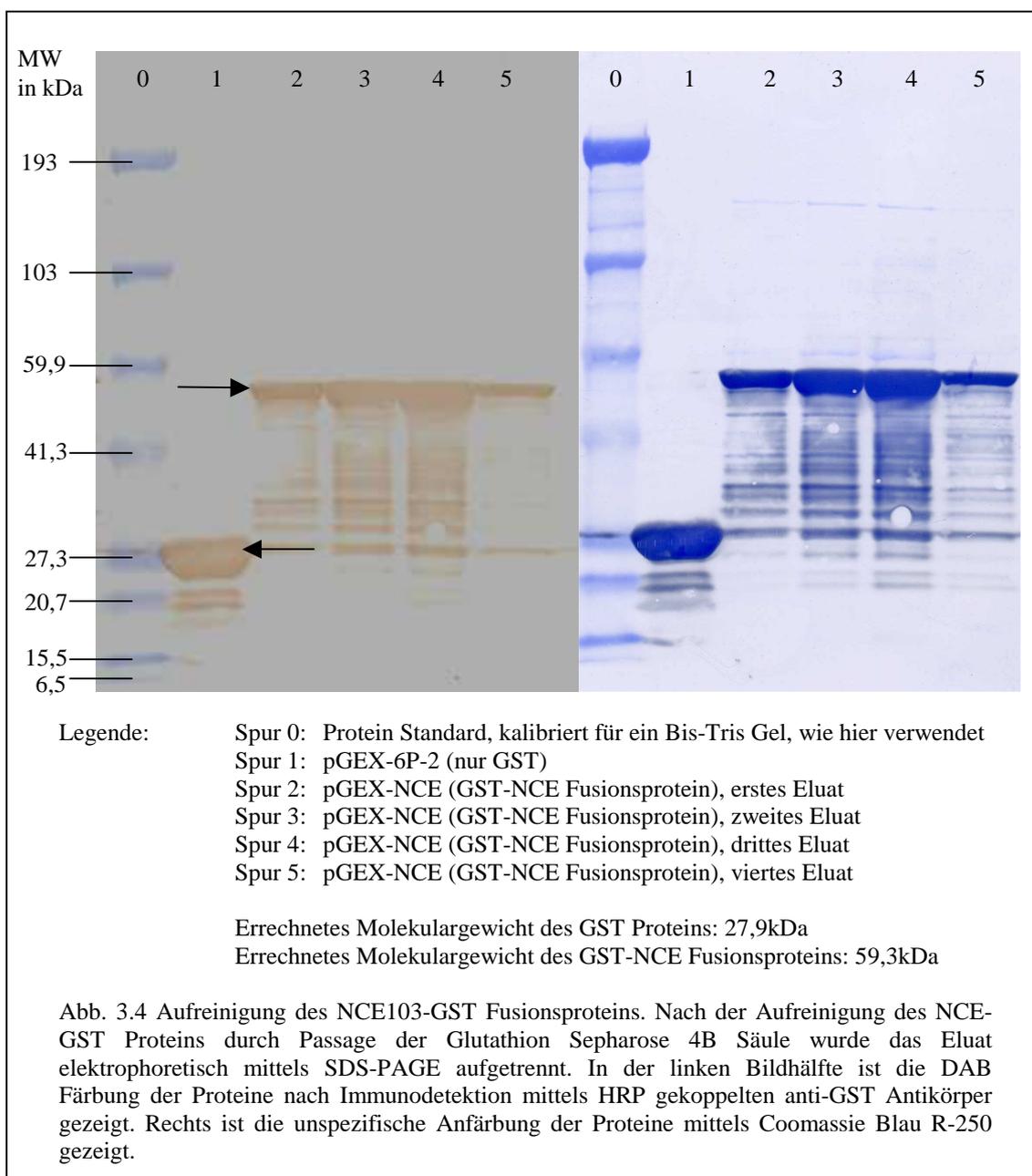
Das globale Alignment zeigt eine Aminosäureidentität zu CaNce103p bei SpCAp von 30,4%, bei EcYadFp von 27,5%, bei ScNce103p von 27,5% und MsCAp von 23,7%.

3.3. Expression und Aufreinigung von CaNce103p als GST-Fusionsprotein in *E. coli*

Das offene Leseraster von *NCE103* wurde mit den Primern CaNCE-FBamGEX (ersetzt das Startcodon und enthält eine *Bam*HI Schnittstelle) und NCE-BR amplifiziert und in pCR2.1-TOPO ligiert. Die nach Transformation resultierenden Kolonien wurden mittels PCR mit den Primern CaNCE-FBamGEX und NCE-BR geprüft und positive Klone durch einen diagnostischen Verdau mit *Bsp*HI bestätigt. Anschließend wurde das ORF mit *Bam*HI und *Eco*RI aus dem Vektor herausgelöst und aufgereinigt. Der Expressionsvektor pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences) wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Das *Bam*HI *NCE103* *Eco*RI Fragment wurde folgend in den pGEX-6P-2 Vektor ligiert. Durch einen diagnostischen Verdau mit *Bsp*HI wurden positive Klone verifiziert. Die Funktion des Fusionsgens wurde anhand der Komplementierung der *E. coli yadF*Δ Mutante (*E. coli* Stamm EDCM636) geprüft. Anschließend wurde der gewählte Expressionsvektor sequenziert und Mutationen ausgeschlossen (vgl. Abb. 3.3).



Das entstandene Plasmid wurde pGEX-NCE benannt und in *E. coli* BL21(DE) (Invitrogen) transformiert. Über Nacht wurde eine einzelne Kolonie in LB Medium unter Selektionsdruck bei 30°C unter heftigem Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen in neues Medium überführt und mit IPTG (Endkonzentration 0,2 mM) induziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen geerntet und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden anschließend per Ultraschall lysiert und der entstandene Zelldebris für 5 min bei 14000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde nach Herstellerangaben auf die präparierten Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences) Säulen geladen und fraktioniert eluiert (vgl. Abb. 3.4).

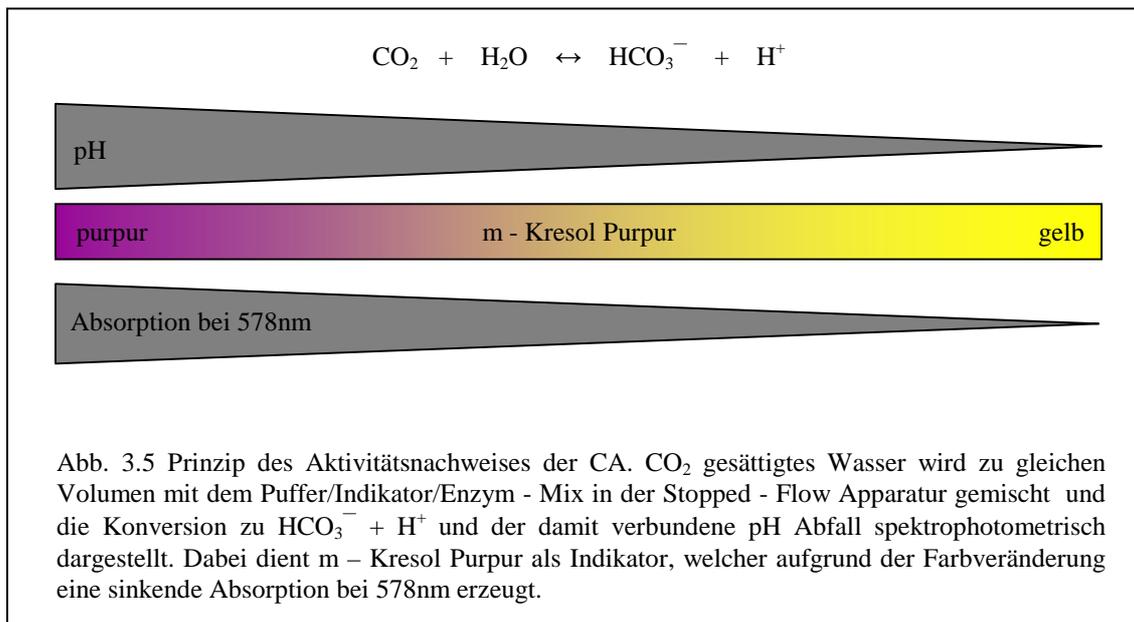


3.4. *CaNCE103* kodiert eine funktionsfähige Carboanhydrase

Aufgereinigtes *CaNce103* Protein wurde qualitativ auf Carboanhydraseaktivität untersucht. Carboanhydrasen zählen zu den schnellsten bekannten Enzymen und leisten eine fundamentale biochemische Reaktion, die vereinfacht dargestellt werden kann als:

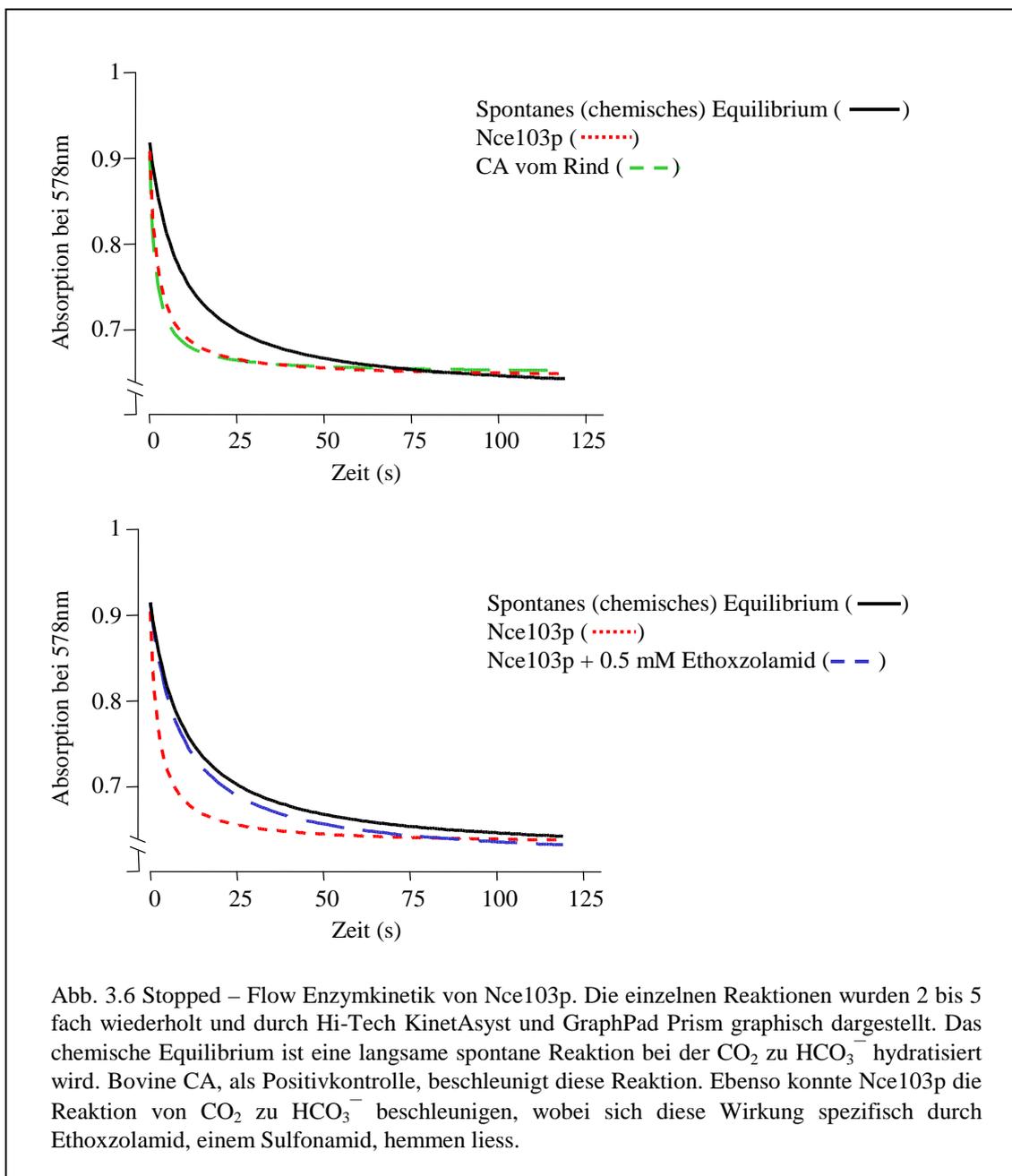


Untersuchungen an gut charakterisierten humanen CA haben gezeigt, dass jedes Molekül CA bis zu 10^5 Moleküle CO_2 pro Sekunde hydratisieren kann. Die katalysierte Reaktion läuft damit bis zu 10^7 mal schneller als die unkatalysierte Reaktion ab (Stryer, 1996). Die Hydratation von CO_2 wurde durch die Stopped-Flow basierte Methode nach Kalifah (1971), modifiziert nach Cronk *et al.* (2000) nachgewiesen. Das Prinzip des Nachweises ist in Abb. 3.5 verdeutlicht.



Für die Stopped-Flow Experimente wurden ca. $30\mu\text{g}$ des vorher aufgereinigten Proteins bzw. Bovine CA (Sigma) als Positivkontrolle eingesetzt. CO_2 gesättigtes Wasser wurde durch 5minütiges Einblasen von CO_2 in Aqua dest. hergestellt. Als Puffer wurde 50mM TAPS und 200mM NaSO_4 bei einem pH von 8,69, als Indikator m - Kresol Purpur in einer Konzentration von $200\mu\text{M}$ verwendet. Die Absorption wurde nach Mischung

beider Reaktanten bei 578nm Wellenlänge ermittelt und mit Hi-Tech KinetAsyst3 und GraphPad Prism 3.0 graphisch dargestellt. Jede Reaktion wurde 3 bis 5 fach wiederholt und die gewonnenen Daten gemittelt. Für die spezifische Inhibition der Enzymaktivität wurde 0,5mM Ethoxzolamid in 5% DMSO verwendet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (vgl. Abb. 3.6).



Das chemische Equilibrium der Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ nach Zugabe von CO_2 stellte sich nach ca. 75 sec ein, was sich aus der Stabilisierung des pH Wertes und

der damit gleich bleibenden Absorption ableiten liess. Die Positivkontrolle durch bovine CA (Sigma) beschleunigte die Einstellung des Equilibriums zwischen CO_2 und HCO_3^- auf ca. 30 sec, wobei hier eine rein qualitative Aussage gewonnen werden soll. CaNce103p beschleunigte ebenfalls die Reaktion und zeigte eine deutliche Steigerung des Umsatzes gegenüber der chemischen Reaktion. Dieser Effekt liess sich spezifisch durch den Zusatz von 0,5mM Ethoxzolamid (Sigma), ein Carboanhydraseinhibitor aus der Stoffgruppe der Sulfonamide, hemmen (vgl. Abb. 3.6).

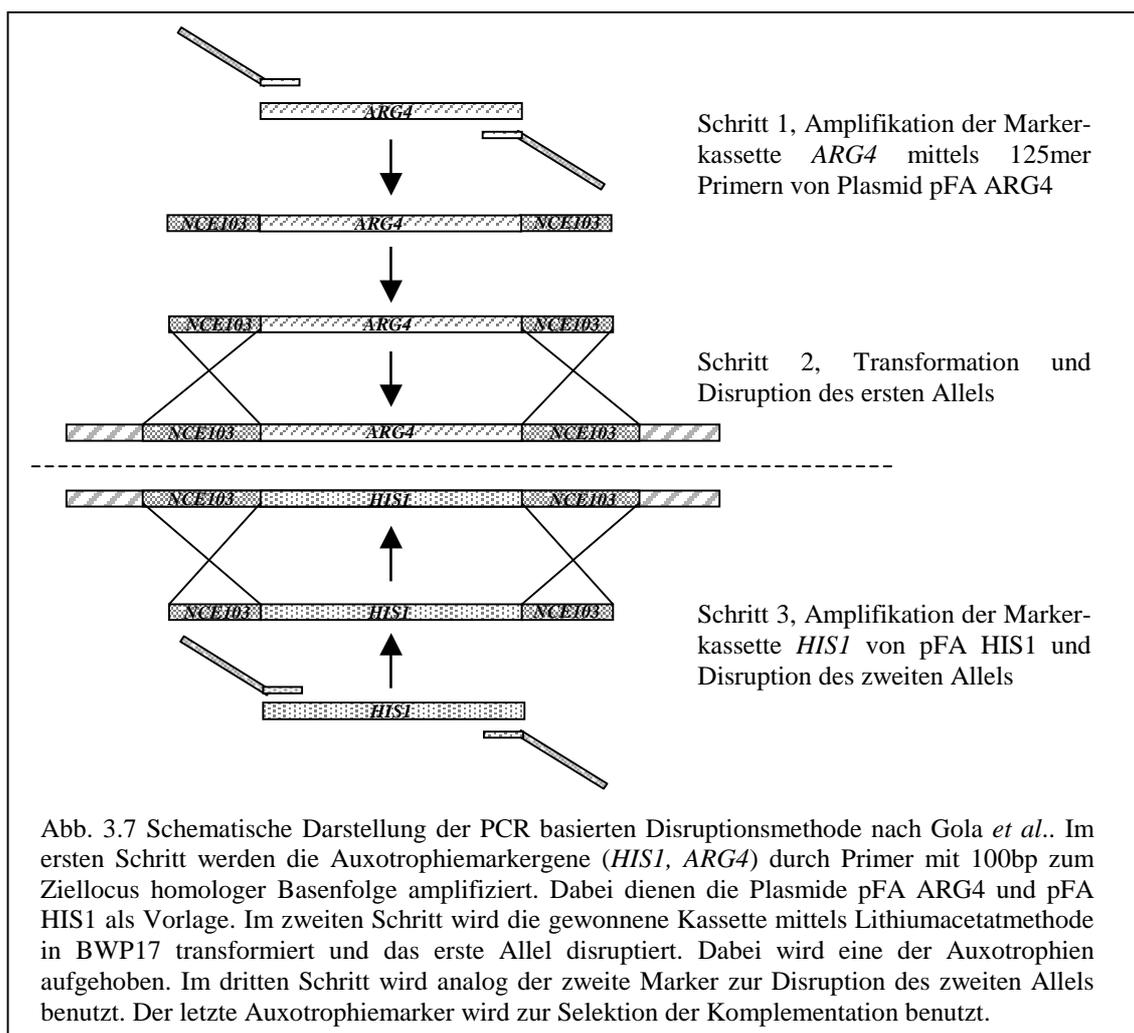
3.5. Disruption von *NCE103* in *C. albicans*

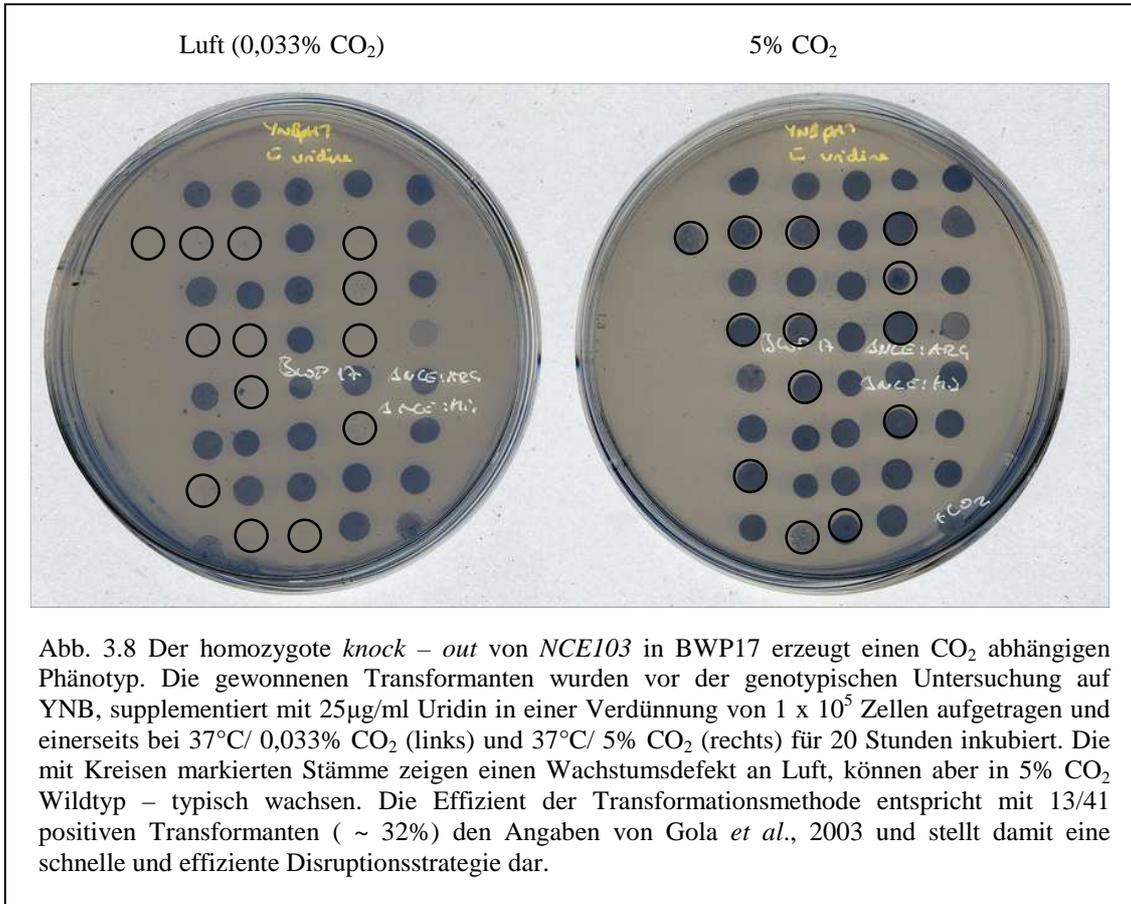
Die Disruption bzw. Deletion eines Genes ist ein zentrales Verfahren zur Prüfung der Bedeutung des Genproduktes im Modellorganismus. Zur Herstellung homozygoter *knock – out* Mutanten wurde parallel einerseits eine PCR basierte Strategie (Gola *et al.*, 2003), andererseits die klassische Strategie des Ura-Blasters (Fonzi und Irvine, 1993) verfolgt.

