

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Matthias Frosch

**Identifikation und Charakterisierung von *PHR3*, einem zu der
PHR/GAS-Familie homologen Gen bei *Candida albicans***

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Werner J. Heinz

aus Würzburg

Würzburg, Juni 2001

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

Korreferent: Professor Dr. med. M. Wilhelm

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2001

Der Promovend ist Arzt.

meis parentibus

Inhaltsverzeichnis

Titel

Widmung

1. Einleitung	1
1.1. <i>Candida albicans</i>	1
1.1.1. Die klinische Bedeutung von <i>Candida albicans</i>	1
1.1.2. Pathogenitätsfaktoren	4
1.1.3. Molekulare Genetik	8
1.2. Aufbau der Zellhülle	11
1.2.1. Zytoplasmamembran	12
1.2.2. Zellwand	12
1.3. Die PHR/GAS-Genfamilie	19
1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Geräte, Materialien und Bioreagenzien	26
2.1.1. Geräte	26
2.1.2. EDV	27
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4. Chemikalien	28
2.1.5. Reaktionskits	30
2.1.6. Enzyme	30
2.1.7. Puffer und Lösungen	31
2.1.8. Oligodesoxynukleotide	36
2.2. Genbank Nummer von <i>PHR3</i>	38

2.3. Stämme, Plasmide und Vektoren	40
2.3.1. Stämme	40
2.3.2. Plasmide und Vektoren	40
2.4. Medien und Agar	40
2.4.1. YPD	41
2.4.2. YNB	41
2.4.3. LB	42
2.4.4. M199-Medium mit definiertem pH	42
2.4.5. Spider-Medium	42
2.4.6. SAB	43
2.4.7. SOC	43
2.4.8. Sporulations- und Präsporulationsmedium	43
2.4.9. Weitere Nährböden	43
2.5. Keimzahl und Wachstumskurven	44
2.5.1. Keimzahl und Keimdichte	44
2.5.2. Wachstumskurven	44
2.6. Allgemeine Arbeitsschritte	45
2.6.1. Phenolextraktion	45
2.6.2. Präzipitation und Reinigung	45
2.6.3. Horizontale Agarosegel-Elektrophorese	45
2.6.4. Gelextraktion	47
2.7. DNA-Arbeiten	47
2.7.1. Präparation von genomischer DNA	47
2.7.2. Plasmid-DNA-Präparation	47
2.7.3. Restriktionsverdau	48
2.7.4. Southern-Blot	48
2.7.5. Polymerase Kettenreaktion	49
2.7.6. Inverse PCR	51
2.8. Klonierung	53
2.8.1. Erstellung von stumpfen DNA-Fragmentenden ("Blunten")	53

2.8.2. Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden	53
2.8.3. Ligation	54
2.8.4. Herstellung elektrokompetenter Zellen	54
2.8.5. Elektroporation	54
2.8.6. Klonierung in <i>E. coli</i>	55
2.9. Transformation von Hefen	56
2.9.1. Spheroplasten-Transformation	56
2.9.2. Lithiumacetat-Transformation	56
2.10. RNA-Arbeiten	57
2.10.1. RNA-Präparation	57
2.10.2. Northern-Blot	58
2.11. Radioaktive Arbeiten	58
2.11.1. Erstellung von radioaktiv markierten genspezifischen Sonden	59
2.11.2. Hybridisierung	60
2.12. Erstellung der cDNA mit Hilfe der rTPCR	60
2.12.1. DNase-Verdau	61
2.12.2. Isolierung der mRNA	62
2.12.3. PCR-Kontrolle	62
2.12.4. Reverse Transkription	63
2.12.5. PCR und Klonierung	63
2.13. Sequenzierung	64
2.14. Blast	66
3. Ergebnisse	67
3.1. Identifikation und Sequenzierung einer zu <i>PHR1</i> und <i>PHR2</i> homologen Sequenz bei <i>Candida albicans</i>	67
3.2. Bestimmung des offenen Leserasters und der Aminosäuresequenz	70
3.3. Homologieanalyse und Namensgebung von <i>PHR3</i>	72