3.5.1. Herstellung PCR-basierter Disruptionskassetten und Disruption von *NCE103* in *C. albicans* BWP17

Das grundlegende Prinzip dieser *knock – out* Strategie ist dem Ura – Blaster ähnlich, vermeidet aber die Alteration der Virulenz durch heterologe Integration des *URA3* Gens (Staab und Sundstrom, 2003). Ausgehend vom *C. albicans* Stamm BWP17, welcher Auxotrophien für Arginin, Uridin und Histidin aufweist, werden Disruptionskassetten, welche diese Auxotrophien komplementieren und den gewünschten Genlocus disruptieren, integriert (Wilson *et al.*, 1999). Die Kassetten mit den Markergenen *ARG4* und *HIS1* werden dabei durch PCR-Reaktionen mit Primern, die 100 bp zum Genlocus homologer Sequenzen beinhalten, amplifiziert (Wilson *et al.*, 1999, modifiziert durch Gola *et al.*, 2003) (Abb. 3.7). Es werden mehrere PCR-Reaktionen gepoolt, aufgereinigt und in BWP17 transformiert. Die Sequenzabschnitte von 100 bp beidseits des Markers lagern sich an die homologen Sequenzen am Zielort an und werden ausgetauscht. Dabei wurde ein zentraler Teil des *NCE103* Gens disruptiert. Die korrekte Integration der Disruptionskassetten und des Komplementierungskonstruktes zeigte sich einerseits in

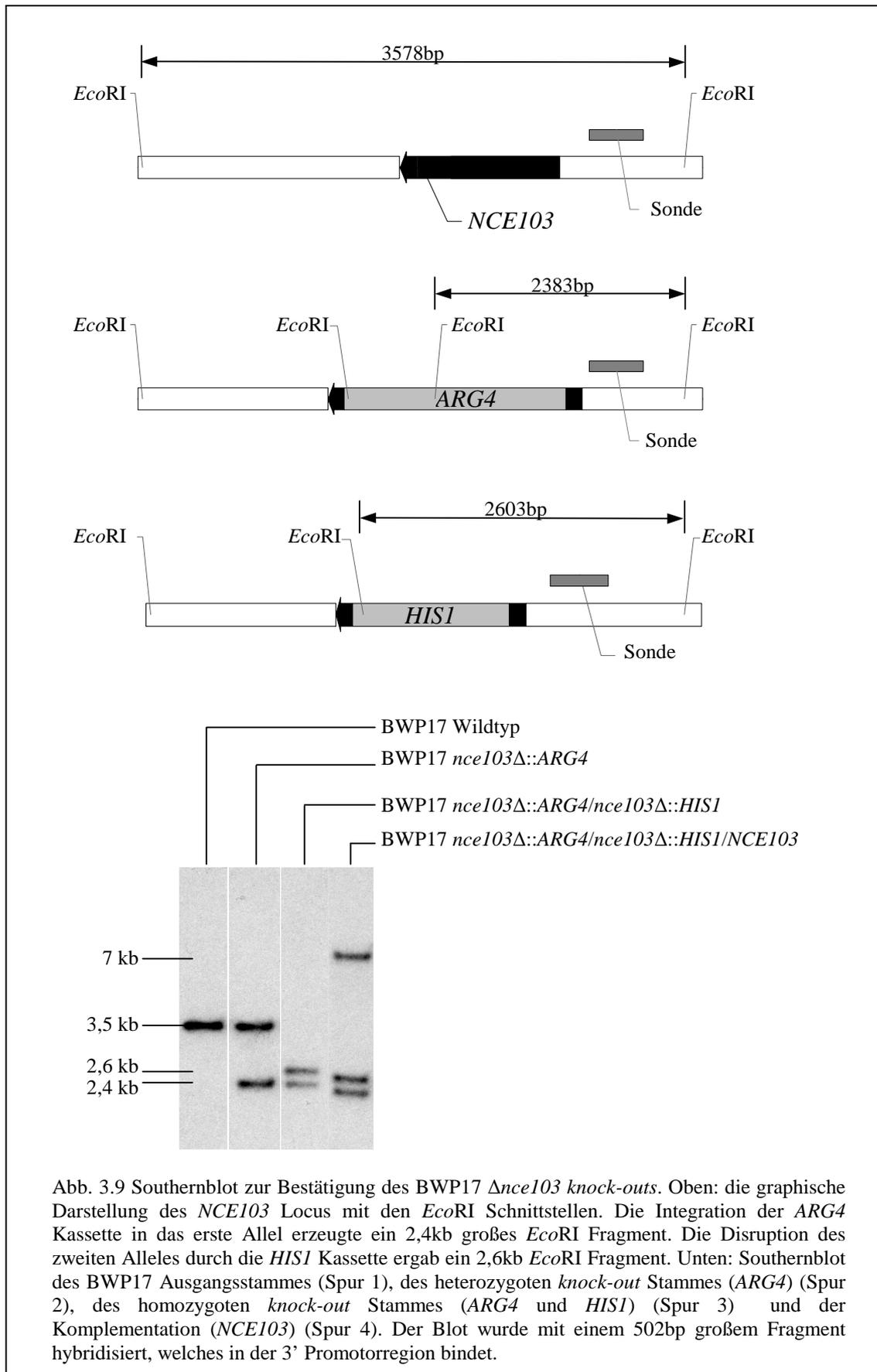
der Komplementierung der Auxotrophie und wurde andererseits durch PCR und Southernblot kontrolliert. Das erste Allel wurde durch die Integration der *ARG4*-Kassette disruptiert. Die aufgereinigte Kassette wurde per Lithiumacetat – Methode in BWP17 eingeschleust, die Zellen auf YNB (supplementiert mit 20µg/ml Histidin und 25µg/ml Uridin, nicht jedoch Arginin) ausplatiert und bei 37°C/ 0,033% CO₂ inkubiert. Die resultierenden Transformanten (jetzt prototroph für Arginin) wurden auf korrekte Integration der Kassette durch PCR mit den Primern NCE-AF und NCE2 geprüft, die eine 4,2kb Bande für das disruptierte Allel und eine 2,8kb Bande für das Wildtypallel zeigte. Das zweite Allel wurde durch Einschleusen der *HIS1*-Kassette disruptiert. Nach Ausplattieren auf YNB, supplementiert mit 25µg/ml Uridin und Inkubation bei 37°C und 0,033% CO₂, konnten keine korrekten Transformanten gewonnen werden. Auch die wiederholten Transformationen erbrachten lediglich heterozygot disruptierte Stämme. Erst durch die Inkubation in mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre konnten für *NCE103* homozygot disruptierte Stämme erzeugt werden (Abb. 3.8).





Zur Bestätigung der korrekten Integration der Disruptionskassetten wurden Southern Blots durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA der zu untersuchenden Stämme präpariert, mit *EcoRI* verdaut und im Agarosegel separiert. Anschließend wurde die DNA denaturiert und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Sonde (502bp) wurde mittels der Primer NCE-BF und NCE-R amplifiziert und aufgereinigt. Sie hybridisiert in der 3' Promotorregion von *NCE103*. Das Wildtypallel zeigte eine Bande von 3,5kb im Southernblot, entsprechend dem *EcoRI* Restriktionsfragment von 3578bp. Die 2,1kb große *ARG4* Kassette besitzt zwei *EcoRI* Schnittstellen, welche das entsprechend hybridisierte Fragment auf 2,4kb verkleinern. Die in der zweiten Runde benutzte *HIS1* Kassette mit 1,5kb besitzt ebenfalls eine *EcoRI* Schnittstelle und ergab ein 2,6kb Fragment im Southernblot (Abb. 3.9). Für die Komplementierung des homozygoten *knock-out* Stammes wurde *NCE103* mit den Primern NCE-AF und NCE2 von genomischer DNA des Stammes SC5314 amplifiziert und in pCR2.1 – TOPO ligiert, um pCR2.1 AF-NCE2 zu gewinnen. Ein mittels *SpeI* Verdau identifizierter Klon wurde sequenziert und Mutationen ausgeschlossen. Ein 2,6kb

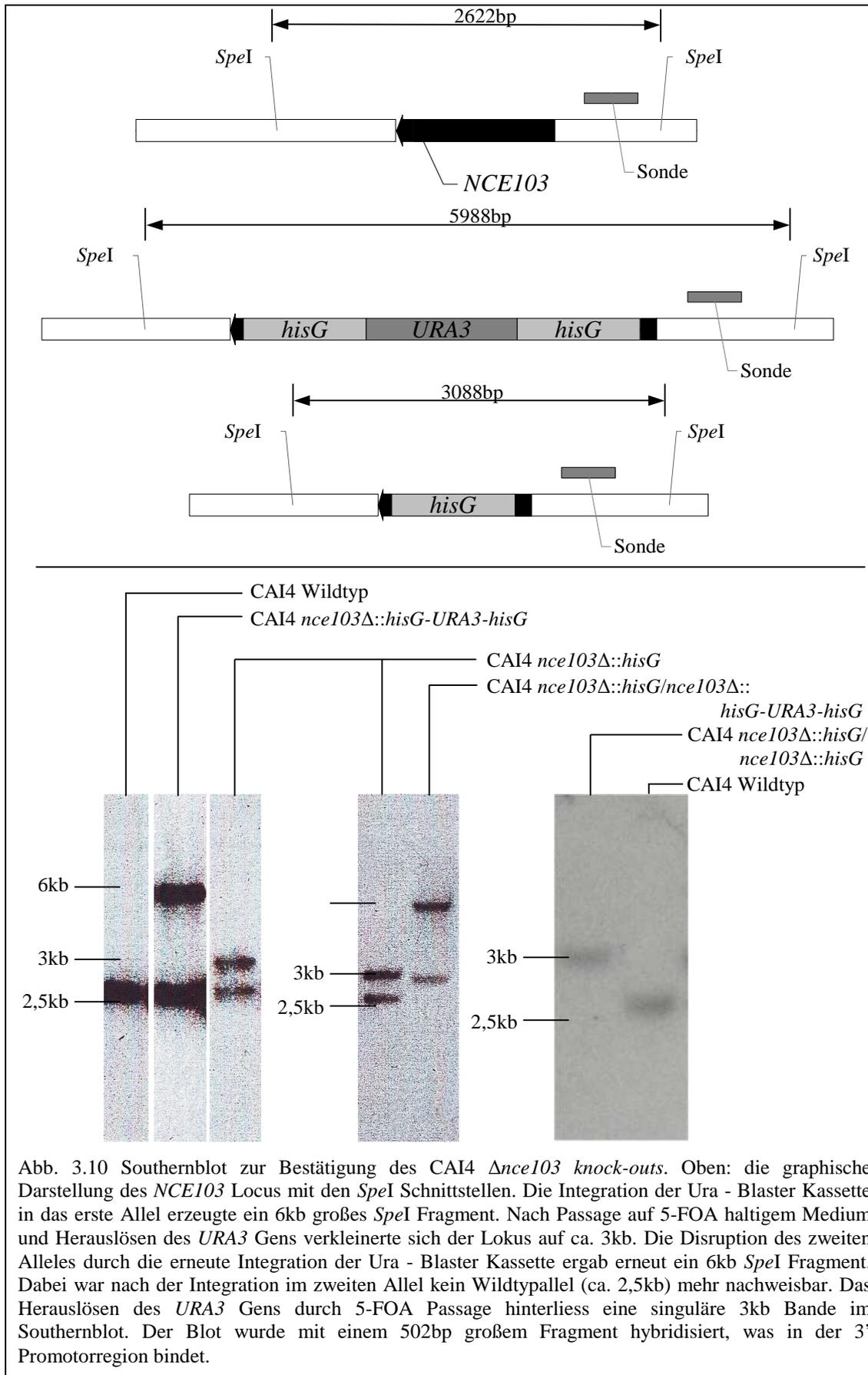
großes Fragment des *NCE103* Gens und entsprechender Promotorregion wurde darauf folgend mit *SpeI-XbaI* herausgelöst und in die dephosphorylierte *SpeI* Schnittstelle von pSM-2 (El Barkani *et al.*, 2000) ligiert, um pSM-NCE zu generieren. Ein *NcoI* Verdau bestätigte die korrekte Ligation. Der Vektor wurde mit *NheI* linearisiert und in die homozygote *knock – out* Mutante transformiert, wo er am ursprünglichen *URA3* Locus integriert und einerseits die Auxotrophie für Uridin komplementiert, andererseits durch ein einzelnes *NCE103* Allel die *knock – out* Mutante komplementiert. Im Southernblot zeigte sich für diesen Stamm eine 7kb Bande, was einem *EcoRI* Restriktionsfragment von 6889bp entspricht. Um für die folgenden Untersuchungen Effekte einer noch bestehenden Auxotrophie zu vermeiden, wurde die homozygote Nullmutante mit pSM-2 (trägt *URA3*, linearisiert durch *NheI* Verdau) transformiert und der jetzt prototroph für Uridin entstandene Stamm in den weiteren Untersuchungen verwandt. Auch dieser Stamm wurde durch Southernblot auf eine korrekte, singuläre Integration des Vektors untersucht.



3.5.2. Herstellung des *NCE103* Ura-Blasters und Disruption von *NCE103* in *C. albicans* CAI4

Prinzip des klassischen Ura – Blasters ist die sequentielle Integration eines Selektionsmarkers in die beiden Allele des zu untersuchenden Genes (Fonzi und Irvine, 1993). Der Selektionsmarker ist in diesem Fall das *URA3* Gen, welches die Auxotrophie für Uridin im Stamm CAI4 komplementiert und demnach eine positive Selektion ermöglicht. Um die Disruptionskassette für das zweite Allel erneut nutzen zu können, wird nach erfolgreicher Integration im ersten Allel des jetzt prototrophen Stammes das *URA3* Gen unter Selektionsdruck über flankierende *Salmonella thyphimurium hisG* Sequenzwiederholungen (*repeats*) herausgelöst. Hierzu werden 1×10^7 Zellen über YNB, supplementiert mit 1mg/ml 5-Fluoroorotidinsäure, selektioniert. Das *URA3* Protein, eine Orotidin-5-Monophosphatdecarboxylase, essentiell zur Synthese von Uracil, setzt 5-FOA zu einem für *C. albicans* toxischem Metaboliten um. Zellen, welche durch Rekombination der *hisG repeats* das *URA3* Gen herausgelöst haben, können auf diesem Medium wachsen (negative Selektion). Der *NCE103* Ura-Blaster wurde wie folgt konstruiert: Ein 2216bp großes Fragment, welches das offene Leseraster von *C. albicans NCE103* und flankierende Bereiche enthält, wurde mittels *SpeI* aus pCR2.1 BF-NCE2 herausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde ein leeres pCR2.1-TOPO Plasmid mit *BspHI* verdaut, die kohäsiven Enden der Schnittstelle mit Mung Bean Nuclease (MBN) in stumpfe Enden überführt (gebluntet) und religiert, um die singuläre *BspHI* Schnittstelle (Position 3046) zu eliminieren und pCR2.1 Δ B zu generieren. Ein diagnostischer Verdau zeigte im Folgenden keine *BspHI* Restriktion dieses Plasmids. Dieser Vektor wurde anschließend mit *SpeI* und *XbaI* geschnitten, die 5' Enden dephosphoryliert und das 2216bp *SpeI NCE103 SpeI* Fragment in den Vektor ligiert, um pCR2.1 Δ B BFNCE2 zu erzeugen. Die korrekte Ligation wurde durch einen diagnostischen *NcoI* Verdau bestätigt. Die Ura-Blaster Kassette (*hisG-URA3-hisG*) wurde aus dem Plasmid pMB-7 (Fonzi und Irvine, 1993) mittels *SalI-BglIII* Doppelverdau herausgelöst, gebluntet und aufgereinigt. Das Innere des *NCE103* Leserasters in pCR2.1 Δ B BFNCE2 wurde mit *BspHI* herausgelöst, die 5' Enden mittels MBN gebluntet, dephosphoryliert und der Vektor aufgereinigt. Schließlich wurde durch beidseitige *blunt end* Ligation die Kassette in die flankierenden *NCE103* Sequenzen

integriert. Es resultierte das Plasmid pCR2.1 NCEX2-Blast, welches durch zwei diagnostische Verdauungen mit *PvuI* und *BamHI* geprüft und anschließend sequenziert wurde. Aus diesem Konstrukt wurde der *NCE103* Ura – Blaster mittels *NsiI* Verdauung herausgelöst und nach Separation in einem Agarosegel aufgereinigt. Der Ura-Blaster ersetzt den zentralen Anteil des offenen Leserasters von *NCE103*. Die Transformation der Kasette erfolgte mittels der Lithiumacetat – Methode (vgl. oben). Zur Bestätigung der *knock - out* Mutanten wurden Southern Blots durchgeführt (vgl. Abb. 3.10). Analog zur PCR basierten Strategie in BWP17 wurde ein 502bp großes PCR Amplifikat nach radioaktiver Markierung als Sonde eingesetzt. Genomische DNA der *Candida* Stämme wurde mittels *SpeI* verdaut und in einem Agarosegel separiert. Nach dem Blot und Hybridisierung zeigte sich ein ca. 2,5kb großes Fragment für das Wildtypallel, entsprechend einem *SpeI* Restriktionsfragment von 2622bp. Die Integration der Ura-Blaster Kasette vergrößerte den Locus um 3366bp auf nun 5988bp, was sich in einer Bande von ca. 6kb im Southernblot zeigte. Durch die Passage der gewonnenen Stämme über 5-FOA-haltigem YNB Medium, wurde durch Rekombination der *hisG repeats* das *URA3* Gen herausgelöst und der Locus nach entsprechendem *SpeI* Verdauung auf 3046bp verkleinert, was sich in einer 3kb Bande im Southernblot bestätigte. Die erneute Integration des Ura-Blasters in das zweite Allel von *NCE103* vergrößerte den zweiten Locus auf erneut 5988bp, was sich in einer Bande von 6kb in Southernblot zeigte. Gleichzeitig war im Southernblot kein Wildtypallel mehr nachweisbar. Nach Passage über 5-FOA-haltigem YNB wurde auch hier das *URA3* Gen herausgelöst. Im Southernblot war dann lediglich eine 3kb Bande, entsprechend den beiden disruptierten Allelen, nachweisbar. Der homozygote *knock – out* Stamm wurde anschließend mit dem linearisierten Plasmid pSM-NCE transformiert, um die Komplementation der *knock – out* Mutante herzustellen. Analog wurde dieser Stamm ebenso mit (dem leeren) pSM-2 Plasmid transformiert, um die Auxotrophie für Uridin aufzuheben. Die Uri+ Stämme wurden für die weiteren Experimente benutzt. Parallel zum *knock – out* in CAI4 wurde auch der Stamm CAR26 für *NCE103* mittels dieser Methode disruptiert (Daten nicht gezeigt).



Zur Suche nach Revertanten wurden auf jeweils 4 YNB Agarplatten sowohl 1×10^7 und 1×10^8 Zellen der *NCE103* Nullmutante (CAI4 *nce103* Δ /*nce103* Δ) ausgestrichen und an Luft (0,033% CO₂) bei 37°C für 3 Tage inkubiert. Sollten sich Kolonien zeigen, ist die Möglichkeit gegeben, dass z.B. weitere Carboanhydrasen im Genom vorhanden und aktiv sind. Nach dreitägigem Bebrüten zeigte sich kein Wachstum, was die Möglichkeit weiterer Carboanhydrasen unwahrscheinlich erscheinen lässt.

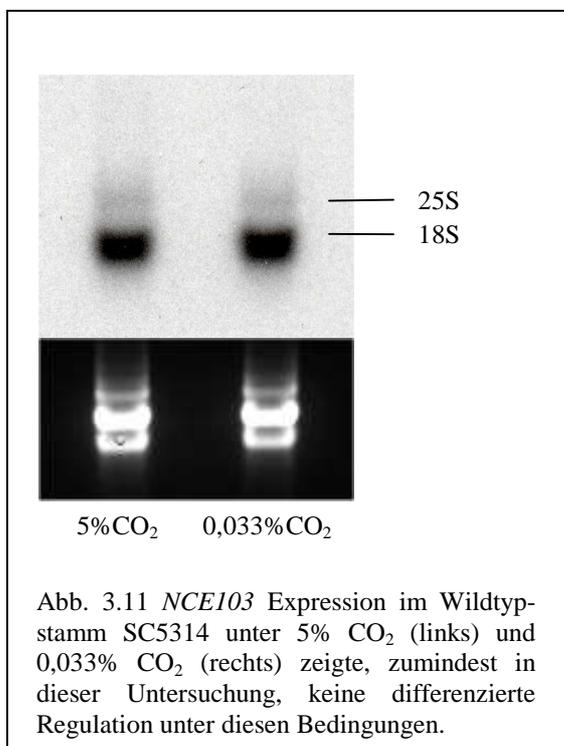
3.6. Expression von *CaNCE103* unter dem konstitutiv aktiven Promotor *EF1 α*

Um die Funktion von Nce103p näher bestimmen zu können, wurde *NCE103* unter dem konstitutiv aktiven Promotor *EF1 α* des *TEF2* Gens exprimiert. Gleichzeitig sollte dieses Konstrukt durch Anfügen eines *His₆-Tags* eine Möglichkeit zur Aufreinigung von Nce103 Protein bieten. Dazu musste sowohl das offene Leseraster von *NCE103* (inkl. *His₆-Tag*), als auch die Terminatorregion des *TEF2* Gens hinter den *TEF2* – Promotor in pFM-2 (Mühlschlegel und Fonzi, 1997) ligiert werden. Das offene Leseraster von *NCE103* wurde mit den Primern NCE-F-Pst und NCEHisTag amplifiziert, die PCR Reaktion über eine Separation in einem Agarosegel aufgereinigt und in pCR2.1-TOPO ligiert, um Plasmid pCR2.1 PstNCEHisTag zu generieren. Positive Klone wurden nach entsprechender Plasmidpräparation durch diagnostische Restriktionsverdauung mit *SpeI* und *BseRI* separiert. Der für die weiteren Arbeiten vorgesehene Klon wurde sequenziert und auf Mutationen geprüft. Gleichzeitig wurde die 3' Terminatorregion des *TEF2* Gens durch die Primer XmaTef2t-F und PspOMITef2-R amplifiziert, über ein Agarosegel aufgereinigt und in pCR2.1-TOPO ligiert, um Plasmid pCR2.1 TEF2term zu erzeugen. Aus dem Plasmid pCR2.1 PstNCEHisTag wurde anschließend mittels eines *SpeI-XbaI* Doppelverdauens das *NCE103* Fragment herausgelöst und in die dephosphorylierte *SpeI/ XbaI* Schnittstelle eines präparierten pBSK(+) Vektors ligiert, um pBSK PstNCEHisTag zu erzeugen. Die erfolgreiche Ligation wurde anhand eines diagnostischen *PstI* Verdauens der präparierten Plasmid-DNA nachgewiesen. Dieses Plasmid wurde im Anschluss mit *PspOMI* und *XmaI* geschnitten und mittels SAP dephosphoryliert. In diese Schnittstelle wurde die *TEF2* Terminatorregion, aus pCR2.1 TEF2term mittels *XmaI/ PspOMI* herausgeschnitten und aufgereinigt, ligiert. Damit kommt die Terminatorregion hinter dem offenen Leseraster des mit einem *His₆-Tag*

versehenen *NCE103* zu liegen. Das entstandene Plasmid pBSK PstNCEHisTag tef2term wurde durch zwei diagnostische Restriktionsverdau mit *PstI* und *NdeI* geprüft. Um abschließend dieses Konstrukt hinter den *TEF2* Promotor in pFM-2 zu ligieren, wurde pFM-2 mit *BamHI* verdaut, die kohäsiven Schnittenden durch MBN in stumpfe Enden überführt und nach einer Phenolaufreinigung das in pFM-2 befindliche offene Leseraster von *PHR2* durch *PstI* Verdau herausgelöst. Der Vektor wurde nach der Dephosphorylierung mit SAP durch eine Separation im Agarosegel aufgereinigt. Durch einen Verdau mit *PstI* und *PvuII* wurde das *NCE103/TEF2*-Terminatorfragment aus pBSK PstNCEHisTag tef2term herausgelöst, aufgereinigt und in den präparierten pFM-2 Vektor ligiert. Positive Klone wurden nach Präparation der Plasmid-DNA durch zwei diagnostische *NdeI* und *EcoRI* Verdau gefunden und mit pFM-NCEoverexpression benannt. Das mit *NheI* linearisierte Plasmid wurde in CAI4 *nce103Δ* transformiert und komplementierte den Wachstumsdefekt der homozygoten *knock - out* Mutante (zur phänotypischen Charakterisierung siehe Abschnitt 3.8).

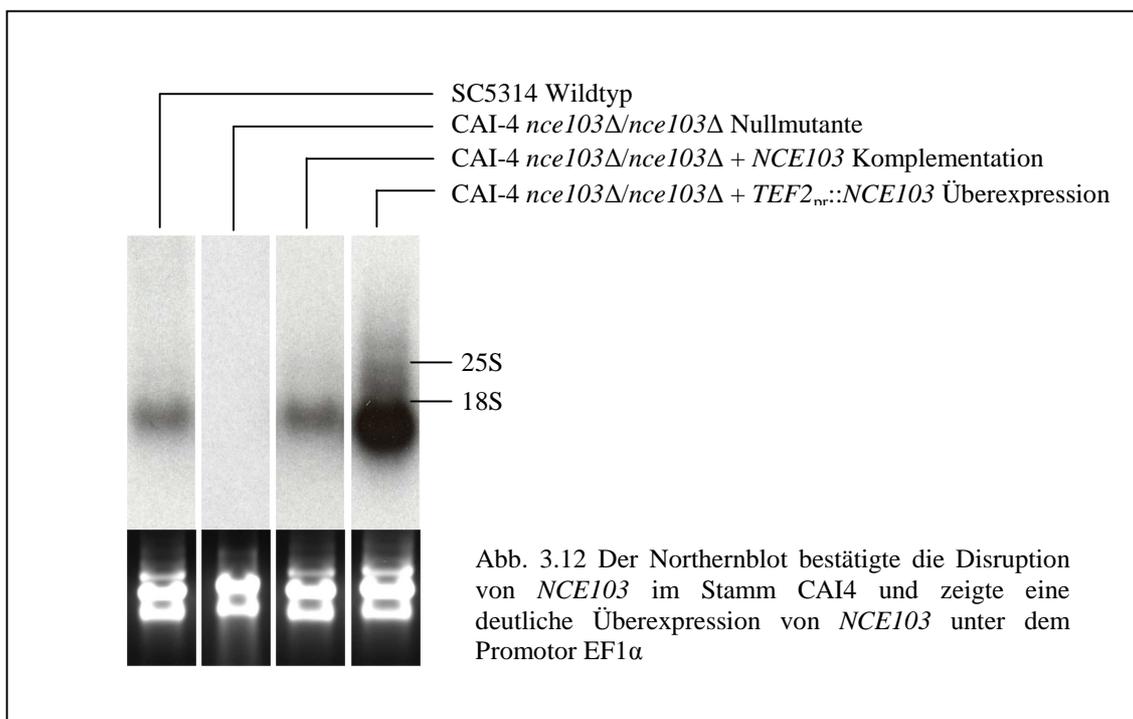
3.7. Northernblot Analysen

Um die Frage nach einer möglichen Induktion der *NCE103* Expression unter CO_2 -



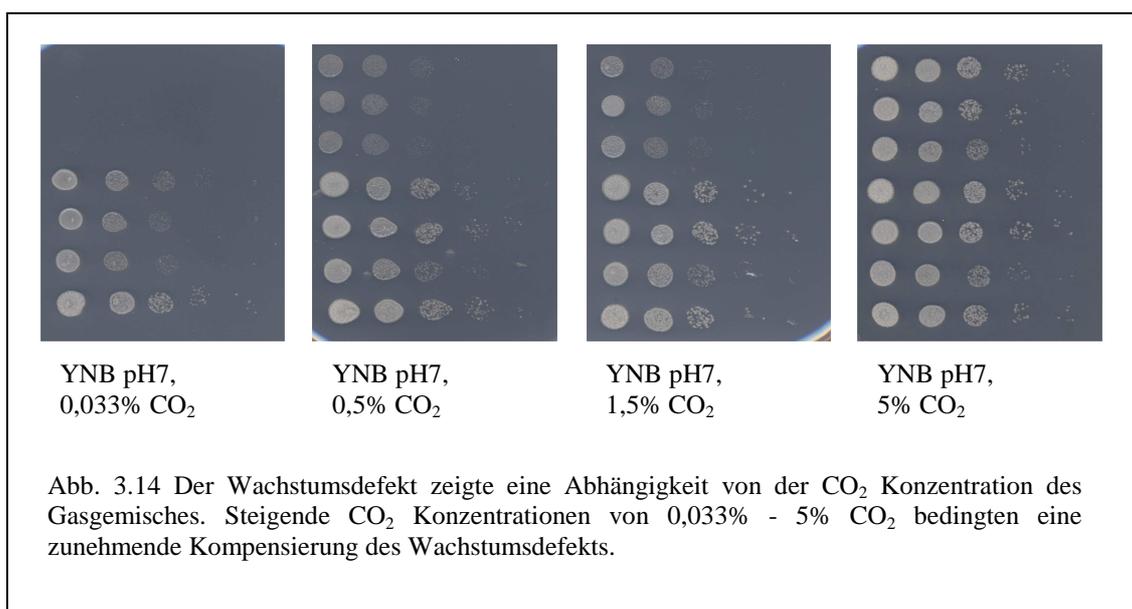
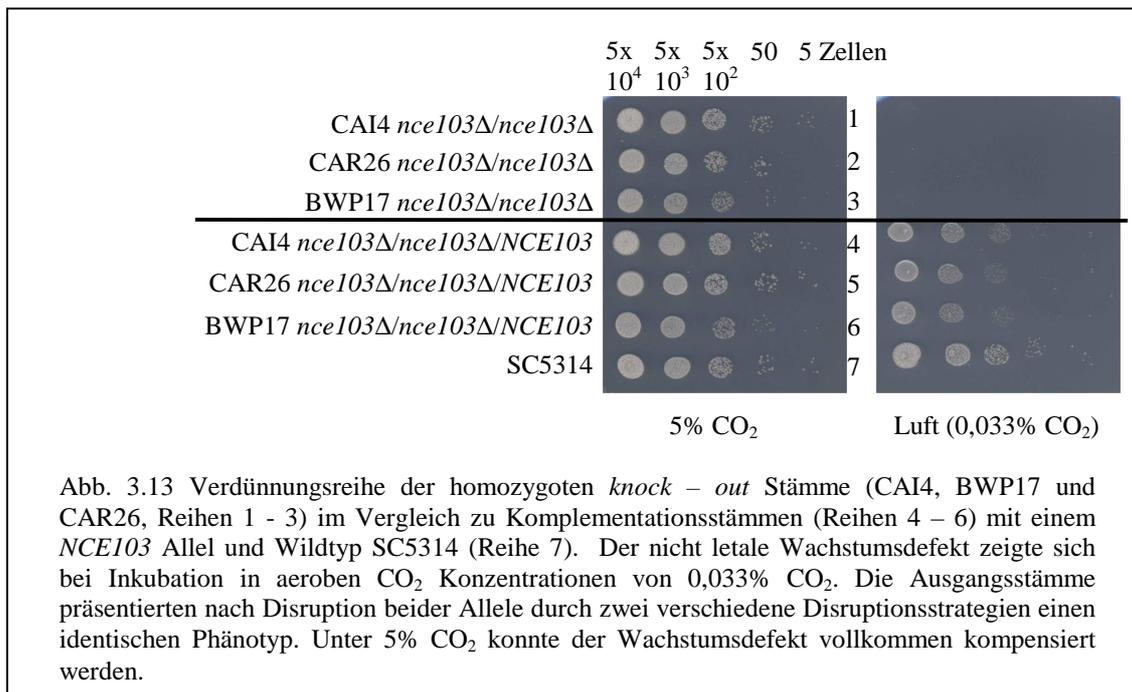
limitierten Bedingungen, wie an Luft mit 0,033% CO_2 und um die Expression von *NCE103* unter 5% CO_2 zu untersuchen, wurden Northernblots durchgeführt. Dazu wurde eine Kolonie SC5314 steril in 50ml YNB über Nacht unter Rühren an Luft und in 5% CO_2 inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen in neues Medium überführt und erneut für 3 Stunden in Luft bzw. 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt - RNA präpariert und auf einem Agarosegel separiert. Die RNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und radioaktiv hybridisiert (Abb. 3.11).

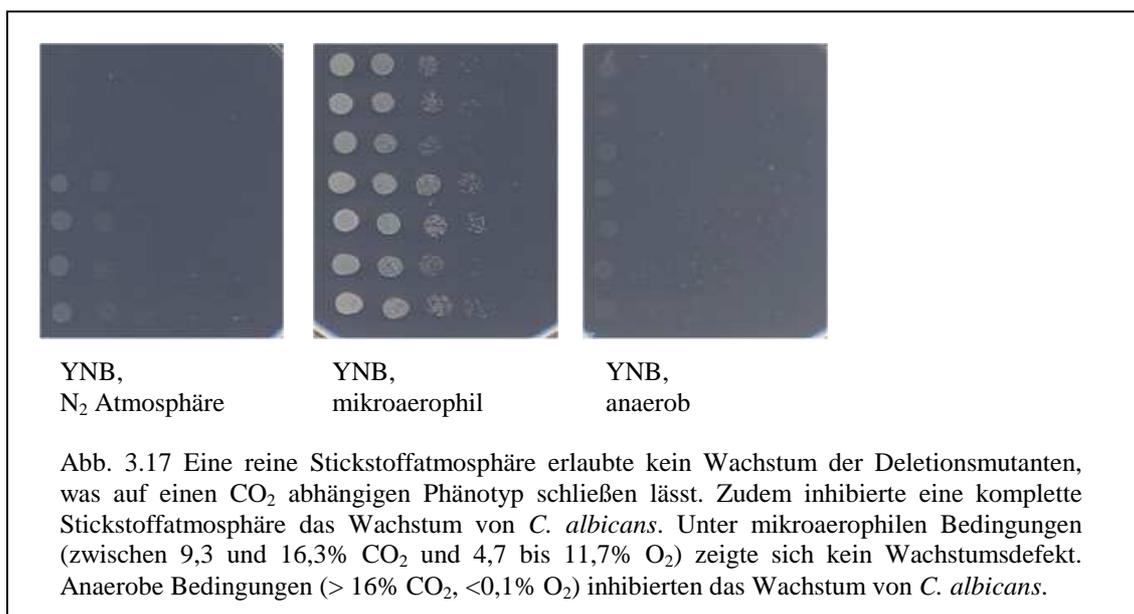
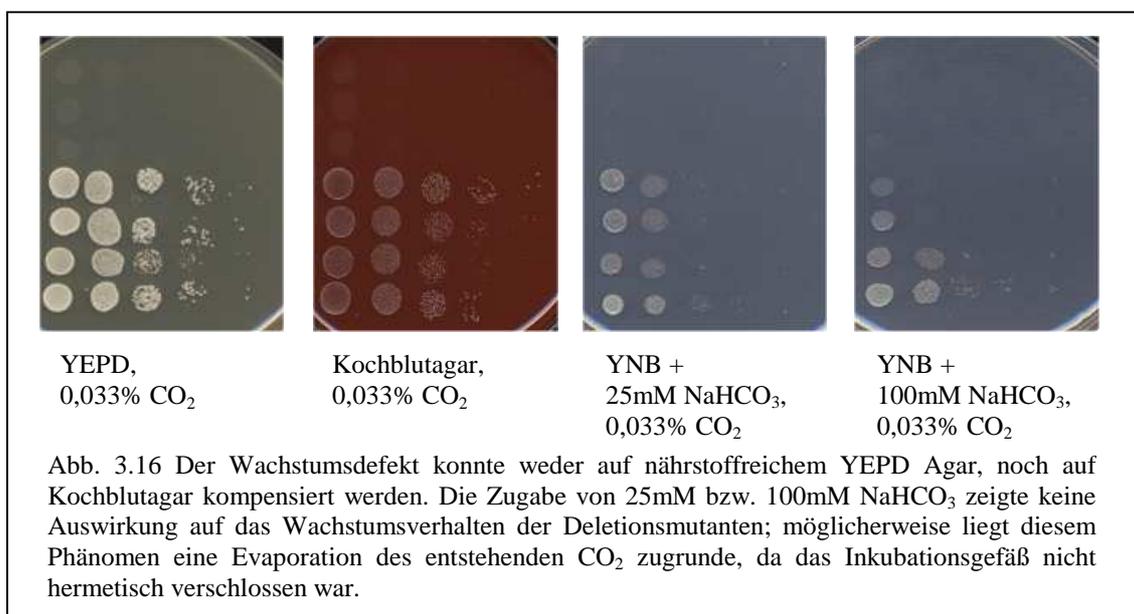
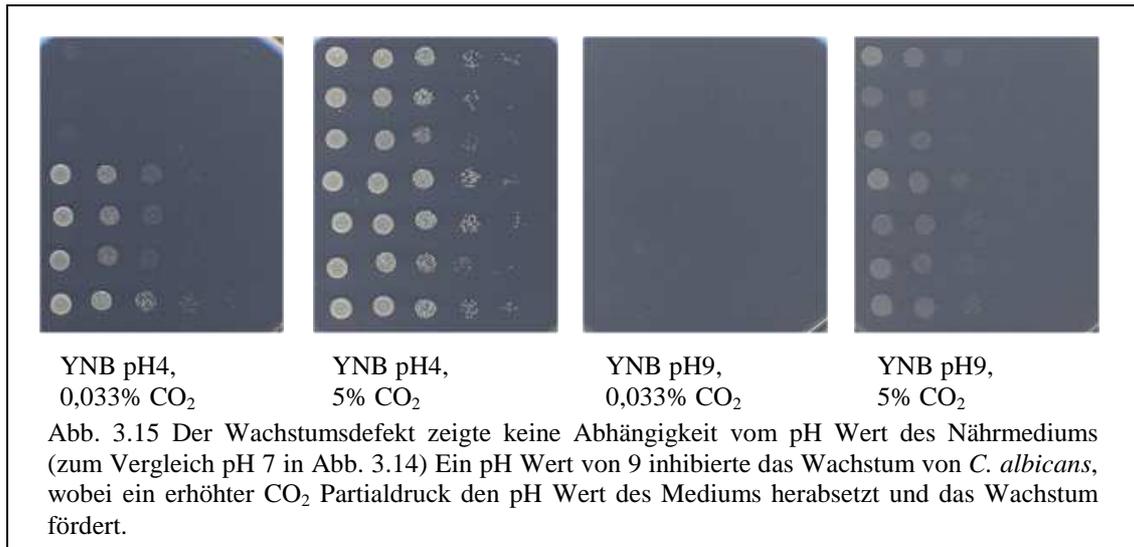
Als Sonde diente ein Fragment aus dem offenen Leseraster von *NCE103*, welches durch *Bsp*HI Verdau aus dem Plasmid pCR2.1 BF-NCE2 herausgelöst und über ein Agarosegel aufgereinigt wurde. Durch einen weiteren Northernblot konnte ein Vergleich der Expression des Wildtypstammes SC5314, der homozygoten Nullmutante, der Komplementation und der Überexpressionsmutante (alle CAI4 Ausgangsstamm) gezogen werden. Wie erwartet liess sich kein Transkriptionssignal in der homozygoten Nullmutante feststellen, der *NCE103 knock-out* war also auch auf Ebene der mRNA komplett. Der Stamm der Komplementation zeigte eine dem Wildtypstamm ähnliche Expressionsstärke, was in Verbindung mit den morphologischen Gemeinsamkeiten darauf schließen lässt, dass eine Kopie des *NCE103* Gens für die Funktion im Organismus ausreichend ist. Der Stamm der Überexpressionsmutante zeigte ein deutlich verstärktes Signal, was sich aus der konstitutiven Aktivität des EF1 α Promotors ergibt. In Verbindung mit der eindeutig stärkeren Filamentation/ Agarinvasion dieses Stammes, lässt sich feststellen, dass die verstärkte Expression von *NCE103* zu einer vermehrten Keimschlauchbildung und damit zu einem induzierten, starken Polymorphismus führt (vgl. Abb. 3.12, vgl. auch Abb. 3.22).

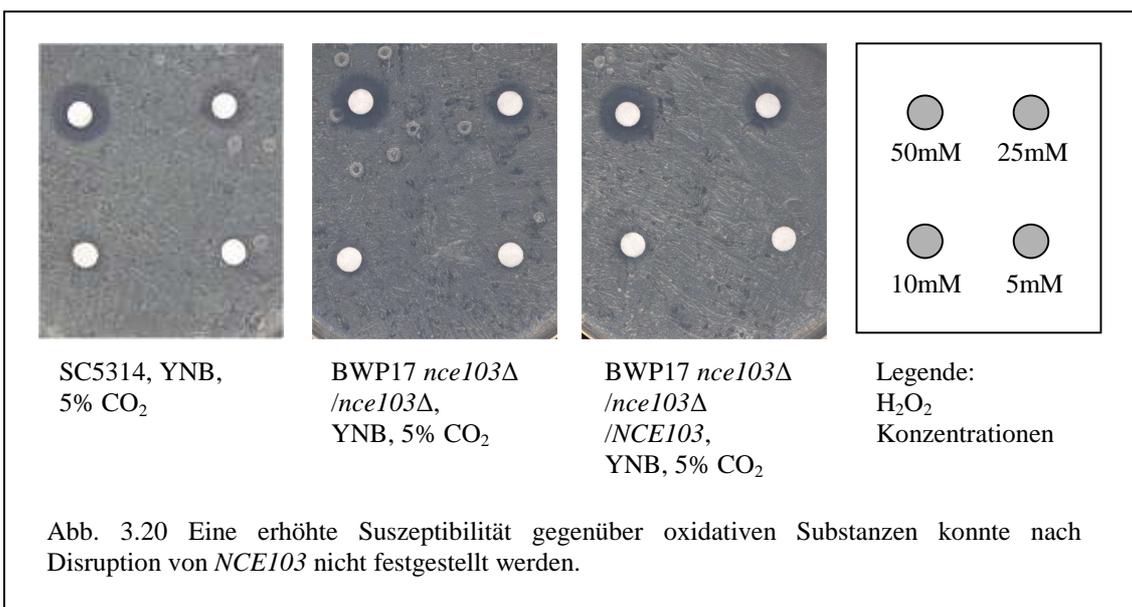
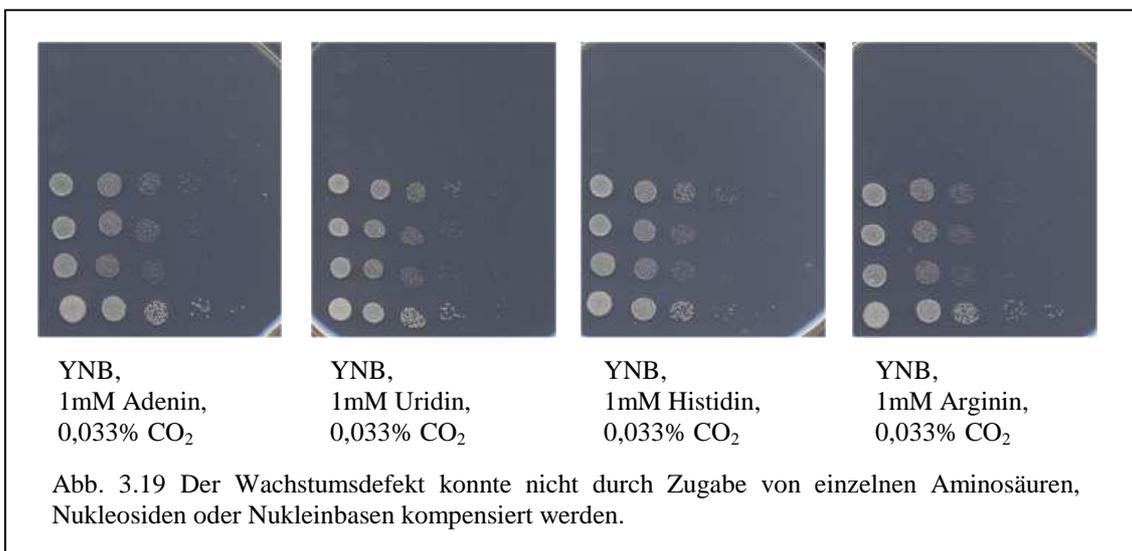
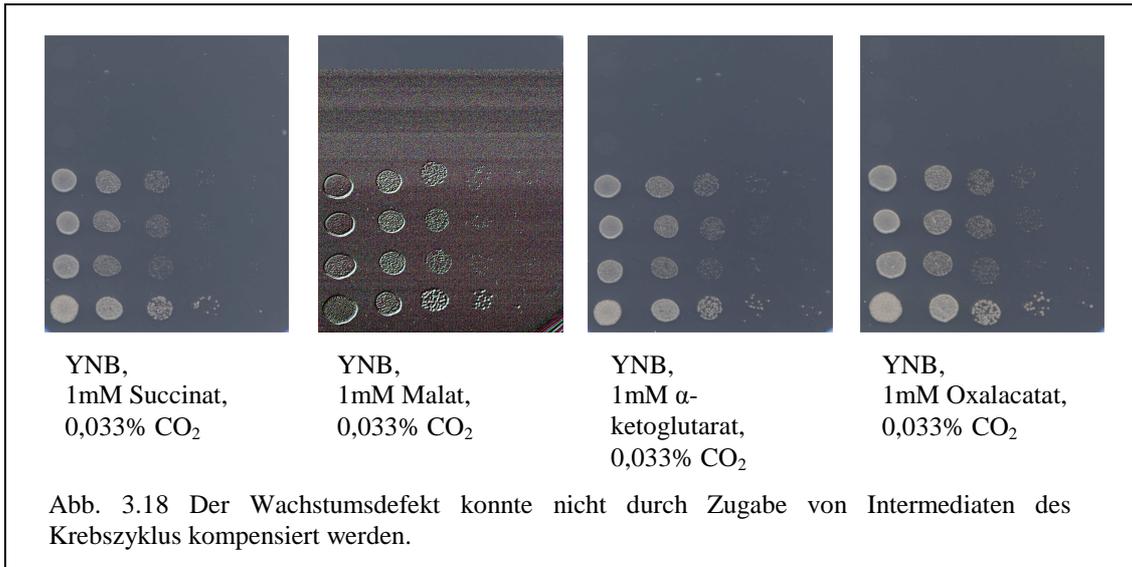


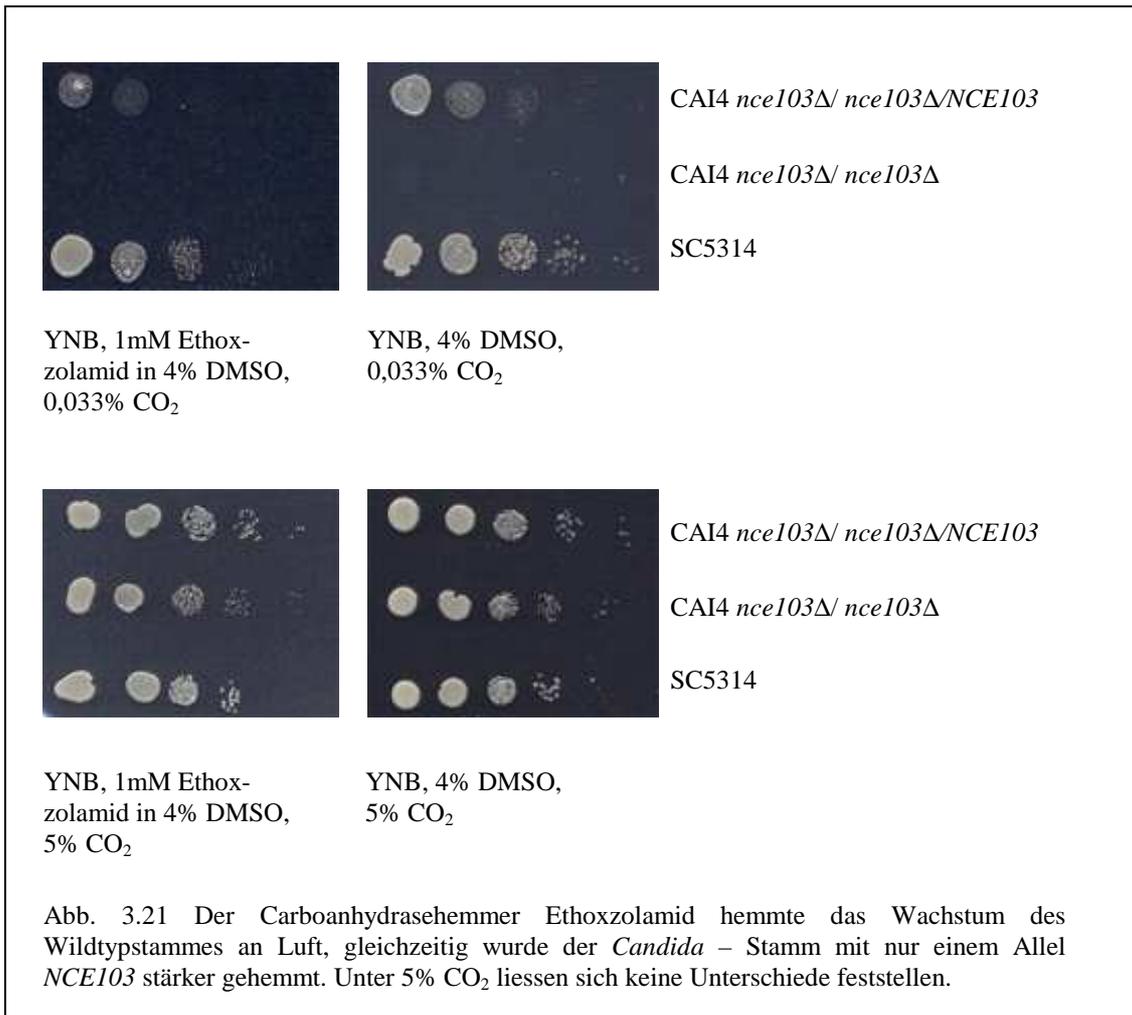
3.8. Phänotypische Charakterisierung der *C. albicans nce103Δ/nce103Δ* Disruptionsmutante

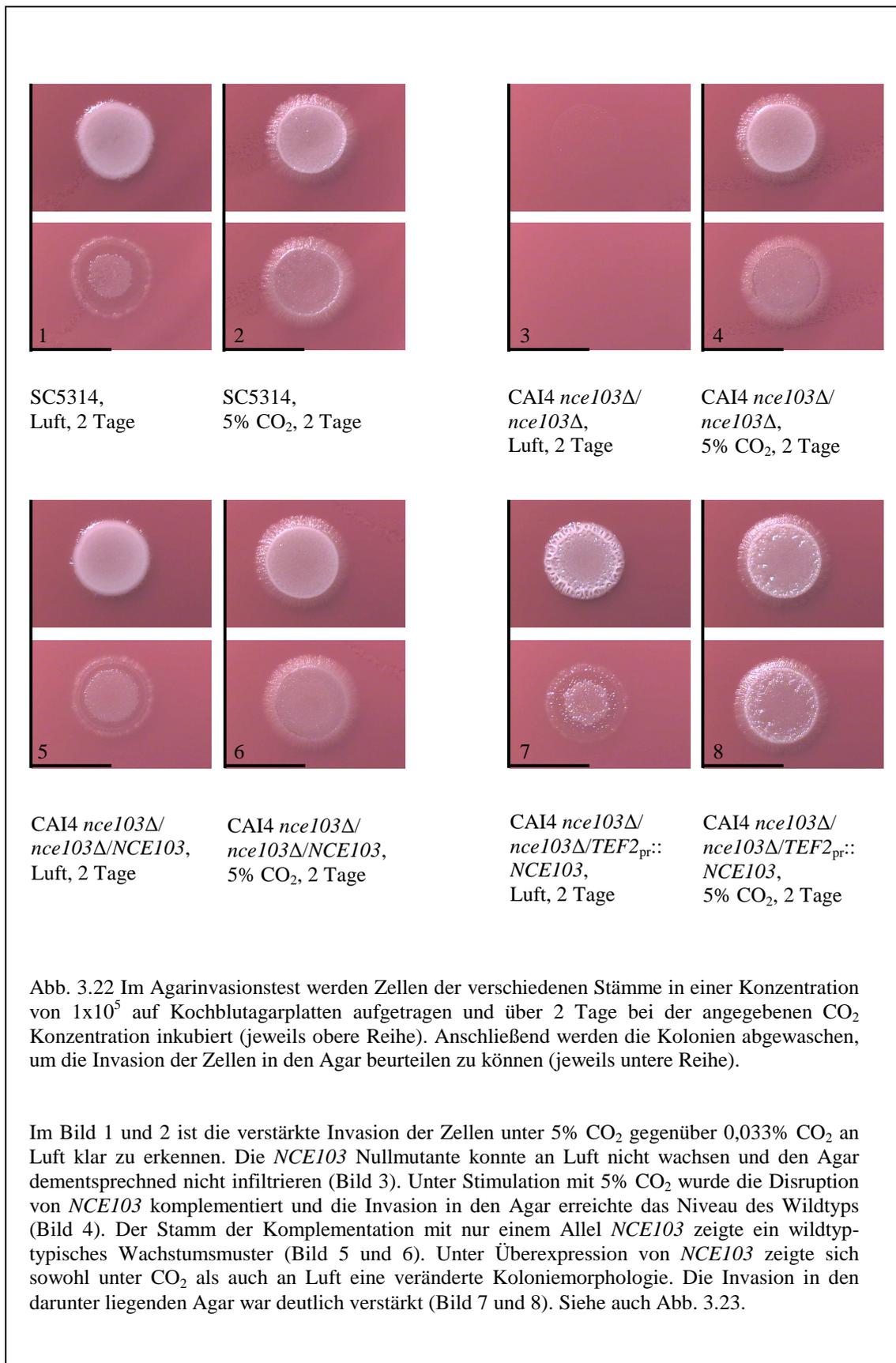
Herausragendes Merkmal der homozygoten *nce103Δ* Mutante ist die Unfähigkeit, unter aeroben Bedingungen (entspricht 0,033 % CO₂ vol/vol) zu wachsen. Der nicht letale Wachstumsdefekt konnte unter 5 – 6 % CO₂ (vol/vol) vollkommen kompensiert werden (Abb. 3.13 und folgende).