3.4. Expressionsanalysen	76
3.5. Kontrollierte Genexpression von <i>PHR3</i>	77
3.5.1. <i>PHR3</i> unter dem konstitutiven Promotor EF1 α in CWH1 und CWH2	77
3.5.2. <i>PHR3</i> unter dem pH-abhängigen Promotor von <i>PHR2</i> in CWH5	81
3.5.3. Überexpression von <i>PHR3</i> unter dem nativen Promotor in CWH9	85
3.6. Expression von <i>PHR3</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
3.7. Bestimmung der Pre-mRNA und mRNA von <i>PHR3</i>	86
3.8. <i>PHR3</i> -Disruption	92
3.8. Wachstumskurven	96
4. Diskussion	98
4.1. Analyse der NS- und der AS-Sequenz von <i>PHR3</i>	98
4.2. Lokalisation von Phr3p	103
4.3. Funktionsanalyse	105
4.3.1. Expression von <i>PHR3</i>	105
4.3.2. Expressions- und Komplementationsmodelle	107
4.3.3. <i>PHR3</i> -knock-out	108
5. Zusammenfassung	111
6. Perspektiven	113
Anhang	
Literaturverzeichnis	114
Abkürzungen	127
Verzeichnis der Publikationen und Präsentationen	128
Danksagung	
Curriculum vitae	

1. Einleitung

1.1. *Candida albicans*

1.1.1. Die klinische Bedeutung von *Candida albicans*

Die Spezies *Candida albicans* ist eine Hefe der Gattung *Candida*. In der Systematik der Pilze zählt der Organismus zu der Klasse der Basidiomyceten des Phylums *Ascomycota* (Guarro et al., 1999). In der Kultur bildet *Candida albicans* weiße, glatte, zum Teil cremige Kolonien bis zu einem Durchmesser von 5 mm. Mikroskopisch können bei diesem polymorphen Pilz Blastosporen (Sproßzellen), Pseudomycele als hintereinander gelagerte Einzelzellen, Keimschläuche, echte Mycele und Chlamydosporen unterschieden werden (vgl. Abb. 1/1).

Maximal 20 der über 150 bekannten *Candida* spezies werden wiederholt als Infektionserreger beschrieben. Zuletzt ist eine Zunahme von anderen *Candida* spp. als *Candida albicans* in klinischen Isolaten festzustellen (Hazen, 1995). 1995 wurde mit *Candida dubliniensis* eine neue und zu *Candida albicans* nahe verwandte Spezies erstmals beschrieben (Sullivan et al., 1995; Sullivan et Coleman, 1998). Dennoch nimmt *Candida albicans* weiterhin aufgrund seiner Häufigkeit und klinischen Relevanz eine herausragende Stellung ein. *Candida* spp. besiedeln als Kommensale die menschliche Haut und Schleimhaut. So werden diese Keime häufig auf Abstrichmaterialien der Haut nachgewiesen und sind bei Gesunden zu 20 - 50% im Oropharynx zu finden (Weig et al., 1999; Weig et al., 2001). *Candida albicans* zählt zur normalen vaginalen Flora (Sobel, 1997) und kann bei über 55% gesunder Erwachsener im Jejunalsekret (Cohen et al., 1969) detektiert werden. Angaben zur Häufigkeit des Keimes in Stuhlproben von Probanden ohne bekannte klinische Erkrankung schwanken von 10 - 100% (Weig et al., 1999; Smits et al., 1969). Bei Patienten nimmt diese Nachweisrate der *Candida*-Kolonisation dabei mit der Dauer eines Krankenhausaufenthaltes zu (Marks et al., 1975).