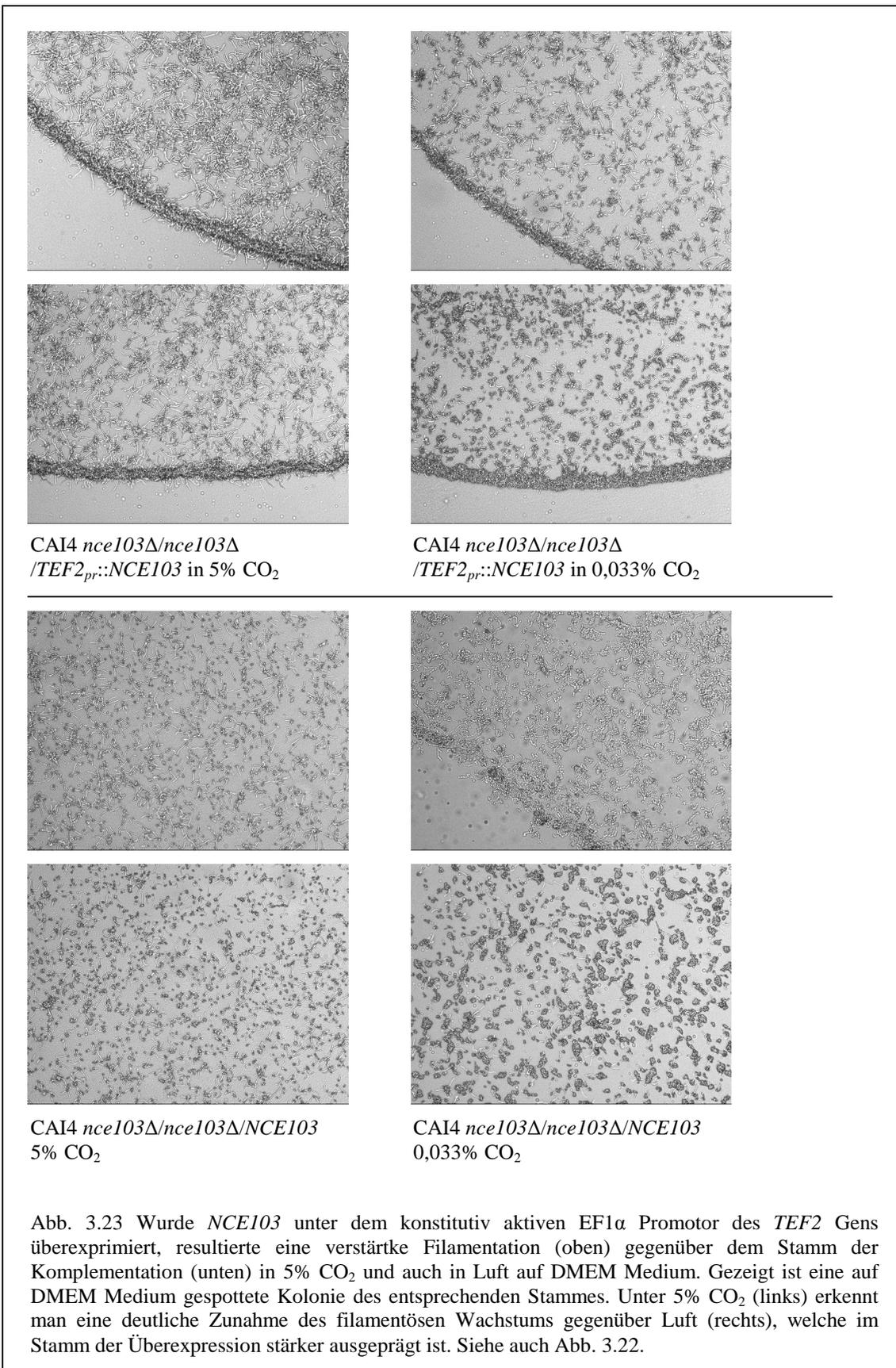












3.9. Carboanhydrasen von *E. coli* und Mensch können *CaNCE103* nicht ersetzen

E. coli besitzt eine funktionsfähige CA (*YadF*, *Can*) der β – Klasse, die analog zu *CaNCE103* für das Wachstum an Luft essentiell ist. Um die Möglichkeit einer Komplementation der *NCE103 knock – out* Mutante durch *YadF* zu prüfen, wurde genomische DNA des *E. coli* Stammes MG1655 präpariert, *YadF* mit den Primern *YadF-F* und *YadF-R* amplifiziert und in pCR2.1 TOPO kloniert, um pCR2.1 *YadF* zu generieren. Nach Ausschluss von Mutationen wurde das offene Leseraster von *YadF* durch einen *NsiI/ BglIII* Doppelverdau aus dem Vektor herausgelöst und in die kompatible *PstI/ BamHI* Schnittstelle des pFM-2 Vektors ligiert, um pFM-*YadF* zu generieren. Das pCR2.1 *YadF* Plasmid, welches die *E. coli* CA durch den *lac* Promotor exprimiert, komplementierte den Wachstumsdefekt der *E. coli YadF* Deletionsmutante (*E. coli* EDCM636). Jedoch konnte der Hefe-Expressionsvektor pFM-*YadF*, bei dem die bakterielle CA unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Hefepromotor $EF\alpha$ steht, den Wachstumsdefekt der *NCE103 knock – out* Mutante nicht komplementieren. Dabei sollte hervorgehoben werden, dass die bakterielle CA für den in *C. albicans* typischen Codongebrauch nicht angepasst wurde.

Analog wurde eine strukturell verschiedenartige CA vom Menschen (human CA II, α -Klasse) in den pFM-2 Vektor kloniert. Dazu wurde die humane CA aus dem Vektor pCAPSh durch einen *EcoRV/ BglIII* Doppelverdau herausgelöst und aufgereinigt. Der pFM-2 Vektor wurde sequenziell mit *PstI* verdaut, durch eine Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und die Schnittstellen mit MBN in *blunt end* Schnittstellen überführt. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA mit *BamHI* verdaut, der Vektor aufgereinigt und dephosphoryliert. Nachfolgend wurde das *BglIII-CAII-EcoRV* Fragment in den präparierten pFM-2 Vektor kloniert, um pFM-hCAII zu erhalten. Nach der Linearisierung dieses Vektors mit *NheI* und Transformation in *CAI4 nce103 Δ /nce103 Δ* konnte jedoch keine Komplementation der *NCE103 knock – out* Mutante erzielt werden. Auch hier muss hervorgehoben werden, dass die humane CA nicht für den Codongebrauch in *C. albicans* modifiziert wurde, was analog zur bakteriellen CA als wahrscheinliche Ursache einer gescheiterten Komplementation zu sehen ist.

3.10. NCE-GFP Fusion

Das offene Leseraster von *NCE103* wurde mit den Primern NCE-AF und CaNCE-RAgeI amplifiziert und anschließend in pCR2.1-TOPO ligiert. Korrekte Klone wurden nach Präparation der Plasmid-DNA durch einen diagnostischen *NsiI* Verdau identifiziert und pCR2.1 NCEageI benannt. Gleichzeitig wurde das für *Candida* optimierte GFP vom Plasmid yEGFP3 (Cormack *et al.*, 1997) mit den Primern GFP-FAgeI und GFPprev amplifiziert, in pCR2.1-TOPO ligiert und in *E. coli* transformiert. Korrekte Klone wurden durch einen diagnostischen *NcoI* Verdau identifiziert und pCR2.1 AgeIGFP benannt. Aus einem sequenzierten und auf Mutationen geprüften Plasmid pCR2.1 NCEageI wurde das *NCE103* Gen mit *AgeI* und *XbaI* Doppelverdau herausgelöst und in die *XbaI/ AgeI* Schnittstellen des präparierten pCR2.1 AgeIGFP Vektors ligiert. Damit kommt das GFP Gen in einer *in frame* Fusion am 5' Ende des vom Stopp Codon befreiten *NCE103* Gens zu liegen. Das Fusionsgen wurde aus diesem Vektor mittels *SpeI* Verdau herausgelöst und in die *SpeI* Schnittstelle eines präparierten pSM-2 Plasmids ligiert. Der entstandene Vektor pSM-NCEGFP wurde anschließend mit *NheI* linearisiert und in die homozygote Nullmutante CAI4 *nce103Δ/nce103Δ* transformiert und bei 0,033% CO₂ inkubiert. Alle Transformanten, die unter diesen Bedingungen wachsen, müssen folglich ein funktionsfähiges *NCE-GFP* Fusionsprotein exprimieren. Die Funktion des GFP Anteils wurde unter Anregung in Fluoreszenz geprüft (Abb. 3.24 und 3.25).

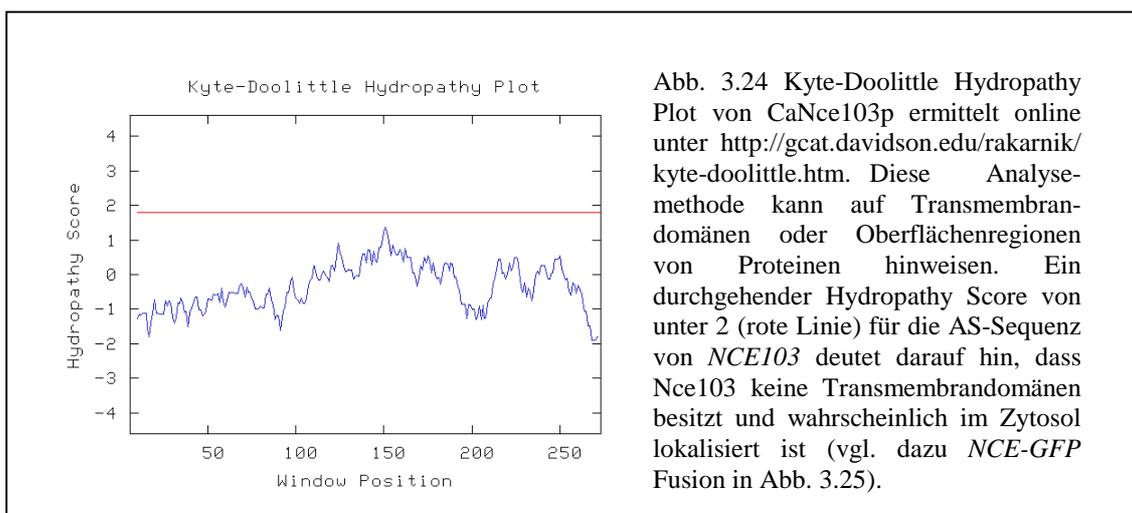


Abb. 3.24 Kyte-Doolittle Hydropathy Plot von CaNce103p ermittelt online unter <http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm>. Diese Analyse-methode kann auf Transmembran-domänen oder Oberflächenregionen von Proteinen hinweisen. Ein durchgehender Hydropathy Score von unter 2 (rote Linie) für die AS-Sequenz von *NCE103* deutet darauf hin, dass Nce103 keine Transmembran-domänen besitzt und wahrscheinlich im Zytosol lokalisiert ist (vgl. dazu *NCE-GFP* Fusion in Abb. 3.25).

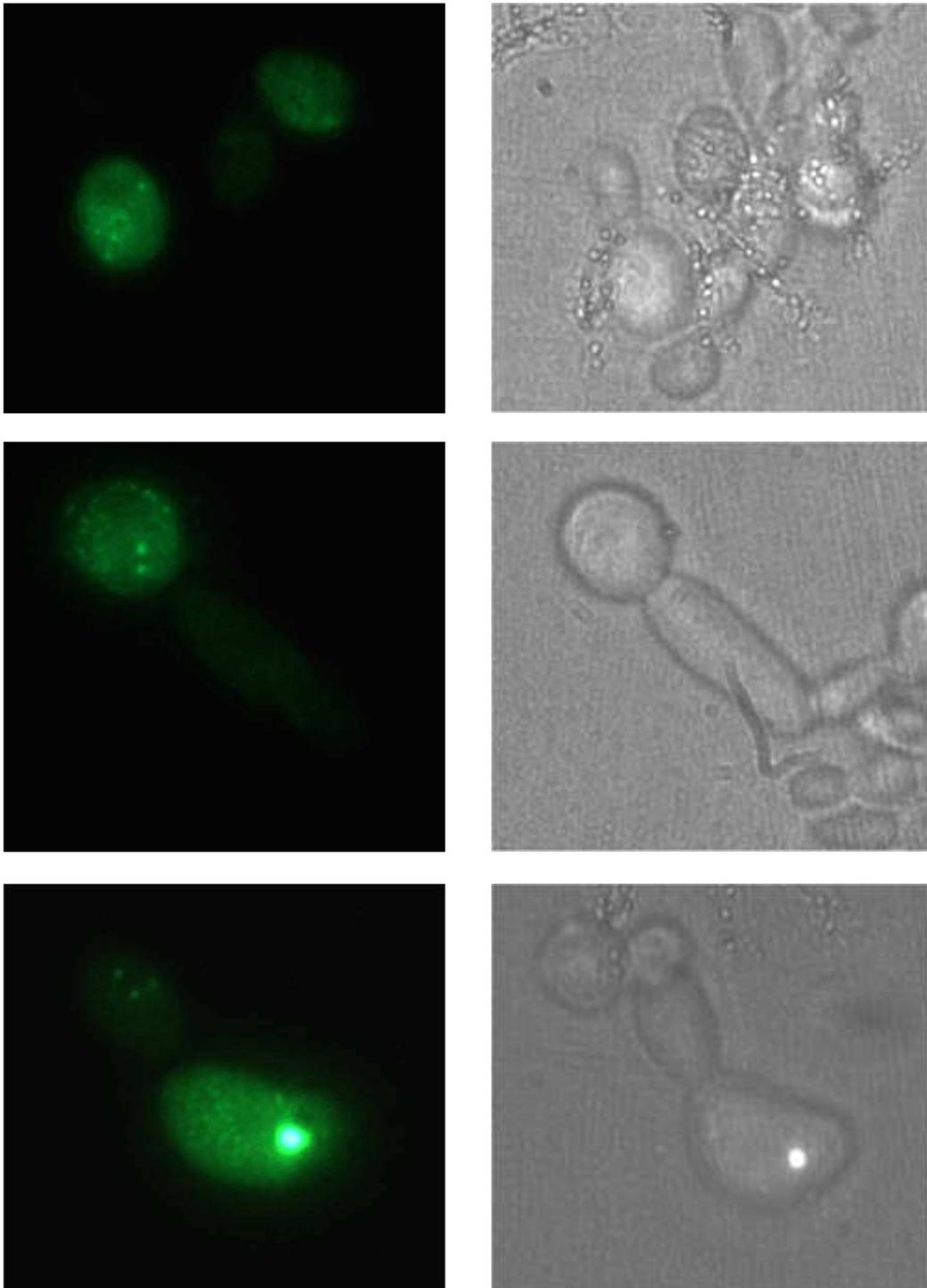


Abb. 3.25 Expression eines Nce103-GFP Fusionsproteins in CAI4 *nce103Δ/nce103Δ* zeigte eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins (vgl. dazu auch Abb. 3.24). Insgesamt wurde das Fusionsprotein schwach exprimiert. Die linke Bildhälfte zeigt die grüne Fluoreszenz unter Anregung, auf der rechten Bildhälfte ist das lichtmikroskopische Äquivalent dargestellt. Nicht alle Zellen zeigen ein Fluoreszenzmuster. Mögliche Ursachen liegen hier in der diskreten Expression des Fusionsgens, können aber auch durch eine instabile bzw. nicht vollständige, funktionelle Expression des GFP Anteils hervorgerufen sein.

3.11. Aquaporine als potentielle CO₂ Kanäle in *Candida albicans*

Aquaporine sind Wasserkanäle, die in nahezu allen lebenden Organismen vorhanden sind (Carbrey *et al.*, 2001). Neben der Funktion als Wasserkanal können Aquaporine auch den physiologischen Transport von CO₂ über Membranen bewirken (Uehlein *et al.*, 2003). *Candida albicans* exprimiert ein Aquaporin (*AQY1*) als funktionellen Wasserkanal (Carbrey *et al.*, 2001). Um die Relevanz dieses Gens im System der CO₂ induzierten Filamentation zu untersuchen, wurde die *aqy1Δ/aqy1Δ* Nullmutante

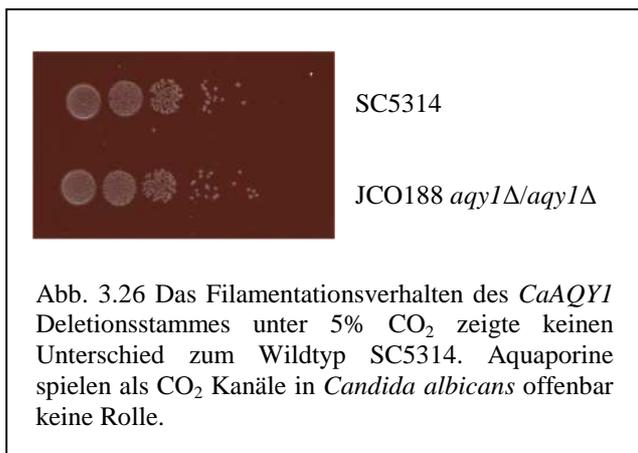


Abb. 3.26 Das Filamentationsverhalten des *CaAQY1* Deletionsstammes unter 5% CO₂ zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp SC5314. Aquaporine spielen als CO₂ Kanäle in *Candida albicans* offenbar keine Rolle.

JCO188 (Carbrey *et al.*, 2001) nach Induktion der Filamentation durch 5% CO₂ zum Wildtypstamm SC5314 verglichen. Dabei konnte kein Unterschied im Filamentationsverhalten festgestellt werden (Abb. 3.26). Ebenso konnte kein morphologischer Unterschied bei ansteigenden CO₂

Konzentrationen gesehen werden. Somit scheint der Aquaporin - vermittelte CO₂ Transport in *Candida albicans* keine wesentliche Rolle zu spielen.

3.12. Klonierung und Expression der katalytischen Region von *Cryptococcus neoformans* Adenylylcyase *CAC1* in *C. albicans* CR276

C. albicans CR276 ist ein für die Adenylylcyase *CDC35* deletierter Stamm (Rocha *et al.*, 2001). Die Fähigkeit CO₂ zu detektieren und mit einem verstärkten filamentösen Wachstum zu reagieren, konnte in dieser Mutante nicht nachgewiesen werden (Klengel *et al.*, 2005, Abb. 3.27). Somit scheint *CDC35* für die CO₂ Signalrezeption eine wesentliche Rolle zu spielen. Analog dazu exprimiert *Cryptococcus neoformans* eine Adenylylcyase (*CAC1*), welche unter anderem die Ausbildung der Polysaccharidkapsel vermittelt. Wird *CAC1* in *C. neoformans* disruptiert, resultiert ein CO₂ insensitiver Phänotyp, welcher nicht in der Lage ist eine dicke Polysaccharidkapsel zu generieren (Zaragoza *et al.*, 2003). Zur Prüfung einer panfungalen Regulation von

Adenylylcyclasen durch CO₂ sollte die *C. neoformans* Adenylylcyclase *CAC1* als trunkeertes C – terminales Fragment in *C. albicans* CR276 exprimiert werden. Zusätzlich sollte Protein als Fusionsprotein an GST aufgereinigt und für spezifische enzymkinetische Untersuchungen bereit gestellt werden. Zur Klonierung der katalytischen Region von *CnCAC1* wurde der Wildtypstamm ATCC90112 (D. Sanglard, Universität Lausanne) in YEPD über Nacht unter heftigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die gDNA anhand des auch für *C. albicans* verwendeten Protokolls extrahiert. *CnCAC1* zeichnet sich durch den Besitz von insgesamt 7 Intronabschnitten aus. Aus diesem Grund wurde die Gesamt RNA ebenfalls anhand des *C. albicans* Protokolls extrahiert und nach einem DNase I Verdau durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation eines C – terminalen Abschnittes von *CAC1*, welcher die katalytische Untereinheit beinhaltet mit den Primern CnCAC1Fn und CnCAC1RHis (langes Fragment – *CAC1*₁₇₂₁₋₂₂₇₁) bzw. CnCAC2Fn und CnCAC1RHis (kurzes Fragment – *CAC1*₁₈₂₄₋₂₂₇₁) von gDNA bzw. cDNA zeigte den erwarteten deutlichen Größenunterschied der Fragmente aufgrund des Spleißens der Intronabschnitte. Die gewonnenen Fragmente wurden in pCR2.1 – TOPO kloniert, um pCR2.1 F1R1His bzw pCR2.1 F2R1His zu generieren. Richtige Klone wurden durch diagnostische Verdau mit *Nsi*I bzw. *Xba*I herausgefiltert. Nach der Sequenzierung jeweils eines Klones wurden beide Fragmente mittels *Sma*I/ *Bam*HI Doppelverdau herausgelöst und in die gebluntete *Pst*I/ *Bam*HI Schnittstellen von pFM-2 ligiert. Die Vektoren wurden mit *Nhe*I linearisiert und in den *cdc35Δ* Deletionstamm CR276 transformiert. Das trunkeerte *CAC1* C – terminale Fragment (beide Größen) konnte die *cdc35Δ* Nullmutante komplementieren und die Fähigkeit zur CO₂ vermittelten Filamentation wieder herstellen (Abb. 3.27). Somit trägt der C – terminale Anteil von *CAC1* nicht nur die Fähigkeit cAMP als *second messenger* zu generieren, sondern auch die Rezeption von CO₂ zu vermitteln.

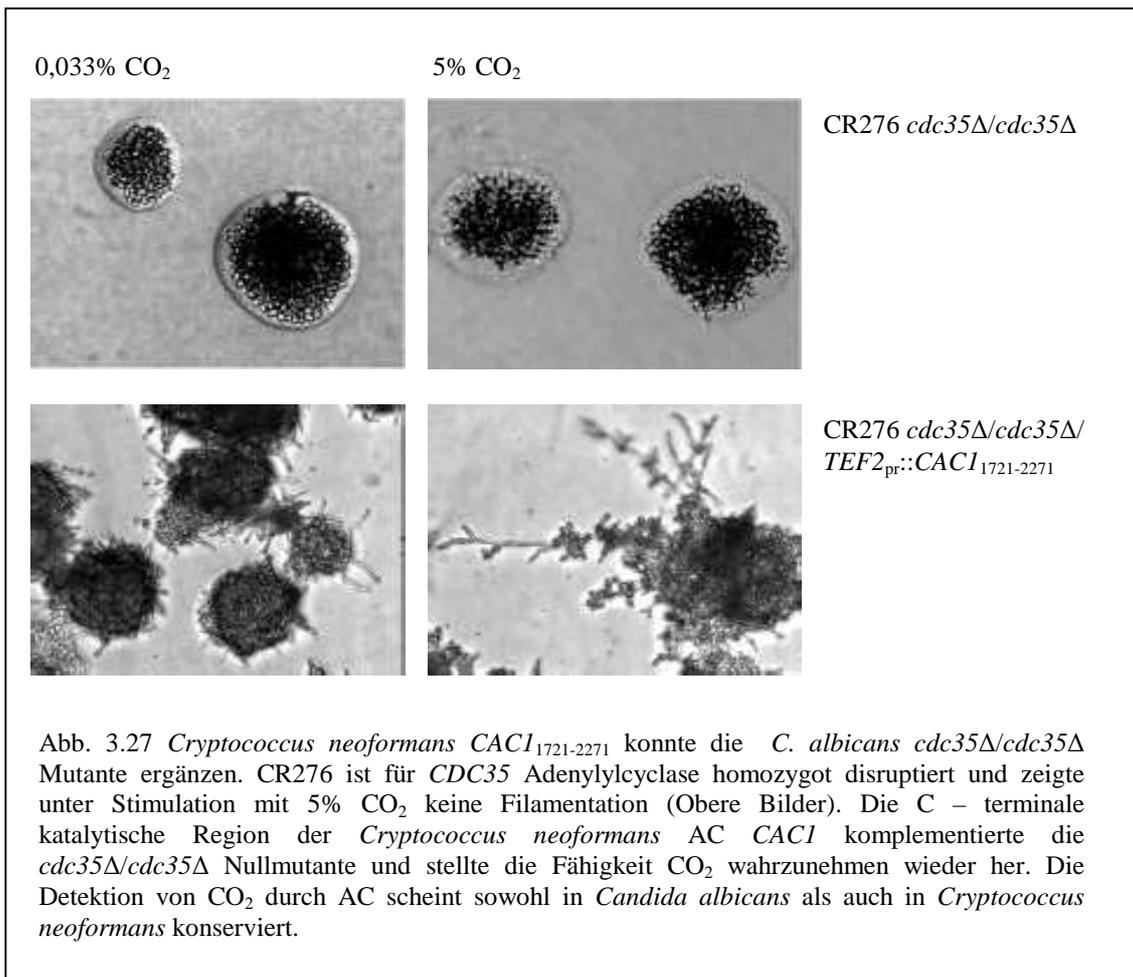


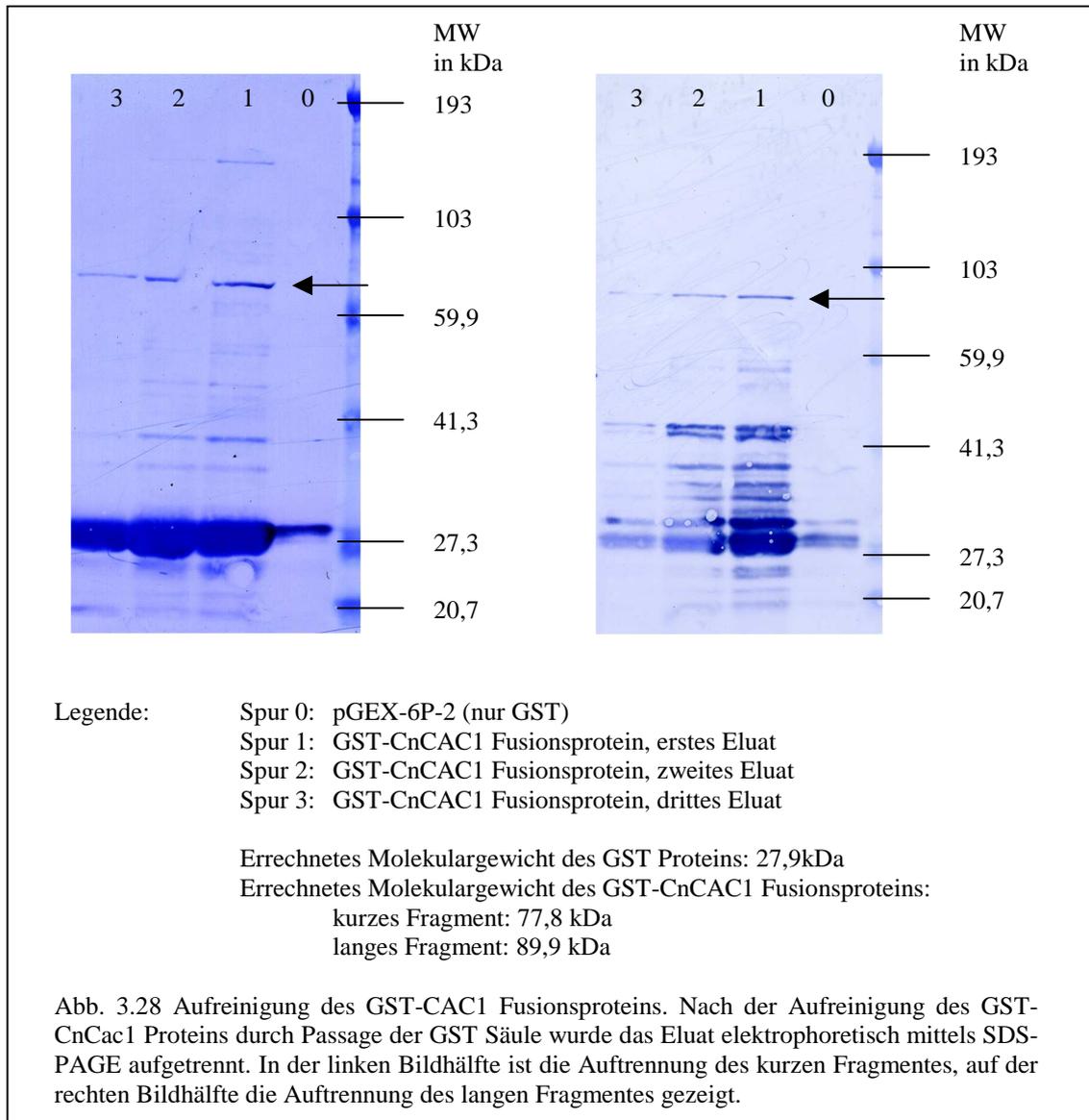
Abb. 3.27 *Cryptococcus neoformans* *CAC1*₁₇₂₁₋₂₂₇₁ konnte die *C. albicans* *cdc35Δ/cdc35Δ* Mutante ergänzen. CR276 ist für *CDC35* Adenylylcyclase homozygot disruptiert und zeigte unter Stimulation mit 5% CO₂ keine Filamentation (Obere Bilder). Die C – terminale katalytische Region der *Cryptococcus neoformans* AC *CAC1* komplementierte die *cdc35Δ/cdc35Δ* Nullmutante und stellte die Fähigkeit CO₂ wahrzunehmen wieder her. Die Detektion von CO₂ durch AC scheint sowohl in *Candida albicans* als auch in *Cryptococcus neoformans* konserviert.

3.13. Expression und Aufreinigung von CnCac1p als GST-Fusionsprotein in

E. coli

Zur Aufreinigung von Protein sollte das *CAC1*₁₇₂₁₋₂₂₇₁ Fragment, wie auch das kürzere *CAC1*₁₈₂₄₋₂₂₇₁ Fragment in pGEX-6P-2 kloniert und das Protein als Fusionsprotein an GST exprimiert werden. Hierzu wurden beide Fragmente mit den Primern CnCAC1F und CnCAC1-R bzw. CnCAC2F und CnCAC1-R amplifiziert und in pCR2.1 – TOPO kloniert. Die Primerpaarung enthält im Gegensatz zu den vorher genutzten Primern kein ATG Startcodon und keinen 6x *His-Tag*. Die entstandenen Plasmide wurden pCR2.1 F1R1GEX bzw. pCR2.1 F2R1GEX benannt, zum Ausschluss von Mutationen sequenziert und mit den Genomdatenbanken verglichen. Im Anschluss wurden beide Plasmide mit einem *Bam*HI/ *Eco*RI verdaut, die *CAC1* Fragmente aufgereinigt und in die *Bam*HI/ *Eco*RI Schnittstellen von pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences) ligiert.

Korrekte Klone wurden durch einen diagnostischen *PstI* Verdau identifiziert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte analog zu CaNCE103p (vgl. Abschnitt 3.3) in *E. coli* BL21(DE3) nach Angaben des Herstellers. Die Eluate wurden mit 50% Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.



Die so generierten GST-CAC1 Fusionsproteine sollten für spätere enzymkinetische Untersuchungen bereit gestellt werden. Dabei sollte analog zu CaCdc35p die Fähigkeit CO_2 bzw. HCO_3^- zu detektieren und den *second messenger* cAMP zu generieren untersucht werden (vgl. Abschnitt 4.6f sowie Abb. 4.3).

4. Diskussion

4.1. CO₂ als Umweltsignal

Die Detektion von Umweltsignalen und die entsprechende zelluläre Reaktion ist eine zentrale und für das Überleben aller Lebewesen essentielle Fähigkeit. Humanpathogene Pilze, als ubiquitär vorkommende Organismen, müssen hochgradig verschiedene Umweltbedingungen – innerhalb und außerhalb des menschlichen Wirtes – erkennen und sich entsprechend anpassen. Folglich erlaubt das Verständnis der molekularen Signalrezeption, Signaltransduktion und der entsprechenden Reaktionskaskaden Einblicke in Wachstum, Differenzierung und Zelltod und eröffnet Möglichkeiten, diese durch neue, spezifische Wirkstoffe zu beeinflussen.

Kohlenstoffverbindungen bilden die Grundlage des Lebens, wie wir es kennen. Dabei spielen inorganische Kohlenstoffverbindungen wie CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ und CO₃²⁻ bei der Decarboxylierung und Carboxylierung von organischen Verbindungen eine unerlässliche Rolle (Raven, 2006). Diese Reaktionen tragen wesentlich zum biogeochemischen Kohlenstoffkreislauf von über 10¹⁵ mol Kohlenstoff pro Jahr bei (Raven, 2006). CO₂ als Substrat der Ribulose - 1,5 - bisphosphat - carboxylase/ - oxygenase (Rubisco), dem mengenmäßig häufigstem Protein der Erde, ist zentrales Element der Photosynthese, im Speziellen der Dunkelreaktion, bei der Kohlenstoffdioxid in Kohlenhydraten fixiert wird (Lüttge, 2007; Stryer, 1996). Die Zellatmung und nicht zuletzt die Zufuhr von CO₂ als Ergebnis der Verbrennung fossiler Brennstoffe in die Atmosphäre erzeugen in zunehmenden Maße CO₂ als dominierende inorganische Kohlenstoffverbindung (Hetherington und Raven, 2005), was bewirkt, dass CO₂ nach Wasserdampf das zweithäufigste Treibhausgas, gefolgt von Methan, Stickstoffdioxid, Fluorkohlenwasserstoffen und Schwefelverbindungen ist (Rohde, 1990). Als Signalmolekül spielt CO₂ bzw. HCO₃⁻ in vielen Organismen eine Rolle: So können Gelbfieber übertragende, weibliche Moskitos der Art *Aedes aegypti* schon geringe CO₂ Konzentrationsunterschiede von 0,05% (zu 0,033% atmosphärische CO₂ Konzentration), wie sie auf der Hautoberfläche des Menschen vorkommen, wahrnehmen und gezielt darauf reagieren (Dekker *et al.*, 2005). Ebenso detektiert der Malaria Vektor *Anopheles gambiae* CO₂ als Erkennungssignal seines Wirtes durch ein

spezialisiertes olfaktorisches Epithel (Lu *et al.*, 2007). *Drosophila* nimmt in ähnlicher Weise CO₂ als Stresssignal seiner Artgenossen durch einen distinkten G-Protein gekoppelten Rezeptor wahr (Suh *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007). Eine interessante Arbeit durch Hu *et al.* (2007) zeigte, dass auch Mäuse CO₂ Konzentrationen wenig oberhalb der natürlichen atmosphärischen Konzentration feststellen können. Dabei exprimieren spezialisierte olfaktorische Neuronen jeweils eine Carboanhydrase der Klasse II und eine Guanylyl Cyclase D, welche durch erhöhte CO₂ Konzentrationen von 0,066% aktiviert werden können. Ein Einfluss auf das Verhalten konnte bis dato nicht gezeigt werden (Hu *et al.*, 2007). Im Menschen haben CO₂ Signalmechanismen entscheidenden Einfluss auf physiologische Prozesse wie Atmung und Vigilanz. Williams *et al.* (2007) ist es gelungen nachzuweisen, dass Orexin exprimierende Neurone im Hypothalamus aufgrund von CO₂ Fluktuationen elektrophysiologische Veränderungen vollziehen und Einfluss auf die Atemtätigkeit nehmen. Ein weiteres Beispiel CO₂ abhängiger Signaltransduktionskaskaden in Säugern ist die durch Bikarbonat aktivierbare lösliche Adenylylcyclase, welche Funktionen u.a. bei der Aktivierung von Spermatozoen besitzt (Chen *et al.*, 2000; Buck *et al.*, 1999). Als Stimulus von Virulenzfaktoren in Bakterien kann CO₂ die Expression der Polysaccharidkapsel in *Bacillus anthracis* induzieren (Mignot *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 1988). Kürzlich konnten Hyde *et al.* (2007) CO₂ als physiologisches Signal für die Regulierung des Transkriptom in *Borrelia burgdorferi* identifizieren. Dabei ist zu erwähnen, dass *Borrelia burgdorferi* einer Vielzahl unterschiedlicher Umweltbedingungen (und damit CO₂ Konzentrationen) während des komplizierten Lebenszyklus' ausgesetzt und die Expression von Virulenzfaktoren zum Teil eng an die gegebenen CO₂ Werte gekoppelt ist (Hyde *et al.*, 2007). Weiterhin finden sich CO₂ induzierbare Gene in *Streptococcus pyogenes* und *Pseudomonas spezies* (Caparon *et al.*, 1992; Stretton *et al.*, 1996; Übersicht in Stretton und Goodman, 1998).

Candida albicans reagiert auf die Bebrütung in einer Atmosphäre mit erhöhtem CO₂ Partialdruck mit der Ausbildung von Keimschläuchen. Diese Reaktion kann teilweise durch HCO₃⁻ imitiert werden, N₂ hat keinen Einfluss auf das Filamentationsverhalten (Sheth *et al.*, 2005; Mock *et al.*, 1989). Auch *Coccidioides immitis* und *Mucor* spp. reagieren mit Veränderungen im Wachstumsverhalten und Morphologie auf erhöhte CO₂ Konzentrationen der Umwelt (Lones und Peacock, 1959;

Bartnicki-Garcia und Nickerson, 1962). Erst kürzlich wurde für *Pneumocystis jiroveci* gezeigt, dass CO₂ die Suszeptibilität des Erregers für antimikrobielle Substanzen herabsetzt (Joffrion *et al.*, 2006). *Cryptococcus neoformans* bildet bei Bebrütung unter CO₂ verglichen zu aeroben Bedingungen bereits nach 3 Stunden eine deutlich stärkere Polysaccharidkapsel aus (Zaragoza *et al.*, 2003; Granger *et al.*, 1985). *C. albicans* und auch *C. neoformans* als humanpathogene Pilze müssen in der Lage sein, erfolgreich hochgradig verschiedene Wirtsnischen zu besiedeln, wobei sich die CO₂ Konzentration in den verschiedenen Geweben dramatisch unterscheidet. So beträgt die CO₂ Konzentration im Blut ca. 5%, auf der Haut jedoch deutlich weniger (Guyton und Hall, 2000; Frame *et al.*, 1972). Sheth *et al.* (2005) konnten zeigen, dass 208 klinische Isolate von *C. albicans* eine gesteigerte Filamentation und Invasion in die Agaroberfläche des Mediums nach Bebrütung unter 5% CO₂ vorweisen. Dabei zeigen andere *Candida* spp. keine oder eine abgeschwächte Antwort auf dieses Umweltsignal (Sheth *et al.*, 2005). Eine medizinisch interessante Beobachtung zeigte, dass okklusive Verbände der Haut den lokalen CO₂ Partialdruck erhöhen und somit die Suszeptibilität für lokale Pilzinfektionen durch Dermatophyten und *Candida* gesteigert wurde (Allen und King, 1978).

4.2. Identifikation einer Carboanhydrase in *Candida albicans*

Carboanhydrasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, welche die CO₂/ HCO₃⁻ Homöostase katalysieren. Die zu *Candida albicans* phylogenetisch eng verwandte Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert eine β-Carboanhydrase (*ScNCE103*, *YNL036w*), die zuerst durch Cleves *et al.* (1996) als Substrat eines nicht-klassischen Sekretionsmechanismus beschrieben wurde, der unabhängig von Endoplasmatischem Retikulum und Golgiapparat arbeitet. Götz *et al.* (1999) beschrieben folgend den Phänotyp einer homozygoten Deletionsmutante (*nce103Δ/nce103Δ*) in *Saccharomyces cerevisiae*, die unter aeroben Bedingungen kein Wachstum, unter anaeroben Bedingungen ein Wildtyp – typisches Wachstumsmuster zeigte. Gleichzeitig zeigte sich eine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂. Eine direkte Carboanhydraseaktivität wurde für ScNce103p jedoch nicht nachgewiesen. Der gezeigte Phänotyp konnte aber durch die Expression einer CA von *Medicago sativa* komplementiert werden. Götz *et al.*

geschlossen aus diesen Beobachtungen, dass ScNce103p für den Schutz vor oxidativem Stress verantwortlich ist. Erst im Jahr 2004 konnten Clark *et al.* nachweisen, dass der Phänotyp der *nce103Δ/nce103Δ* Mutante von der Carboanhydraseaktivität, und weniger von antioxidativen Eigenschaften abhängt. Die *nce103Δ* Nullmutante konnte erfolgreich mit einer Tabak β -CA und einer strukturell verschiedenartigen humanen α -CA komplementiert werden. Cronk *et al.* (2001) zeigten zudem, dass die β -CA *YadF* von *E. coli* die Carboanhydraseaktivität in einem *Saccharomyces cerevisiae nce103Δ* Deletionsstamm ersetzen kann. Der gezeigte Phänotyp wurde in der Arbeit von Clark *et al.* durch den Verlust von HCO_3^- aus den zentralen Reaktionen des Stoffwechselmetabolismus erklärt. CA stellen demnach HCO_3^- als wesentliche inorganische Kohlenstoffquelle für Carboxylationsreaktionen der Gluconeogenese (u.a. Pyruvat-Karboxylase) und der Fettsäuresynthese (u.a. Acetyl-CoA Karboxylase) bereit. Durch den passiven Efflux des sowohl in wässrigen Lösungen als auch in Lipiden löslichen CO_2 aus der Zelle, sinkt die HCO_3^- Konzentration unter das für den Metabolismus notwendige Maß. Die CA ist demnach zur Fixation von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ unter aeroben Bedingungen essentiell, kann aber unter einem erhöhten CO_2 Partialdruck durch die unkatalysierte Hydratation kompensiert werden. Aguilera *et al.* (2005) bestätigten diese Beobachtungen und konnten darüber hinaus zeigen, dass der CO_2 abhängige Phänotyp durch die Zugabe von Produkten verschiedener Carboxylationsreaktionen zumindest teilweise komplementiert werden kann. Letztlich zeigten Amoroso *et al.* (2005) direkte Carboanhydraseaktivität und die Regulation der Expression von *ScNCE103* durch CO_2 .

Durch ein BLASTp Suchverfahren der vorhandenen Genomdatenbank von *C. albicans* konnte in dieser Arbeit eine zu *ScNCE103* homologe Sequenz mit 846bp identifiziert werden. Ein wesentliches Merkmal der Aminosäuresequenz ist die Konservierung eines Motives einer Carboanhydrase der β – Klasse. Die zur Bindung von Zink als Cofaktor essentiellen Aminosäurereste sind Cys-106, His-166 und Cys-169 in *C. albicans* (vgl. Abb. 3.1 und 3.2) Darüber hinaus sind Asp-108 und Arg-110 konserviert, die ebenfalls eine strukturelle oder katalytische Rolle spielen sollen (Hewett-Emmett und Tashian, 1996; Smith und Ferry, 2000; Mitsushashi *et al.*, 2000; Cronk *et al.*, 2001), obwohl das globale Alignment nur eine vergleichsweise geringe Aminosäureidentität zu ScNce103p von 27,5% aufweist. Parallel kann eine

Konservierung der essentiellen Aminosäurereste in CA von *E. coli*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Medicago sativa* und *Cryptococcus neoformans* gefunden werden. Neben *C. neoformans* und *C. albicans* finden sich in den bisher bekannten Genomdatenbanken verschiedener Pilzspezies Carboanhydrasen, insbesondere der β – Klasse mit einer strikten Konservierung der genannten Aminosäuren (Bahn und Mühlshlegel, 2006).

4.3. CaNce103p, eine funktionsfähige Carboanhydrase

Der Nachweis direkter Carboanhydraseaktivität wurde in dieser Arbeit durch Stopped - Flow Untersuchungen erbracht. Aufgereinigtes Nce103 Protein beschleunigt im Experiment die Einstellung des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ Equilibrium gegenüber der passiven chemischen Reaktion. Dieser Effekt lässt sich durch den spezifischen CA - Inhibitor Ethoxzolamid, einem Carboanhydraseinhibitor aus der Gruppe der Sulfonamide, hemmen (vgl. Abb. 3.6). Wie in der Arbeit von Clark *et al.* (2004) gezeigt wurde, konnte die strukturell verschiedenartige α – CAII vom Menschen die *nce103* Nullmutante in *Saccharomyces cerevisiae* komplementieren. In dieser Arbeit sollte dieser Ansatz nachvollzogen und durch die Expression der β – CA *YadF* von *E. coli* ergänzt werden. Jedoch konnte weder die humane CAII, noch die bakterielle CA *YadF* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *Candida* Promotors $\text{EF}\alpha$ die *nce103\Delta* Nullmutante ergänzen. Die wahrscheinliche Erklärung liegt hier in der Tatsache, dass in *C. albicans* das Codon CUG *in vivo* nicht die Aminosäure Leucin sondern Serin kodiert (Santos und Tuite, 1995; Gomes *et al.*, 2007). Die humane CAII besitzt insgesamt 11 CUG Codons, *E. coli* *YadF* 13 CUG Codons, die folgerichtig in *C. albicans* nicht mit Leucin, aber mit Serin übersetzt werden. Durch diesen Austausch ist das humane bzw. bakterielle Protein möglicherweise in *C. albicans* nicht aktiv. In *Saccharomyces* hingegen konnte sowohl die humane CAII, *E. coli* *YadF*, eine Tabak CA und *Medicago sativa* CA die *nce103\Delta* Nullmutante komplementieren (Clark *et al.*, 2004; Slaymaker *et al.*, 2002; Cronk *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 1996).