Eine Infektion erfolgt meist endogen, doch ist eine Übertragung, auch im Rahmen kleiner epidemiologischer Ausbrüche, möglich (Pfaller et Wenzel, 1992). *Candida albicans* ist für ein breites Spektrum von lokalen und systemischen Erkrankungen verantwortlich; hierzu zählen kutane, subkutane und Organmanifestationen (Odds, 1988). Bei den Erkrankungen der Haut und Schleimhaut ist besonders die erosive Candidiasis und der Soor, ein durch zum Teil dicke Beläge gekennzeichneter Befall der Mundhöhle, der Zunge und der Speiseröhre, welcher vor allem bei AIDS-Patienten und anderweitig Immunsupprimierten auftritt, hervorzuheben. Das Krankheitsbild der Vaginitis findet sich häufig bei ansonsten gesunden Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter und verläuft nicht selten chronisch oder rezidivierend (Sobel, 1997). *Candida albicans* ist zudem der häufigste Erreger von systemischen Pilzinfektionen. Vor allem bei Leukämie-Patienten, bei Immunsupprimierten oder nach großen operativen Eingriffen verursacht der Keim lokalisierte Organinfektionen (z. B. von Leber, Lunge, Nieren, ZNS, Herz und Knochenmark), transiente Fungämien und Sepsis. Weitere Risikofaktoren für diese schweren Komplikationen wie Verweilkatheder, Hämodialyse, parenterale Ernährung, Beatmung, Kortikosteroid-, Chemotherapie und langanhaltende oder mehrfache antibiotische Therapie, insbesondere mit Vancomycin und/oder Imipenem (Fridkin et Jarvis, 1996), finden sich zunehmend häufiger im klinischen Alltag. So mußte auch in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Zunahme an systemischen Candidosen festgestellt werden. Studien in den USA haben für den Zeitraum von 1980 - 1989 abhängig vom Krankenhaustyp einen Anstieg an *Candida* Fungämien von bis zu 487% für große Lehrkrankenhäuser belegt (Banerjee et al., 1991). In großen Untersuchungen finden sich *Candida spezies* an sechster Stelle aller im Krankenhaus isolierten pathogenen Keime (Beck-Sagué et Jarvis, 1993). Parallel hierzu fanden sich *Candida spp.* in Blutkulturen an vierter Stelle der identifizierten Erreger, nach koagulase negativen Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken (Pfaller et al., 1998; Jarvis, 1995). Sie sind auf Intensivstationen für 10,2% und krankenhausesweit für 7,8% der hämatogenen Infektionen verantwortlich. Die zur Zeit laufende Studie der Europäischen