4.4. Funktionsanalyse von CaNce103p – wozu Carboanhydrasen ?

Zur Funktionsbestimmung wurden homozygote *NCE103 knock-out* Stämme hergestellt. Dabei wurde das offene Leseraster in zwei Ausgangsstämmen, welche Derivate des Wildtypstammes SC5314 darstellen, durch die Integration von Markerkassetten disruptiert. Der Phänotyp der homozygoten Disruptionsmutanten war sowohl im Stamm BWP17 als auch im Stamm CAI4 gleichartig. Herausragendes Merkmal dieses Phänotyps ist ein Wachstumsdefekt der Nullmutanten unter aeroben Bedingungen, der durch die Bebrütung der Stämme in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre komplementiert werden kann. Dabei ist die Disruption von *NCE103* in *C. albicans* nicht letal, was initiale – frustrane – Transformationen nahe legen. Das Ausbleiben des Wachstums der Mutanten an Luft kann nach einem Wechsel in eine mit 5% CO₂ ergänzte Atmosphäre aufgehoben werden. *C. albicans* benötigt also Carboanhydraseaktivität in Wirtsnischen mit limitiertem CO₂ Partialdruck, wie es z.B. auf der Hautoberfläche der Fall ist. Einen vergleichbaren Phänotyp fanden Hashimoto und Kato (2003) nach der Disruption der β -CA *YadF* in *E. coli*. Merlin *et al.* fragten 2003, „Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*?“ und zeigten, dass CO₂ (im Equilibrium mit HCO₃⁻) für die Synthese kleiner Moleküle wie Arginin, Pyrimidine und Purine, für die Synthese von Fettsäuren und für zentrale Metabolismusreaktionen essentiell ist. HCO₃⁻ kann wiederum nur durch die Hydratation von CO₂ gewonnen werden bzw. entsteht durch Decarboxylationsreaktionen innerhalb des Stoffwechsels. Die unkatalysierte Reaktion von CO₂ zu HCO₃⁻ ist unter Bedingungen mit entsprechend hohen CO₂ Partialdrücken ausreichend, um die Stoffwechselaktivität zu gewähren, kann aber die Nachfrage nach HCO₃⁻ unter limitierenden Bedingungen nicht decken. Merlin *et al.* berechneten, dass in *E. coli* eine 10³ bis 10⁴ höhere HCO₃⁻ Konzentration für das Wachstum auf Minimalmedium an Luft benötigt wird, als durch die unkatalysierte Reaktion bereit gestellt wird. Sie beantworteten die Frage nach der Funktion der CA *YadF* in *E. coli* mit der Notwendigkeit der HCO₃⁻ Fixation in der Zelle. Der Phänotyp der *nce103* Δ Nullmutante lässt einen vergleichbaren Mechanismus vermuten. Gestützt wird diese Hypothese durch die Arbeit von Mitsuhashi *et al.* (2003), die einen CO₂ abhängigen Phänotyp nach der Deletion einer β -CA in *Corynebacterium glutamicum* beschreiben.

Auch Kusian *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Carboanhydraseaktivität in *Ralstonia eutropha* unter aeroben Wachstumsbedingungen essentiell ist. Interessanterweise berichten Watsuji *et al.* (2006), dass *Symbiobacterium thermophilum*, ein mit *Bacillus* spp. syntroph wachsendes Bakterium, nur unter erhöhtem CO₂ Partialdruck in Monokultur wachsen kann. Eine mögliche Erklärung liegt dabei in einem genetischen Defekt der *S. thermophilum* CA, der durch die endogene CO₂ Produktion des gleichzeitig kultivierten *Bacillus* Stammes kompensiert wird. Kusian und Kollegen (2002) berichten von einer Mutation der putativen β – CA Can im Stamm 25-1 von *Ralstonia eutropha* welche die hochkonservierte Aminosäure Glycin-98 durch Aspartat austauscht und damit zu einer Inhibition der CA – Aktivität und zu einem Wachstumsdefekt an Luft führt. Weitere Berichte von Sein und Aikawa (1998) und von Valdivia und Falkow (1997) unterstützen diese Beobachtungen. Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* benötigt als obligat intrazellulärer Parasit, CO₂ für Wachstum und Überleben und exprimiert eine CA welche durch spezifische Inhibitoren gehemmt werden kann. Dies geht mit einer reduzierten Virulenz des Erregers einher (Sein und Aikawa, 1998). Die Verbindung von CA – Aktivität und Virulenz konnte auch durch die Arbeit von Valdivia und Falkow (1997) gezeigt werden. In dieser Studie wurden Genpromotoren ermittelt, welche durch die Erreger - Wirt Interaktion des fakultativ intrazellulären Erregers *Salmonella typhimurium* induziert wurden. Für eine zu *E. coli* *YadF* homologe Carboanhydrase wurde eine 24fache Induktion der Expression in Makrophagen gefunden. Die Disruption des CA - Genes in *S. typhimurium* zeigte eine Notwendigkeit der Carboanhydrase für das Überleben in einem murinen Tiermodell (Valdivia und Falkow, 1997).

Der Phänotyp der hergestellten *C. albicans* *NCE103* Nullmutanten zeigt eine Abhängigkeit des Wachstums von steigenden CO₂ Konzentrationen (vgl. Abb. 3.14). Dies lässt sich mit der Hypothese der HCO₃⁻ Restriktion und des daraus resultierenden Mangels an benötigten Intermediaten für die DNA Replikation und das Wachstum erklären. Steigende CO₂ Konzentrationen stellen zunehmend HCO₃⁻ für die entsprechenden Stoffwechselfvorgänge bereit und ermöglichen der Zelle die Replikation und anschließende Zellteilung. Der demonstrierte Phänotyp ist nicht vom pH Wert des Mediums abhängig. Ein pH Wert von 9, wie in Abb. 3.15 gezeigt, inhibiert das Wachstum von *C. albicans* an sich, wobei eine Bebrütung unter 5% CO₂ durch die

Ansäuerung des Mediums zu (wenn auch limitiertem) Wachstum führt. Der Wachstumsdefekt an Luft ist stabil unter Bebrütung auf verschiedenen Nährmedien und unter Zusatz von NaHCO_3^- , was auf eine Evaporation des entstehenden CO_2 zurückzuführen sein kann. Wie auch schon durch Merlin *et al.* gezeigt wurde, kann eine komplette Stickstoffatmosphäre den Phänotyp nicht beeinflussen, es besteht eine CO_2 Abhängigkeit (Abb. 3.17). Aguilera *et al.* beschrieben 2005 die teilweise Komplementation der *Saccharomyces cerevisiae nce103Δ* Nullmutante mit L-Aspartat, Fettsäuren, Uracil und L-Arginin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Intermediate des Krebszyklus und einzelne Aminosäuren für sich keinen Einfluss auf das Wachstum der *nce103Δ* Nullmutante haben. Analog konnte Aguilera *et al.*, 2005 keine Komplementation der *Saccharomyces cerevisiae nce103Δ* Nullmutante mit einzelnen Intermediaten zeigen. Erst eine Kombination aus verschiedenen Intermediaten und Produkten des Metabolismus in entsprechend hoher Konzentration kann die *nce103Δ* Nullmutante komplementieren (Mühlschlegel, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies stützt die Hypothese, dass der Wachstumsdefekt durch Depletion von HCO_3^- auf mehreren Ebenen des Metabolismus verursacht wird (vgl. Abb. 3.18 und 3.19). Die zuerst durch Götz *et al.* (1996) geäußerte These, dass ScNce103p für den Schutz vor oxidativem Stress verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Sowohl Nullmutante, Komplementation, als auch der Wildtypstamm zeigen eine gleiche Suszeptibilität gegenüber dem zytotoxischen Wasserstoffperoxid (Abb. 3.20). Dies bestätigt die Beobachtung von Clark *et al.* aus dem Jahr 2004. Carboanhydrasen lassen sich spezifisch durch Sulfonamide, wie z.B. Ethoxzolamid hemmen (Hardman *et al.*, 2001). Wie in Abb. 3.21 dargestellt, hemmt 1mM Ethoxzolamid das Wachstum des Wildtypstammes an Luft. Dabei zeigt sich, dass die Komplementation der *nce103* Nullmutante mit nur einem Allel diskret stärker auf die Inhibition der CA reagiert. Ein erhöhter CO_2 Partialdruck überkommt die Inhibition der CA durch Ethoxzolamid, da in diesem Fall die katalytische Aktivität von Nce103p nicht mehr benötigt wird (Abb. 3.21). Ein interessantes Ergebnis erbrachte eine kürzlich durchgeführte Untersuchung zur Biofilmbildung durch *Candida albicans*: *C. albicans* formt auf abiotischen Oberflächen wie Verweilkathetern und auf mucosalen Oberflächen Biofilme, die sich durch eine starke Schicht extrazellulärer Matrix auszeichnen und als ein wesentlicher Virulenzfaktor angesehen werden, da sie

insbesondere einer antimikrobiellen Therapie schwer zugänglich sind (Calderone 2002). Durch eine genomweite Transkriptionsstudie wurden Gene identifiziert, die in den frühen Stadien der Biofilmbildung (30 bis 390 Minuten) reguliert werden. Dabei wird *NCE103* zwischen 3,2fach (30min) und 8,1fach (270min) höher exprimiert, obwohl alle Experimente unter 5% CO₂ Atmosphäre durchgeführt wurden (Murillo *et al.*, 2005). Murillo *et al.* verbinden diese Beobachtung mit der potentielle Rolle von *NCE103* in oxidativen Mechanismen. Diese Beobachtung wurde 2007 durch Yeater *et al.* in einer erweiterten Analyse zur Biofilmbildung in *C. albicans* bestätigt. Auch in dieser Arbeit fand sich *NCE103* während der ersten Phasen der Biofilmbildung stärker exprimiert, eine mögliche Erklärung dieser Regulation wurde nicht gegeben, zeigt aber die Verknüpfung der fungalen CA zur Virulenz des Erregers außerhalb CO₂ limitierter Wirtsnischen, wie es auch für *Salmonella typhimurium* durch Valdivia und Falkow (1997) gezeigt wurde. In einer Studie von Bahn *et al.* (2005), wurde die Carboanhydrase *CAN2* in *Cryptococcus neoformans* analog zur vorliegenden Arbeit als grundlegender Modulator normalen Wachstums unter atmosphärischen Bedingungen gefunden. Die Notwendigkeit zur Bereitstellung inorganischen Kohlenstoffes vermuteten auch Bahn *et al.* (2005) als Ursache des gezeigten Wachstumsdefektes, wobei er durch den Zusatz von Palmitinsäure den Wachstumsdefekt zumindest teilweise aufheben kann, was auf die Beeinflussung insbesondere der Fettsäuresynthese durch die Ausschaltung der Carboanhydrase hinweist.

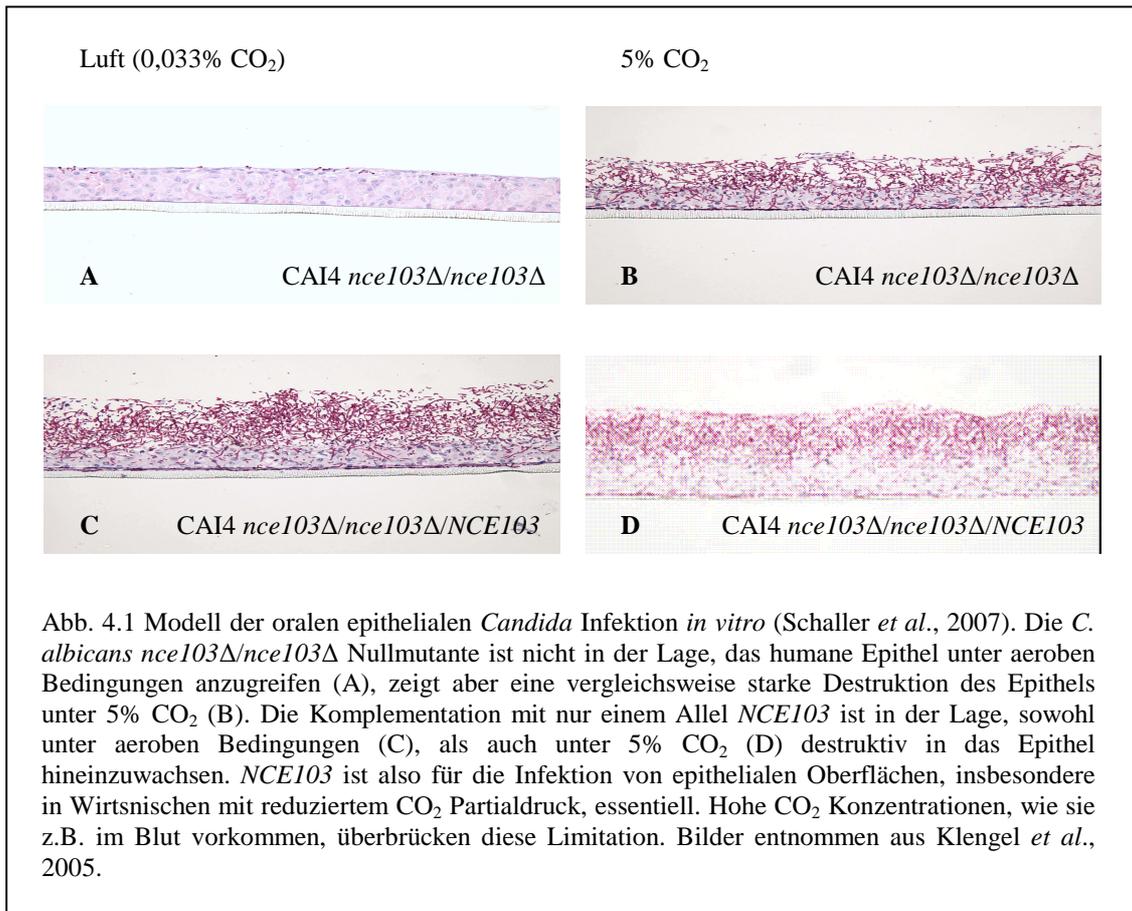
In den letzten Jahren entstanden zunehmend Bestrebungen CA – Inhibitoren als antimikrobielle Substanzen zu etablieren. Insbesondere Supuran (2007) betont, dass CA – Inhibitoren durch selektive Hemmung bakterieller, parasitärer oder fungaler CA neue antimikrobielle Substanzen darstellen können.

4.5. Expressionsanalysen – *CaNCE103* ein Virulenzfaktor

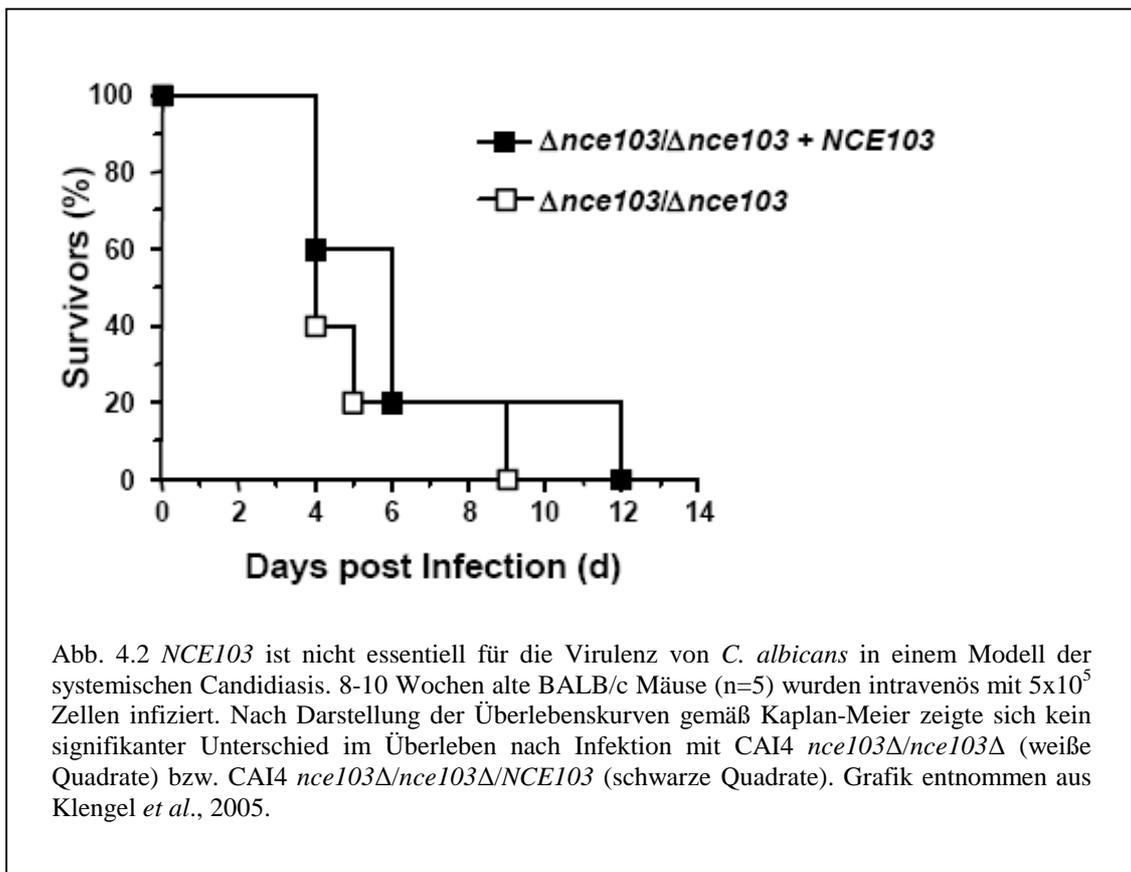
Analysen mittels Northernblot zeigten im Referenzstamm SC5314 keine differenzierte Expression von *NCE103* unter 0,033% bzw. 5% CO₂ (vgl. Abb. 3.11), was auf eine äußerst diskrete Regulation der *NCE103* Expression hinweisen kann. Aguilera *et al.* (2005) konnten durch die Untersuchung der genomweiten Transkription mittels Microarraytechnologie zeigen, dass *ScNCE103* unter erhöhten CO₂ Konzentrationen

signifikant schwächer transkribiert wird. Analog demonstrierten Amoroso *et al.* (2005) eine gesteigerte Transkription von *ScNCE103* unter CO₂ limitierten Bedingungen. Auch Götz *et al.* konnten 1996 durch eine *ScNCE103* Promotor – *lacZ* Fusion zeigen, dass unter aeroben Bedingungen eine nur schwache Transkription zu detektieren, unter anaeroben Wachstumsbedingungen kein Signal zu finden ist. Neueste Ergebnisse beweisen, dass die Expression von *CaNCE103* an Luft im Vergleich zu CO₂ angereicherten Bedingungen, 1,75fach höher reguliert ist (Bolstad und Mühlshlegel, Abstract, FEBS Advanced Lecture Course, Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, Frankreich 11.-17. Mai 2007). Hier liegt möglicherweise eine unzureichende Sensitivität der in dieser Arbeit gewählten Northernblotmethode vor.

Die Expression von *C. albicans NCE103* unter dem konstitutiv aktiven Promotor *EF α* zeigte im Northernblot erwartungsgemäß eine deutlich gesteigerte Transkription im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 3.12). Der Phänotyp der Überexpressionsmutante präsentierte eine deutliche Zunahme der Filamentation sowohl unter aeroben Bedingungen als auch unter 5% CO₂. Parallel zeigt sich eine gesteigerte Invasion der Überexpressionsmutante in den Agar. (vgl. Abb. 3.22). In Kollaboration mit Julian R. Naglik (Department of Oral Medicine, Pathology and Immunology; GKT Dental Institute; King's College London, London, UK) konnte in einem experimentellen Modell epithelialer *Candida* Infektion zur Bestimmung der Virulenz unter atmosphärischen Bedingungen gezeigt werden, dass die *nce103* Δ Nullmutante nicht in der Lage ist, das orale Epithel *in vitro* anzugreifen, wenn die CO₂ Konzentration des Inkubationsgases bei 0,033% liegt (Abb. 4.1 A). Hingegen ist eine Kopie des *NCE103* Gens hinreichend, um sowohl an Luft, als auch unter 5% CO₂ eine Invasion der Epitheloberfläche zu bewirken (Abb. 4.1 C, D) (Klengel *et al.*, 2005).



Im Tiermodell zeigte sich analog, dass am Beispiel einer systemischen Candidiasis die Funktion der Carboanhydrase nicht essentiell ist (in Kooperation mit Klaus Schröppel, Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Erlangen, Deutschland) (Abb. 4.2). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass im vaginalen Infektionsmodell, wie auch im Modell einer pulmonalen Infektion aufgrund hoher, und für das Wachstum der *nce103Δ* Nullmutante ausreichender CO₂ Konzentration, kein Effekt des *NCE103 knock – out* zu beobachten ist (Klengel *et al.*, 2005). *NCE103* ist also in spezifischen, durch eine quantitativ geringe CO₂ Konzentration gekennzeichneten Wirtsnischen notwendig, aber unter Bedingungen mit ausreichender Kohlendioxidkonzentration entbehrlich.



4.6. *Cryptococcus neoformans* Adenylylcyase detektiert CO₂ in *C. albicans* *cdc35Δ/cdc35Δ*

Die Disruption der Adenylylcyase *CDC35* in *C. albicans* resultiert in einem CO₂ insensitivem Wachstumsmuster, welches durch die Zugabe von exogenem cAMP komplementiert werden kann. *Cryptococcus neoformans* *CAC1* Adenylylcyase wurde als Fragment der Aminosäuren 1721-2271, sowie als geringfügig kürzeres Fragment der Aminosäuren 1824-2271 in *C. albicans* CR276 (*cdc35Δ/cdc35Δ*) unter dem konstitutiv aktiven *EFα* Promotor exprimiert und konnte dabei die CO₂ Detektion in *C. albicans* wieder herstellen. Hier zeigt sich eine über die Gattung *Candida* hinausgehende Funktion fungaler Adenylylcyasen zur Detektion und Vermittlung des Umweltstimulus CO₂.

4.7. CO₂ aktiviert Adenylylcyclasen

Der *second messenger* cyclisches Adenosin – 3', 5' – MonoPhosphat (cAMP) ist integraler Bestandteil vieler zellulärer Signaltransduktionskaskaden und führt insbesondere zur Aktivierung von Proteinkinasen (Alberts *et al.*, 2002). *C. albicans* besitzt eine Adenylylcyclase (*CDC35*, *CYRI*), welche die überwiegende Mehrzahl umweltbezogener Stimuli und die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen zu filamentösem Wachstum vermittelt (Biswas *et al.*, 2007). Rocha *et al.* zeigten 2001, dass *cdc35Δ* Nullmutanten nicht in der Lage sind, filamentöses Wachstum zu entwickeln. Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *cdc35Δ* Nullmutanten sowohl in einem Tiermodell der systemischen Candidiasis, als auch in einem Modell der epithelialen Infektion avirulent sind. Exponiert man *cdc35Δ* Nullmutanten in 5% CO₂ zeigt sich keine Reaktion im Sinne von filamentösem Wachstum oder der Invasion der Agaroberfläche. Hingegen können *ras1Δ* Mutanten Pseudohyphen, bzw. echte Hyphen ausbilden und in den Agar hineinwachsen (Klengel *et al.*, 2005). Die Deletion von *RAS1* kann also umgangen werden, die Adenylylcyclase *CDC35* ist jedoch für die CO₂ induzierte Morphogenese unentbehrlich (Klengel *et al.*, 2005).

In Säugerzellen wird cAMP durch zwei evolutionär verwandte Familien von Adenylylcyclasen produziert (Kamenetsky *et al.*, 2006). Transmembrangebundene AC (tmAC) sind heterotrimere G Proteine, welche extrazelluläre Signale durch G Protein - gekoppelte Rezeptoren wahrnehmen. Auf der anderen Seite wurde 1999 von Buck und Kollegen erstmals eine lösliche, nicht membrangebundene Adenylylcyclase (sAC – soluble AC) beschrieben, welche durch intrazelluläre Signalmoleküle wie Kalzium und Bikarbonat aktiviert werden kann. Die katalytische Domäne der sAC in Säugern ist den katalytischen Anteilen der bakteriellen AC näher verwandt, als anderen eukaryotischen Adenylylcyclasen (Kobayashi *et al.*, 2004; Buck *et al.*, 1999). Steegborn *et al.* zeigten 2004, wie HCO₃⁻ eine strukturelle Änderung des sAC Moleküls und damit eine Aktivierung der löslichen Adenylylcyclase bewirkt. Für *Candida albicans* als auch für *Cryptococcus neoformans* konnte gezeigt werden, dass CaCdc35p bzw. CnCac1p direkt durch HCO₃⁻ aktiviert werden kann (Ruoff, C., Medizinische Doktorarbeit, Universität Würzburg; Klengel *et al.*, 2005; Gewiss Mogensen *et al.*, 2006; vgl. Abb. 4.3). Damit

zeigen Adenylylcyclasen aus dem Reich der Pilze eine Verwandtschaft zu löslichen AC (sAC), welche u.a. auch in Cyanobakterien, Mykobakterien und *Plasmodium falciparum* gefunden werden können (Bahn und Mühlshlegel, 2006; Cann *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000; Buck *et al.*, 1999). Damit kann eine Verbindung von CO₂ induziertem Polymorphismus und cAMP Signaltransduktionskaskaden etabliert werden.

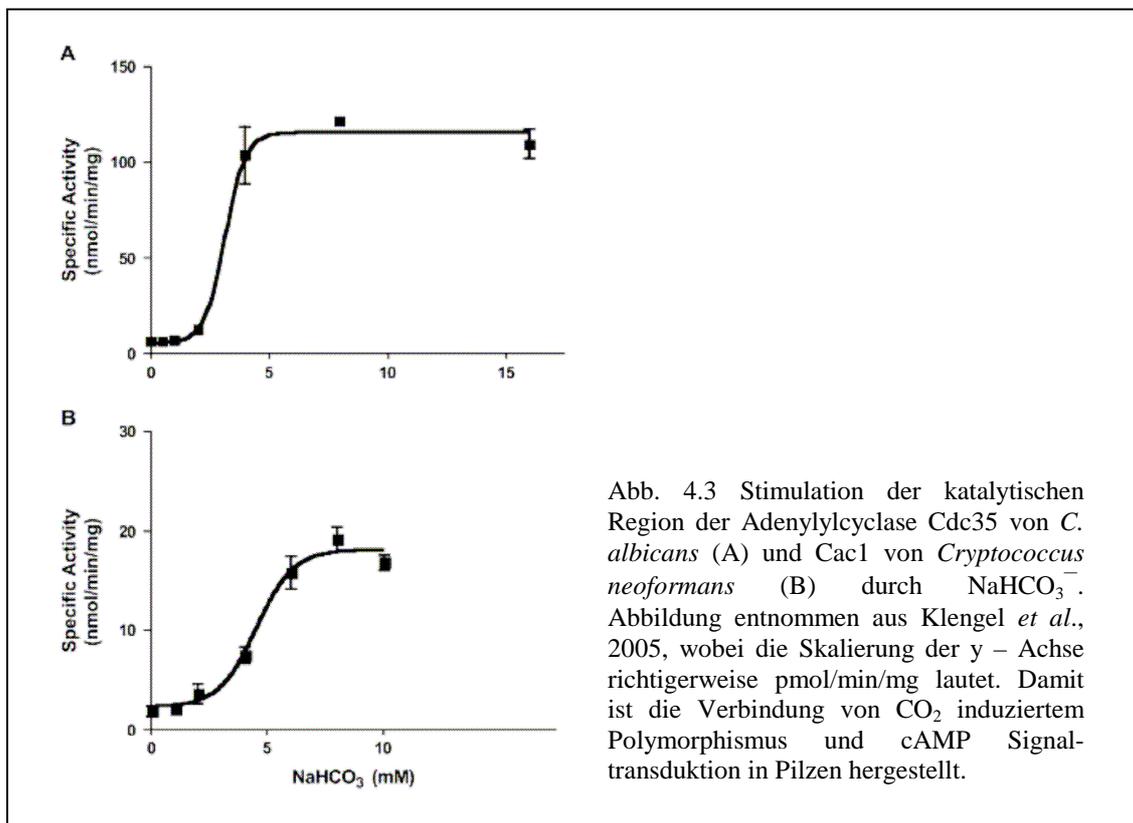


Abb. 4.3 Stimulation der katalytischen Region der Adenylylcyclase Cdc35 von *C. albicans* (A) und Cac1 von *Cryptococcus neoformans* (B) durch NaHCO₃⁻. Abbildung entnommen aus Klengel *et al.*, 2005, wobei die Skalierung der y – Achse richtigerweise pmol/min/mg lautet. Damit ist die Verbindung von CO₂ induziertem Polymorphismus und cAMP Signaltransduktion in Pilzen hergestellt.

Kürzlich zeigten Hammer *et al.* (2006), dass neben den HCO₃⁻ auch eine direkte CO₂ abhängige Stimulation von AC in Cyanobakterien vorhanden ist.

4.8. Aquaporine greifen nicht in den CO₂ Fluss von *C. albicans* ein

Aquaporine sind integrale Membranproteine mit 6 Transmembrandomänen, die Poren formen durch welche die Wasserhomöostase der Zelle vermittelt wird (Kruse *et al.*, 2006). Aquaporine kommen in nahezu allen Organismen vor, insbesondere sind Aquaporine in Säugern, Pflanzen, aber auch Hefezellen charakterisiert (Uehlein *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2006). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass volatile Gase wie

CO₂ und NH₃ nicht ausschließlich passiv die Lipidschicht biologischer Membranen passieren, sondern mit Hilfe von Aquaporinen die Membranbarriere überwinden (Uehlein *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2002). *C. albicans* besitzt ein offenes Leseraster (*AQY1*) mit Homologien zu Aquaporinen. Carbrey *et al.* konnten 2001 zeigen, dass *AQY1* einen funktionellen Aquaporin in *C. albicans* darstellt, ohne jedoch Einfluss auf Wasserhomöostase und Virulenz auszuüben. In einer Arbeit von Tanghe *et al.* (2005) wurde die Funktion von *AQY1* mit der Toleranz gegenüber Temperaturen unter 0°C verknüpft, was für das Überleben außerhalb des menschlichen Wirtes essentiell sein kann. In der vorliegenden Arbeit konnte kein wesentlicher Einfluss der *ayq1Δ* Nullmutante auf die CO₂ induzierte Morphogenese nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigt die *ayq1Δ* Nullmutante gegenüber dem Wildtypstamm kein abgeschwächtes Filamentationsverhalten nach Stimulierung mit 5% CO₂. Cooper *et al.* schlossen aus unterschiedlichen Permeabilitäten und der physiologischen Relevanz des Aquaporin vermittelten Gastransportes in der Maus, dass abhängig von der Zusammensetzung, der „Gasleitfähigkeit“ der Zellmembran und dem Bedarf an volatilen Gasen der jeweiligen Gewebe, ein erleichterter, Aquaporin vermittelter Gastransport stattfindet, oder ein passiver Flux über die Zellmembran ausreichend ist (Cooper *et al.*, 2002). Insgesamt muss man feststellen, dass die physiologische Funktion von Aquaporinen sowohl in Pilzen als auch in anderen Mikroorganismen nach wie vor unklar ist (Tanghe *et al.*, 2006).

5. Zusammenfassung

Die Detektion von Umweltsignalen und die gezielte zelluläre Reaktion ist eine zentrale und für das Überleben aller Lebewesen essentielle Fähigkeit. *Candida albicans*, als dominierender humanpathogener Pilz, ist hochgradig verschiedenen biochemischen und physikalischen Umweltbedingungen ausgesetzt, welche sowohl die Zellmorphologie als auch die Virulenz dieses Erregers beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Kohlendioxid, als ubiquitär vorkommendes Gasmolekül, auf die Zellmorphologie und Virulenz untersucht. Erhöhte Konzentrationen von Kohlendioxid stellen ein äußerst robustes Umweltsignal dar, welches die morphologische Transition vom Hefewachstum zum hyphalen Wachstum, einem Hauptvirulenzfaktor, in *Candida albicans* stimuliert. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle der putativen Carboanhydrase Nce103 durch die Generation von *knock – out* Mutanten untersucht. Die Disruption von *NCE103* in *C. albicans* führt zu einem Kohlendioxid – abhängigen Phänotyp, welcher Wachstum unter aeroben Bedingungen (ca. 0,033% CO₂) nicht zulässt, jedoch unter Bedingungen mit einem erhöhten CO₂ Gehalt von ca. 5% ermöglicht. *NCE103* ist also für das Wachstum von *C. albicans* in Wirtsnischen mit aeroben Bedingungen essentiell. Durch Untersuchungen zur Enzymkinetik mittels Stopped – flow wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Nce103 die Funktion einer Carboanhydrase erfüllt. Die biochemische Funktion dieser Carboanhydrase besteht in der Fixation von CO₂ bzw. HCO₃⁻ in der Zelle zur Unterhaltung der wesentlichen metabolischen Reaktionen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Induktion hyphalen Wachstums durch CO₂ in *C. albicans* nicht durch den Transport von CO₂ mittels des Aquaporins Aqy1 beeinflusst wird. CO₂ bzw. HCO₃⁻ aktiviert in der Zelle direkt eine Adenylylcyclase (Cdc35), welche sich grundlegend von den bisher gut charakterisierten G-Protein gekoppelten Adenylylcyclasen unterscheidet. Die Generation von cAMP beeinflusst in der Folge direkt die Transkription hyphenspezifischer Gene und nachfolgend die morphologische Transition vom Hefewachstum zum elongierten, hyphalen Wachstum. Dieser Mechanismus konnte sowohl in *Candida albicans* als auch in *Cryptococcus neoformans* nachgewiesen werden, was auf einen panfungal konservierten Signaltransduktionsmechanismus schließen lässt (vgl. Auch Abb. 5.1).

Die Inhibition dieser spezifischen Kaskade eröffnet neue Ansätze zur Entwicklung spezifischer antimykotischer Wirkstoffe.

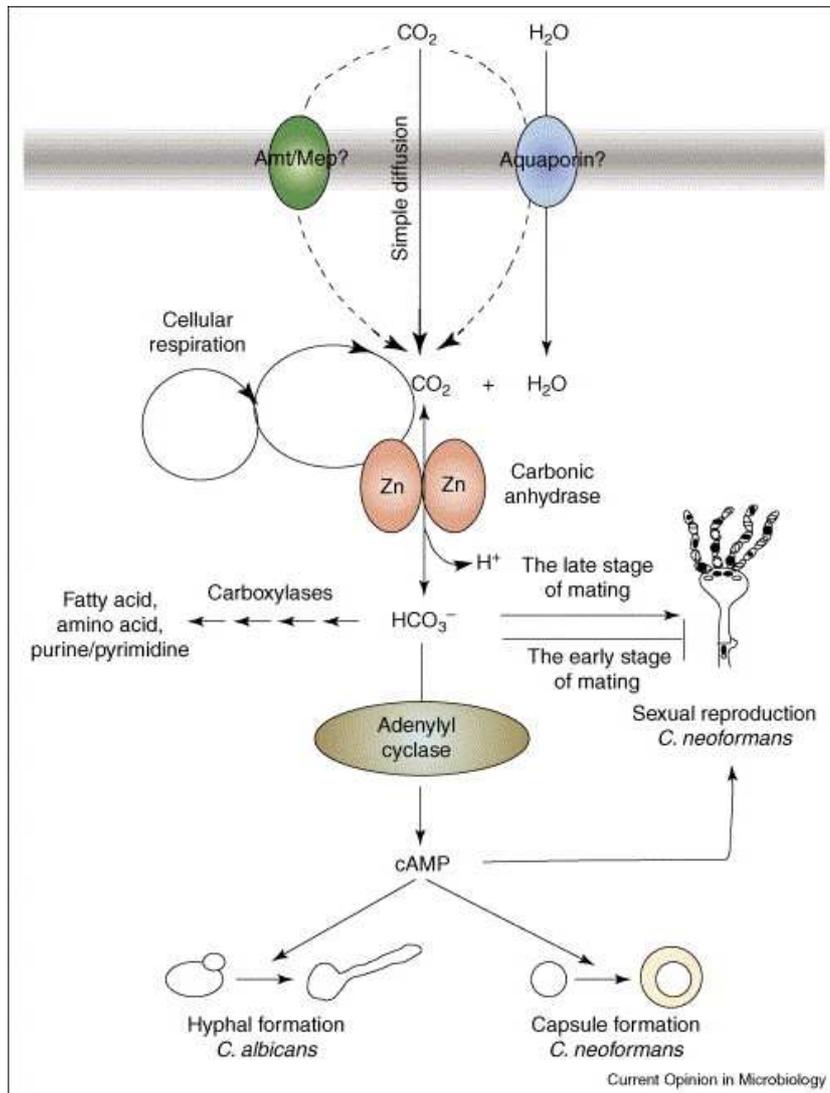


Abb. 5.1 Übersicht zur CO₂ Detektion in *C. albicans* und *C. neoformans*. CO₂ gelangt passiv in die Zelle oder wird möglicherweise über Transporter, wie Aquaporine und Amt/Mep Proteine, in das Zellinnere geleitet. Das Enzym Carboanhydrase konvertiert CO₂ insbesondere in Wirtsnischen mit geringem CO₂ Partialdruck in Bikarbonat, welches auch durch die Zellatmung zur Verfügung gestellt werden kann. Bikarbonat ist für viele zentrale Reaktionen des Stoffwechsels von Bedeutung. Weiterhin aktiviert Bikarbonat lösliche Adenylyl cyclasen, welche über die Bildung von cAMP die morphologische Transition von *C. albicans* vom Hefezellwachstum zum filamentösen Wachstum einleitet. In *C. neoformans* fördert die Generierung von cAMP analog die Bildung der Polysaccharidkapsel und beeinflusst die sexuelle Fortpflanzung (Abbildung entnommen aus Bahn und Mühlshlegel, 2006).

Literaturverzeichnis

1. Aguilera J., Petit T., de Winde J.H., and Pronk J.T. 2005. Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res.* 5: 579-593.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. 2002. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York.
3. Allen A.M., and King J.D. 1978. Occlusion, carbon dioxide, and fungal skin infections. *Lancet* 1: 360-362.
4. Alspaugh J.A. Pukkila-Worley R., Harashima T., Cavallo L.M., Funnell D., Cox G.M., Perfect J.R., Kronstad J.W., and Heitman J. 2002. Adenylyl Cyclase Functions Downstream of the Gα Protein Gpa1 and Controls Mating and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 1: 75-84.
5. Amoroso G., Morell-Avrahov L., Müller D., Klug K., and Sültemeyer D. 2005. The Gene *NCE103* (*YNL036w*) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol. Microbiol.* 56: 549-558.
6. Arnaud M.B., Costanzo M.C., Skrzypek M.S., Binkley G., Lane C., Miyasato S.R., and Sherlock G. 2005. The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucleic Acids Res.* 33: D358-363.
7. Arnaud M.B., Costanzo M.C., Skrzypek M.S., Shah P., Binkley G., Lane C., Miyasato S.R., and Sherlock G. 2007. Sequence resources at the *Candida* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* 35: D452-456.

8. Badger M.R., and Price G.D. 2002. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54: 609-622.
9. Bahn Y.S., and Mühlshlegel F.A. 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 572-578.
10. Bahn Y.S., and Sundstrom P. 2001. *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183: 3211-3223.
11. Bahn Y.S., Cox G.M., Perfect J.R., and Heitman J. 2005. Carbonic Anhydrase and CO₂ Sensing during *Cryptococcus neoformans* Growth, Differentiation, and Virulence. *Curr. Biol.* 15: 2013-2020.
12. Bahn Y.S., Staab J., and Sundstrom P. 2003. Increased high-affinity phosphodiesterase *PDE2* gene expression in germ tubes counteracts *CAP1*-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence in *Candida albicans*. 50: 391-409.
13. Bartnicki-Garcia S. and Nickerson W.J. 1962. Induction of yeastlike development in *Mucor* by carbon dioxide. *J. Bacteriol.* 84: 829-840.
14. Berenguer J., Buck M., Witebsky F., Stock F., Pizzo F.A., and Walsh T.J. 1993. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 103-109.
15. Berman J. 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 595-601.

16. Bille J., Marchetti O., and Calandra T. 2005. Changing face of health-care associated fungal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18: 314-319.
17. Biswas S., Van Dijck P., and Datta A. 2007. Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 348-376.
18. Böhme A., Ruhnke M., Buchheidt D., Karthaus M., Einsele H., Guth S., Heussel G., Heussel C.P., Junghanss C., Kern W.K., Kubin T., Maschmeyer G., Sezer O., Silling G., Südhoff T., Szelényi H., and Ullmann A.J. 2003. Treatment of fungal infections in hematology and oncology. *Ann. Hematol.* 82: S133-S140.
19. Brown A.J.P. and Gow N.A.R. 1999. Regulatory Networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 7: 333-338.
20. Brown Jr. D.H., Giusani A.D., Chen X., and Kumamoto C.A. 1999. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol. Microbiol.* 34: 651-662.
21. Buck J., Sinclair M.L., Schapal L., Cann M.J., and Levin L.R. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 79-84.
22. Buffo J., Herman M.A., and Soll D.R. 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 65: 21-30.
23. Calderone R.A. 2002. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, D.C..

24. Calderone R.A., and Fonzi W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9: 327-335.
25. Cann M.J., Hammer A., Zhou J., and Kanacher T. 2003. A Defined Subset of Adenylyl Cyclases Is Regulated by Bicarbonate Ion. J. Biol. Chem. 37: 35033-35038.
26. Caparon M.G., Geist R.T., Perez-Casal J., and Scott J.R. 1992. Environmental Regulation of Virulence in Group A Streptococci: Transcription of the Gene Encoding M Protein Is Stimulated by Carbon Dioxide. J. Bacteriol. 174: 5693-5701.
27. Carbrey J.M., Cormack B.P., and Agre P. 2001. Aquaporin in *Candida*: characterization of a functional water channel protein. Yeast 18: 1391-1396.
28. Chance B. 2004. The stopped-flow method and chemical intermediates in enzyme reactions – a personal essay. Photosynth. Res. 80: 387-400.
29. Chen S.C.A., and Sorell T.C. 2007. Antifungal agents. Med. J. Aust. 187: 404-409.
30. Chen Y., Cann M.J., Litvin T.N., Iourgenko V., Sinclair M.L., Levin L.R., and Buck J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. Science. 289: 625-628.
31. Clark D., Rowlett R.S., Coleman J.R., and Klessig D.F. 2004. Complementation of the yeast deletion mutant $\Delta NCE103$ by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. Biochem. J. 379: 609-615.
32. Clark T.A., and Hajjeh R.A. 2002. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr. Opin. Infect. Dis. 15: 569-574.

33. Cleves A.E., Cooper D.N.W., Byrondes S.H., and Kelly R.B. 1996. A New Pathway for Protein Export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 5: 1017-1026.
34. Cooper G.J., Zhou Y., Bouyer P., Grichtchenko I.I., and Boron W.F. 2002. Transport of volatile solutes through AQP1. *J. Physiol.* 542: 17-29.
35. Cormack B.P., Bertram G., Egerton M., Gow N.A., Falkow S., and Brown A.J. 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiol.* 143: 303-311.
36. Cronk J.D., Endrizzi J.A., Cronk M.R., O'Neill J.W., and Zhang K.Y.J. 2001. Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein Sci.* 10: 911-922.
37. Csank C., Schröppel K., Leberer K., Harcus D., Mohamed O., Meloche S., Thomas D.Y., and Whiteway M. 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* 66: 2713-2721.
38. De Bernardis F., Mühlshlegel F.A., Cassone A., and Fonzi W.A. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66: 3317-3325.
39. Dekker T., Geier M., and Cardé R.T. 2005. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *J. Exp. Biol.* 208: 2963-2972.
40. Eckert S.E., Sheth C.C., and Mühlshlegel F.A. 2007. Regulation of Morphogenesis in *Candida* species. In: *Candida Comparative and Functional Genomics* (eds Christophe d'Enfert and Bernhard Hube), Caister Academic Press. p263-291.

41. Edmond M.B., Wallace S.E., McClish D.K., Pfaller M.A., Jones R.N., and Wenzel R.P. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29: 239-244.
42. Eggimann P., Garbino J., and Pittet D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* 3: 685-702.
43. El Barkani A., Kurzai O., Fonzi W.A., Ramon A., Porta A., Frosch M., and Mühlischlegel F.A. 2000. Dominant Active Alleles of RIM101 (PRR2) Bypass the pH Restriction on Filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4635-4647.
44. Enoch D.A., Ludlam H.A., and Brown N.M. 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* 55: 809-818.
45. Ernst J.F. 2000. Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis. *Microbiol.* 146: 1763-1774.
46. Feng Q., Summers E., Guo B., and Fink G. 1999. Ras signalling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 6339-6346.
47. Fonzi W.A. 1999. *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* Encode Putative Glycosidases Required for Proper Cross-Linking of β -1,3-Glucans and β -1,6-Glucans. *J. Bacteriol.* 181: 7070-7079.
48. Fonzi W.A., and Irvine M.Y. 1993. Isogenic Strain Construction and Gene Mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.

49. Frame G.W., Strauss W.G., and Maibach H.I. 1972. Carbon dioxide emission of the human arm and hand. *J. Invest. Dermatol.* 59: 155-159.
50. Fridkin S.K. 2005. The Changing Face of Fungal Infections in Health Care Settings. *Clin. Infect. Dis.* 41: 1455-1460.
51. Fridkin S.K., and Jarvis W.R. 1996. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 499-511.
52. Gewiss Mogensen E., Janbon G., Chaloupka J., Steegborn C., Fu M.S., Moyrand F., Klengel T., Pearson D.S., Geeves M.A. Buck J., Levin L.R., and Mühlischlegel F.A. 2006. *Cryptococcus neoformans* Senses CO₂ through the Carbonic Anhydrase Can2 and the Adenylyl Cyclase Cac1. *Eukaryot. Cell* 5: 103-111.
53. Ghannoum M.A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 122-143.
54. Gibson Q.H., and Milnes L. 1964. Apparatus for Rapid and Sensitive Spectrophotometry. *Biochem. J.* 91: 161-171.
55. Gola S., Martin R., Walther A., Dünkler A., and Wendland J. 2003. New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast* 20:1339-1347.
56. Gomes A.C., Miranda I., Silva R.M., Moura G.R., Thomas B., Akoulitchev A., and Santos M.A.S. 2007. A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* 8: R206

57. Götz R., Gnann A., and Zimmermann F.K. 1999. Deletion of the Carbonic Anhydrase-like Gene *NCE103* of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Causes an Oxygen-sensitive Growth Defect. *Yeast* 15: 855-864.
58. Gow N.A.R., Brown A.J.P., and Odds F.C. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 366-371.
59. Granger D.L., Perfect J.R., and Durack D.T. 1985. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* 76: 508-516.
60. Guarro J., Gené J., and Stchigel A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 454-500.
61. Guisani A.D., Vences M., and Kumamoto C.A. 2002. Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Cfz1p – dependent relief of Efg1p – mediated repression. *Genetics* 160: 1749-1753.
62. Guyton A.C., and Hall J.E. 2000. *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
63. Hammer A., Hodgson D.R.W., and Cann M.J. 2006. Regulation of prokaryotic adenylyl cyclase by CO₂. *Biochem. J.* 396: 215-218.
64. Hardman J.G., Limbird L.E., and Gilman A.G. 2001. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York.
65. Hashimoto M., and Kato J. 2003. Indispensability of the *Escherichia coli* Carbonic anhydrase YadF and CynT in Cell Proliferation at a Low CO₂ Partial Pressure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 919-922.
66. Hetherington A.M., and Raven J.A. 2005. The biology of carbon dioxide. *Curr. Biol.* 15: R406-410.

67. Hewett-Emmett D., and Tashian R.E. 1996. Functional diversity, conservation and convergence in the evolution of α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogen. Evol.* 5: 50-77.
68. Hu J., Zhong C., Ding C., Chi Q., Walz A., Mombaerts P., Matsunami H., and Luo M. 2007. Detection of Near-Atmospheric Concentrations of CO₂ by an Olfactory Subsystem in the Mouse. *Science* 317: 953-957.
69. Hull C.M., and Heitman J. 2002. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Genet.* 36: 557-615.
70. Hyde J.A., Trzeciakowski J.P., and Skare J.T. 2007. *Borrelia burgdorferi* Alters Its Gene Expression and Antigenic Profile in Response to CO₂ Levels. *J. Bacteriol.* 189: 437-445.
71. Joffrion T.M., Collins M.S., and Cushion M.T. 2006. Microaerophilic Conditions Increase Viability and Affect Responses of *Pneumocystis carinii* to Drugs In Vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: S117-S118.
72. Jones W.D., Cayirlioglu P., Grunwald Kadow I., and Vosshall L.B. 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445: 86-90.
73. Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E.M., Levin L.R. Buck J., and Steegborn C. 2006. Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *J. Mol. Biol.* 362: 623-639.
74. Kami M., Machida U., Okuzumi K., Matsumura T., Mori S.I., Hori A., Kashima T., Kanda Y., Takaue Y., Sakamaki H., Hirai H., Yoneyama A., and Mutou Y. 2002. Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *Br. J. Haematol.* 117: 40-46.

75. Kauffman C.A. 2005. Fungal Infections. Proc. Am. Thorac. Soc. 3: 35-40.
76. Khalifah R.G. 1971. The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase. J. Biol. Chem. 246: 2561-2573.
77. Klengel T., Liang W.J., Chaloupka J., Ruoff C., Schröppel K., Naglik J.R., Eckert S.E., Gewiss Mogensen E., Haynes K., Tuite M.F., Levin L.R., Buck J., and Mühlischlegel F.A. 2005. Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO₂ Sensing with cAMP Signaling and Virulence. Curr. Biol. 15: 2021-2026.
78. Kobayashi M., Buck J., and Levin L.R. 2004. Conservation of functional domain structure in bicarbonate-regulated “soluble” adenylyl cyclases in bacteria and eukaryotes. Dev. Genes Evol. 214: 503-509.
79. Köhler J.R., and Fink G.R. 1996. *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for Mutations in mitogen-activated protein kinase signalling components have defects in hyphal development. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 13223-13228.
80. Kruse E., Uehlein N., and Kaldenhoff R. 2006. The aquaporins. Genome Biol. 7: 206-211.
81. Kusian B., Sültemeyer D., and Bowien B. 2002. Carbonic Anhydrase Is Essential for Growth of *Ralstonia eutropha* at Ambient CO₂ Concentrations. J. Bacteriol. 184: 5018-5026.
82. Kusian B., Sültemeyer D., and Bowien B. 2002. Carbonic Anhydrase Is Essential for Growth of *Ralstonia eutropha* at Ambient CO₂ Concentrations. J. Bacteriol. 184: 5018-5026.
83. Kyte J., and Doolittle R. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132.

84. Leberer E., Marcus D., Broadbent I.D., Clark K.L., Dignard D., Ziegelbauer K., Schmidt A., Gow N.A.R., Brown A.J.P., and Thomas D. 1996. Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 13217-13222.
85. Leberer E., Marcus D., Dignard D., Johnson L., Ushinsky S., Thomas D.Y. and Schröppel K. 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signaling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 42: 673-687.
86. Liljas A., and Laurberg M. 2000. A wheel invented three times. EMBO Rep. 1: 16-17.
87. Liu H. 2001. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 4: 728-735.
88. Liu H., Köhler J., and Fink G.R. 1994. Suppression of Hyphal Formation in *Candida albicans* by Mutation of a *STE12* Homolog. Science 266:1723-1726.
89. Lo H.J., Köhler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A, and Fink G.R. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent. Cell 90: 939-949.
90. Lones G.W. and Peacock C.L. 1959. Role of carbon dioxide in the dimorphism of *Coccidioides immitis*. J. Bacteriol. 79: 308-309.
91. Lu T., Qiu Y.T., Wang G., Kwon J.Y., Rutzler M., Kwon H.W., Pitts R.J., van Loon J.J.A., Takken W., Carlson J.R., and Zwiebel L.J. 2007. Odor Coding in the Maxillary Palp of the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae*. Curr. Biol. 17: 1-12.

92. Lüttge U. 2007. Carbon dioxide signalling in plant leaves. *C.R. Biol.* 330: 375-381.
93. Makino S., Sasakawa C., Uchida I., Terakado N., and Yoshikawa M. 1988. Cloning and CO₂-dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 2: 371-376.
94. Marchetti O., Bille J., Fluckinger U., Eggimann P., Ruef C., Garbino J., Calandra T., Glauser M.P., Täuber M.G., and Pittet D. for the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). 2004. Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991-2000. *Clin. Infect. Dis.* 38: 311-320.
95. Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., and Moss M. 2000. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348: 1546-1554.
96. Mavor A.L., Thewes S., and Hube B. 2005. Systemic Fungal Infections Caused by *Candida* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. *Curr. Drug Targets* 6: 863-874.
97. Meldrum N.U., and Roughton F.J.W. 1933. Carbonic Anhydrase. Its Preparation And Properties. *J. Physiol.* 80: 113-142.
98. Merlin C., Masters M., McAteer S., and Coulson A. 2003. Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 185: 6415-6424.
99. Mignot T., Mock M., and Fouet A. 2003. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 47: 917-927.

100. Mitsuhashi S., Mizushima T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Moriyama H., Ueki T., Miyachi S., and Tsukihara T. 2000. X-ray structure of β -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum* reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J. Biol. Chem.* 275: 5521-5526.
101. Mitsuhashi S., Ohnishi J., Hayashi M., and Ikeda M. 2004. A gene homologous to β -type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 592-601.
102. Mock R.C., Pollack J.H., and Hashimoto T. 1990. Carbon dioxide induces endotrophic germ tube formation in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 36: 249-253.
103. Mühlischlegel F.A., and Fonzi F.A. 1997. *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of expression. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5960-5967.
104. Murillo L.A., Newport G., Lan C.Y., Habelitz S., Dungan J., and Agabain N.M. 2005. Genome-wide Transcription Profiling of the Early Phase of Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 4: 1562-1573.
105. Naglik J., Challacombe S.J., and Hube B. 2003. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 400-428.
106. Nucci M., and Marr K.A. 2005. Emerging Fungal Diseases. *Clin. Infect. Dis.* 41: 521-526.

107. Oh K.B., Miyazawa H., Naito T., and Matsuoka H. 2001. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4664-4668.
108. Pappas P.G., Rex J.H., Sobel J.D., Filler S.G., Dismukes W.E., Walsh T.J., and Edwards J.E. 2004. Guidelines for Treatment of Candidiasis. Clin. Infect. Dis. 38: 161-189.
109. Perleth J., Choi B., and Spellberg B. 2007. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med. Mycol. 45: 321-346.
110. Persi M.A., Burnham J.C., and Duhring J.L. 1985. Effects of Carbon Dioxide and pH on Adhesion of *Candida albicans* to Vaginal Epithelial Cells. Infect. Immun. 50: 82-90.
111. Petrikos G., and Skiada A. 2007. Recent advances in antifungal chemotherapy. Int. J. Antimicrob. Agents 30: 108-117.
112. Pfaller M.A., and Diekema D.J. 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clin Microbiol. Rev. 20: 133-163.
113. Ramon A.M., Porta A., and Fonzi W.A. 1999. Effect of Environmental pH on Morphological Development of *Candida albicans* Is Mediated via the PacC-Related Transcription Factor Encoded by *PRR2*. J. Bacteriol. 181: 7524-7530.
114. Raven J.A. 2006. Sensing inorganic carbon: CO₂ and HCO₃⁻. Biochem. J. 396: e5-e7.

115. Rocha C.R.C., Schröppel K., Harcus D., Marcil A., Dignard D., Taylor B.N., Thomas D.Y., Whiteway M., and Leberer E. 2001. Signaling through Adenylyl Cyclase Is Essential for Hyphal Growth and Virulence in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3631-3643.
116. Rohde H. 1990. A Comparison of the Contribution of Various Gases to the Greenhouse Effect. *Science* 248: 1217-1219.
117. Román E., Arana D.M., Nombela C., Alonso-Monge R., and Pla J. 2007. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *TRENDS Microbiol.* 15: 181-190.
118. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
119. Santos M.A.S., and Tuite M.F. 1995. The CUG Codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucl. Acid. Res.* 23: 1481-1486.
120. Saporito-Irwin S., Birse C.E., Sypherd P.S., and Fonzi W.A. 1995. *PHR1*, a regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15: 601-613.
121. Sato T., Watanabe T., Mikami T., and Matsumoto T. 2004. Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 751-752.
122. Schaller M., Zakikhany K., Naglik J.R., Weindl G., and Hube B. 2007. Models of oral and vaginal candidiasis based on *in vitro* reconstituted human epithelia. *Nature Protocols* 1: 2767-2773.

123. Schrimpf G. 2002. Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
124. Segal E. 2005. *Candida*, still number one – what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48: (Suppl. 1) 3-11.
125. Sein K.K., and Aikawa M. 1998. The pivotal role of carbonic anhydrase in malaria infection. *Med. Hypotheses* 50: 19-23.
126. Sheth C.C., Johnson E., Baker M.E., Haynes K., Mühlischlegel F.A. 2005. Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar. *Med. Mycol.* 43: 735-738.
127. Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., and Klessig D.F., 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 99: 11640-11645.
128. Smith K.S., and Ferry J.G. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 335-366.
129. So A.K.C., Espie G.S., Williams E.B., Shively J.M., Heinhorst S., and Cannon G.C. 2004. A Novel Evolutionary Lineage of Carbonic Anhydrase (ϵ Class) Is a Component of the Carboxysome Shell. *J. Bacteriol.* 186: 623-630.
130. Sobel J.D. 2007. Vulvovaginal Candidosis. *Lancet* 369: 1961-1971.
131. Sonneborn A., Bockmühl D.P., Gerads M., Kurpanek K., Sanglard D., and Ernst J.F. 2000. Protein kinase A encoded by *TPK2* regulated dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35: 386-396.

132. Spreitzer R.J., and Salvucci M.E. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities of a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 449-475.
133. Staab J.F., and Sundstrom P. 2003. URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *TRENDS Microbiol.* 11: 69-73.
134. Staab J.F., Bradway S.D., Fidel P.L., and Sundstrom P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283: 1535-1538.
135. Staib P., Moran G.P., Sullivan D.J., Coleman D.C., and Morschhäuser J. 2001. Isogenic Strain Construction and Gene Targeting in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183: 2859-2865.
136. Steegborn C., Litvin T.N., Levin L.R., Buck J., and Wu H. 2005. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 32-37.
137. Stretton S., and Goodman A.E. 1998. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 79-85.
138. Stretton S., Marshall K.C., Dawes I.W. and Goodman A.E. 1996. Characterisation of carbon dioxide-inducible genes of the marine bacterium, *Pseudomonas* sp. S91. *FEMS Microbiol Lett.* 140: 37-42.
139. Stryer L. 1996. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.

140. Suh G.S., Wong A.M., Hergarden A.C., Wang J.W., Simon A.F., Benzer S., Axel R., and Anderson D.J. 2004. A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature*. 431: 854-859.
141. Supuran C.T. 2007. Carbonic Anhydrases as Drug Targets – An Overview. *Curr. Top. Med. Chem.* 7: 825-833.
142. Tanghe A., Carbrey J.M., Agre P., Thevelein J.M., and van Dijck P. 2005. Aquaporin Expression and Freeze Tolerance in *Candida albicans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6434-6437.
143. Tanghe A., van Dijck P., and Thevelein J.M. 2006. Why do microorganisms have aquaporines? *TRENDS Microbiol.* 14: 78-85.
144. Tortorano A.M., Kibbler C., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., and Grillot R. 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27: 359-366.
145. Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S., Grillot R., and the ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 317-322.
146. Trick W.E., Fridkin S.K., Edwards J.R., Hajjeh R.A., Gaynes R.P., and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin. Infect. Dis.* 35: 627-630.

147. Tripp B.C., Smith K., and Ferry J.G. 2001. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *J. Biol. Chem.* 276: 48615-48618.
148. Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., and Kaldenhoff R. 2003. The tobacco aquaporin *NtAQPI* is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425: 734-737.
149. Ushinsky S.C., Harcus D., Ash J., Dignard D., Marcil A., Morschhäuser J., Thomas D.Y., Whiteway M., and Leberer E. 2002. *CDC42* is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 1: 95-104.
150. Valdivia R.H., and Falkow S. 1997. Fluorescence-Based Isolation of Bacterial Genes Expressed Within Host Cells. *Science* 277: 2007-2011.
151. Warnock D.W. 2007. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* 48: 1-12.
152. Watsuji T., Kato T., Ueda K., and Beppu T. 2006. CO₂ Supply Induces the Growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a Syntrophic Bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 753-756.
153. Whiteway M. 2000. Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 582-588.
154. Whiteway M., and Bachewich C. 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 529-553.
155. Williams R.H., Jensen L.T., Verkhatsky A., Fugger L., and Burdakov D. 2007. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 10685-10690.

156. Wilson R.B., Davis D., and Mitchell A.P. 1999. Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions. *J Bacteriol.* 181: 1868-1874.
157. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., and Edmond M.B. 2004. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* 39: 309-217.
158. Yeater K.M., Chandra J., Cheng G., Mukherjee P.K., Zhao X., Rodriguez-Zas S.L., Kwast K.E., Ghannoum M.A., and Hoyer L.L. 2007. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiol.* 153: 2373-2385.
159. Zaragoza O., Fries B.C., and Casadevall A. 2003. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO₂. *Infect. Immun.* 71: 6155-6154.
160. Zippin J.H., Chen Y., Nahirney P., Kamenetsky M., Wuttke M.S., Fischman D.A., Levin L.R., and Buck J. 2003. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J.* 17: 82-84.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1	Absolute Anzahl der Septikämien in den USA zwischen den Jahren 1979 und 2000, dargestellt nach dem ursächlich gefundenen Erreger.	1
Abb. 1.2	Schema der Pathophysiologie der invasiven <i>Candida</i> Infektion.	7
Abb. 1.3	Morphologien von <i>Candida albicans</i> .	8
Abb. 1.4	Wesentliche Umweltfaktoren, welche die Morphogenese beeinflussen.	9
Abb. 1.5	Detaillierte Darstellung der <i>RASI/CPH1</i> Kaskade, der Matrix/ <i>CZF1</i> sowie der cAMP/PKA Kaskaden.	11
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der <i>RIM20/RIM101</i> Kaskade.	12
Abb. 1.7	Lebenszyklus von <i>Cryptococcus neoformans</i> .	15
Abb. 1.8	Der Effekt von CO ₂ auf die Morphologie von <i>Candida albicans</i> .	17
Abb. 2.1	DNA Größenstandard zur Bestimmung von DNA Fragmentgrößen und Abschätzung der DNA Konzentration im Agarosegel.	42
Abb. 2.2	Prinzipieller Aufbau des Southernblots.	48
Abb. 2.3	Der Expressionsvektor pGEX-6P-2 dient der Synthese und Aufreinigung von rekombinanten Protein durch eine <i>in frame</i> Fusion an GST.	54
Abb. 2.4	Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range.	55
Abb. 2.5	Prinzipieller Aufbau eines Protein-Blots (Western-Blot).	55
Abb. 2.6	Prinzip des Stopped – Flow.	57
Abb. 3.1	DNA Sequenz und Aminosäuresequenz von <i>C. albicans NCE103</i> .	63
Abb. 3.2	Das globale Alignment von CA verschiedener Spezies.	64
Abb. 3.3	Der <i>E. coli yadFA</i> Stamm (EDCM636) ist für die <i>YadF</i> CA deletiert und kann lediglich unter 5% CO ₂ wachsen.	65
Abb. 3.4	Aufreinigung des NCE103-GST Fusionsproteins.	66
Abb. 3.5	Prinzip des Aktivitätsnachweises der CA.	67
Abb. 3.6	Stopped – Flow Enzymkinetik von Nce103p.	68
Abb. 3.7	Schematische Darstellung der PCR basierten Disruptionsmethode nach Gola.	70
Abb. 3.8	Der homozygote <i>knock – out</i> von <i>NCE103</i> in BWP17 erzeugt einen CO ₂ anhängigen Phänotyp.	71
Abb. 3.9	Southernblot zur Bestätigung des BWP17 Δ nce103 <i>knock-outs</i> .	73
Abb. 3.10	Southernblot zur Bestätigung des CAI4 Δ nce103 <i>knock-outs</i> .	76
Abb. 3.11	<i>NCE103</i> Expression im Wildtyp-stamm SC5314 unter 5% CO ₂ und 0,033% CO ₂ .	78
Abb. 3.12	Der Northernblot bestätigt die Disruption von <i>NCE103</i> im Stamm CAI4 und zeigt eine deutliche Überexpression von <i>NCE103</i> unter dem Promotor EF1 α .	79
Abb. 3.13	Verdünnungsreihe der homozygoten <i>knock – out</i> Stämme.	80

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 3.14	Der Wachstumsdefekt zeigt eine Abhängigkeit von der CO ₂ Konzentration des Gasgemisches.	80
Abb. 3.15	Der Wachstumsdefekt zeigt keine Abhängigkeit vom pH Wert des Nährmediums.	81
Abb. 3.16	Der Wachstumsdefekt kann weder auf nährstoffreichem YEPD Agar, noch auf Kochblutagar kompensiert werden.	81
Abb. 3.17	Eine reine Stickstoffatmosphäre erlaubt kein Wachstum der Deletionsmutanten, was auf einen CO ₂ abhängigen Phänotyp schließen lässt.	81
Abb. 3.18	Der Wachstumsdefekt kann nicht durch Zugabe von Intermediaten des Krebszyklus kompensiert werden.	82
Abb. 3.19	Der Wachstumsdefekt kann nicht durch Zugabe von einzelnen Aminosäuren, Nucleosiden oder Nucleinbasen kompensiert werden.	82
Abb. 3.20	Eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber oxidativen Substanzen kann nach Disruption von <i>NCE103</i> nicht festgestellt werden.	82
Abb. 3.21	Der Carboanhydrasehemmer Ethoxzolamid hemmt das Wachstum des Wildtypstammes an Luft, gleichzeitig wird der <i>Candida</i> – Stamm mit nur einem Allel <i>NCE103</i> stärker gehemmt.	83
Abb. 3.22	Im Agarinvasionstest werden Zellen der verschiedenen Stämme in einer Konzentration von 1×10^5 auf Kochblutagar Platten aufgetragen und über 2 Tage bei der angegebenen CO ₂ Konzentration inkubiert.	85
Abb. 3.23	Wird <i>NCE103</i> unter dem konstitutiv aktiven EF1 α Promotor des <i>TEF2</i> Gens überexprimiert, resultiert eine verstärkte Filamentation gegenüber dem Stamm der reversen Komplementation in 5% CO ₂ und auch in Luft auf DMEM Medium.	85
Abb. 3.24	Kyte-Doolittle Hydropathy Plot von CaNce103p.	87
Abb. 3.25	Expression eines <i>NCE103-GFP</i> Fusionsproteins in CAI4 <i>nce103</i> Δ / <i>nce103</i> Δ zeigt eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins.	88
Abb. 3.26	Das Filamentationsverhalten des <i>CaAQY1</i> Deletionsstammes unter 5% CO ₂ zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp SC5314.	89
Abb. 3.27	<i>Cryptococcus neoformans</i> CAC1 ₁₇₂₁₋₂₂₇₁ kann die <i>C. albicans</i> <i>cdc35</i> Δ / <i>cdc35</i> Δ Mutante ergänzen.	91
Abb. 3.28	Aufreinigung des CAC1 _{trunc} -GST Fusionsproteins.	92
Abb. 4.1	Modell der oralen epithelialen <i>Candida</i> Infektion <i>in vitro</i> .	103
Abb. 4.2	<i>NCE103</i> ist nicht essentiell für die Virulenz von <i>C. albicans</i> in einem Modell der systemischen Candidiasis.	105
Abb. 4.3	Stimulation der katalytischen Region der Adenylylcyclase Cdc35 von <i>C. albicans</i> und Cac1 von <i>Cryptococcus neoformans</i> durch NaHCO ₃ ⁻ .	106
Abb. 5.1	Übersicht zur CO ₂ Detektion in <i>C. albicans</i> und <i>C. neoformans</i> .	109

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, soweit nicht im Text erläutert, wurden wie folgt verwendet:

°C	Grad Celsius
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> , erworbenes Immundefektsyndrom
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i> , Wasser vollentsalzt
ARG4	Argininosuccinatlyase 4
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CA	Carboanhydrase(n)
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosin – 3', 5' – Monophosphat
CaNce103p	<i>Candida albicans</i> Nce103 Protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CO ₃ ²⁻	Kohlenstofftrioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C – terminal	am Carboxy – Terminus des Polypeptids bzw. Protein liegend
DAB	3,3' – Diaminobenzidin
dCTP ^{32*}	Desoxycytidintriphosphat durch Phosphor-32 radioaktiv markiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid

g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierende Protein
GTP	Guanosintriphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutathion – S – Transferase
h	Stunde
H ⁺	Hydron, das positive geladene Ion des Wasserstoff
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HCO ₃ ⁻	Ion des Hydrogencarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
<i>HIS1</i>	ATP Phosphoribosyltransferase <i>HIS1</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K ⁺	Ion des Kalium
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
<i>lat.</i>	lateinisch
LB	lysogeny broth, auch Luria Bertani Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOPS	3 – N – Morpholinopropansulfonsäure

msec	Millisekunden
MW	<i>molecular weight</i> , absolute Molekülmasse
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NaPO ₄	Natriumphosphat
NaSO ₄	Natriumsulfat
ng	Nanogramm
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
sAC	<i>soluble adenylyl cyclase</i> , lösliche Adenylyl cyclase
ScNce103p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nce103 Protein
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
spp.	Spezies
SSC	Standard Saline Citrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAPS	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
tmAC	<i>transmembrane adenylyl cyclase</i> , transmembrane Adenylyl cyclase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tween Tris buffered saline
U	units (Enzymeinheiten)

u.a.	unter anderem
<i>URA3</i>	Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vol	Volumen
YEPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> , Hefevollmedium
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> , Hefeminimalmedium
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZnSO ₄	Zinksulfat
Δ	delta, als Bezeichnung für ein Gen <i>knock – out</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Aminosäuren wurden wie folgt abgekürzt:

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

Valin	Val	V
-------	-----	---

Nucleinbasen wurden wie folgt abgekürzt:

Adenin	A
Guanin	G
Cytosin	C
Thymin	T

Danksagung

Herr Professor Dr. med. Fritz A. Mühlshlegel hat meine akademische Laufbahn prägend beeinflusst. Angefangen von der großartigen Möglichkeit, in seinem Labor in Canterbury, England zu arbeiten, über die Schaffung einer optimalen Arbeitsatmosphäre bis hin zur kontinuierlichen wissenschaftlichen Ausbildung, verdanke ich Fritz entscheidende Erfahrungen, die meinen weiteren Lebensweg bestimmen sollen. Besonders danke ich Fritz für die Vermittlung des Interesses für die Wissenschaft, der Zielstrebigkeit ohne derer erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten nicht möglich ist, die stets konstruktive Kritik und die intensive Förderung in den vielen Bereichen meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Matthias Frosch danke ich für die initiale Unterstützung meines Promotionsvorhabens, der offenen Beratung während der Arbeit sowie der freundlichen Übernahme der Begutachtung an der medizinischen Fakultät Würzburg.

Herr Professor Dr. rer. nat. Joachim Morschhäuser hat bereitwillig das Koreferat dieser Arbeit übernommen, wofür ich ihm danke.

Als geduldiger, engagierter und kluger Lehrer stand mir Dr. Wei-Jun Liang (jetzt University of Bournemouth, England) stets mit Rat und Tat zur Seite. Er hat mir die Ästhetik der Molekularbiologie und nicht zuletzt der asiatischen Lebenskunst vermittelt. Für die vielseitige und freimütige Ausbildung und die freundschaftliche Zuwendung danke ich ihm besonders. Ebenso konnte ich von der Erfahrung und dem Wissen von Dr. Sabine E. Eckert (jetzt Wellcome Trust Sanger Institute, England) lernen.

Die für mich wertvolle und prägende Zeit im Labor durfte ich an der Seite von Claudia Ruoff, Chirag Sheth, Marianne Bolstad und Darren Deller verbringen. Ihnen sei für die Unterstützung und Freundschaft gedankt.

Ein besonderer Dank gebührt Joanne Roobol, die mich auf den ersten Schritten im Labor begleitet und betreut hat und in der Folge eine geschätzte Kollegin wurde. Auch danke ich Sara Sánchez-Perales für die herzliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Im Labor von Drs. Jochen Buck und Lonny Levin (Weill Medical College of Cornell University, New York) wurden wesentliche Experimente dieses Projektes durchgeführt. Ihnen und Dr. James Chaloupka möchte ich für die Zusammenarbeit danken. Ebenso möchte ich Dr. Julian R. Naglik (Department of Oral Medicine, Pathology and Immunology; GKT Dental Institute; King's College London, London, UK) und Dr. Klaus Schröppel (Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Erlangen) für die Zusammenarbeit danken. Die Stopped – flow Experimente wurden im Labor von Dr. Mike Geeves (University of Kent, Canterbury, England) unter der hilfreichen Anleitung von Dr. David Pearson durchgeführt. Ihnen sei für die gewährte Unterstützung gedankt.

Die fortwährende Unterstützung meiner Eltern während meiner akademischen Ausbildung hat ganz wesentlich zu deren Gelingen beigetragen. Ihnen und meiner ganzen Familie möchte ich von Herzen danken.

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version der Dissertation aufgrund des Datenschutzes nicht enthalten.