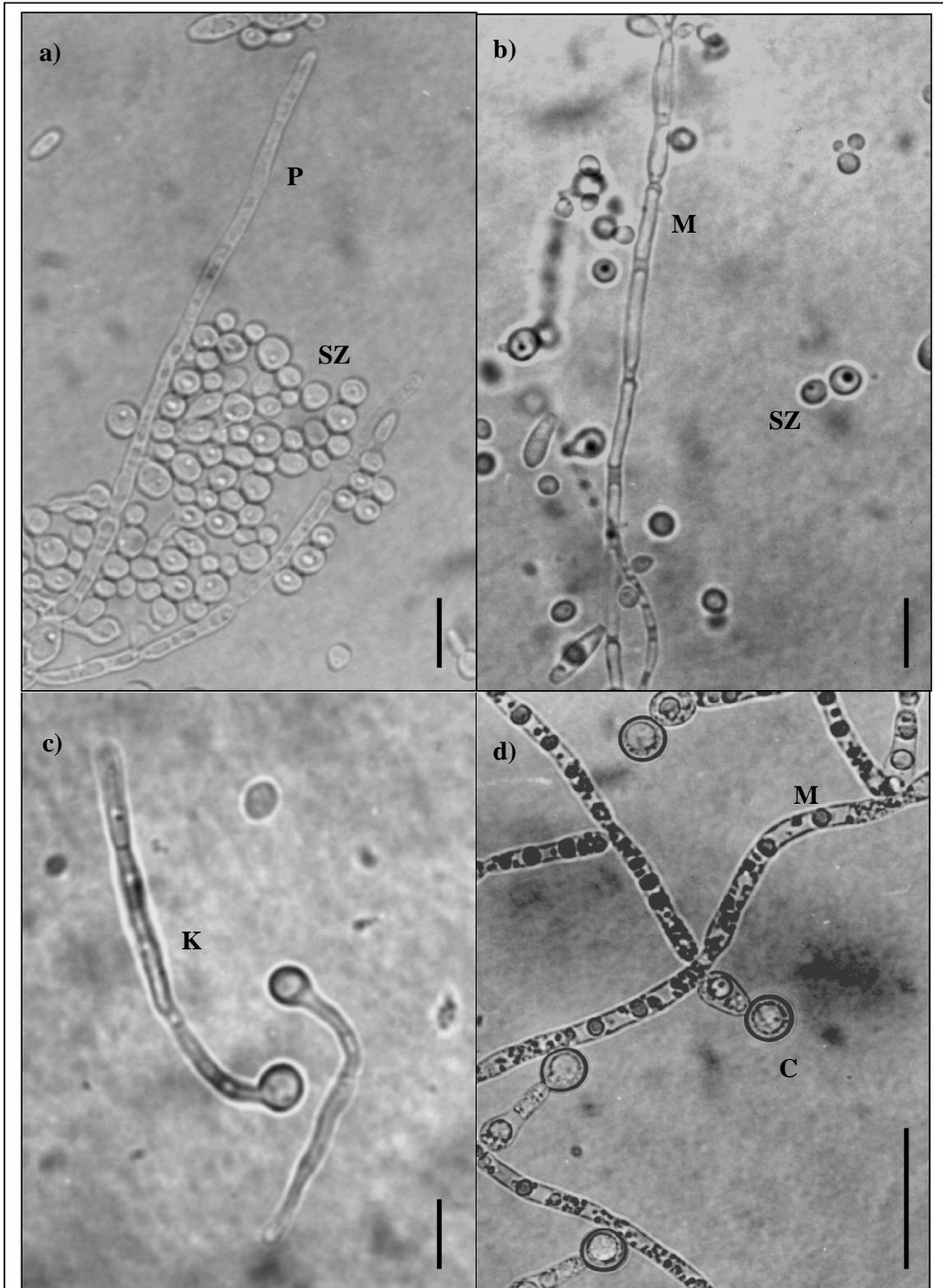


Abb 1/1: Polymorphismus von *Candida albicans*: a) Pseudomycel (P), b) Sprosszellen (SZ) und echtes Mycel (M), c) Keimschläuche (K), d) Echtes Mycel mit Clamydosporen (C). Ein Maßstab von 10µm ist jeweils abgebildet.

Vereinigung für medizinische Mykologie (ECMM) soll die Situation in Europa beleuchten (ECMM, 1997). Autopsiestudien lassen eine noch deutlich höhere Inzidenz und eine Vielzahl *intra vitam* nicht diagnostizierter *Candida* Systemmykosen vermuten. Pfaffenbach et al. (1994) fanden in einer retrospektiven Studie bei 1053 Autopsien von zytostatisch behandelten Patienten mit Leukämien und malignen Lymphomen einen Anstieg der Mykosefrequenz von 12% auf 30% in den Jahren 1976 bis 1990. Die höchste Rate an Mykosen zeigte sich bei akuten Leukämien mit insgesamt 24% und die geringste bei Plasmozytompatienten mit 2,5%. Etwa 75% der 184 Mykosen wurden dabei als wesentliche Todesursache angesehen. Auch andere Studien bestätigen den häufigeren Mykosenachweis *post mortem* und die deutlich erhöhte Inzidenz v.a. bei Leukämie-Patienten (Jandrlić et al., 1995). Die Mortalität einer systemischen Candidose wird mit 50 - 86% angegeben (Pfaller et Wenzel, 1992; Bodey et al., 1978). Dabei werden etwa zwei Drittel der Todesfälle durch die Candidose und nur ein Drittel durch die Grunderkrankung verursacht. Wenzel (1995) schätzt, dass etwa 35% der Patienten mit Nachweis von *Candida* in der Blutkultur daran versterben, 30% versterben an der zugrundeliegenden Krankheit und weitere 35% überleben nach einem im Durchschnitt um 30 Tage längeren Krankenhausaufenthalt.

1.1.2. Pathogenitätsfaktoren

Das breite Spektrum an klinischen Krankheitsbildern, die hohe Inzidenz und die Mortalität der systemischen Candidose unterstreichen die Bedeutung von *Candida albicans* als Infektionserreger. So entwickelte sich in den letzten Jahren ein vermehrtes wissenschaftliches Interesse, die zugrundeliegenden Pathogenitätsfaktoren und die Virulenz des Erregers zu untersuchen. Besonderes Interesse wurde vor allem in jüngerer Zeit auf die für *Candida albicans* spezifischen Faktoren gerichtet, welche die herausragende klinische Relevanz dieses Pilzes unter den Hefen erklären könnten. Die Pathogenese von systemischen Candidosen ist jedoch bisher nur bruchstückhaft bekannt. Es sollen

daher im folgenden einzelne Untersuchungen und Aspekte kurz dargestellt werden (Heinz et Mühlischlegel, 2000).

Ein Kennzeichen von *Candida albicans* ist der Polymorphismus. Diese Fähigkeit zum Wechsel zwischen Hefen-, Hyphen- und Pseudohyphenform stellt ein einzigartiges Merkmal von *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* unter den pathogenen *Candida* Arten dar. Verschiedene Kulturbedingungen und ebenso Wirtsnischen führen zum Wechsel zwischen den Wachstumsformen. Exogene Signale, zum Beispiel des Wirtes, und Stressfaktoren, wie Nährstoffmangel, sind Faktoren, welche die Hefen-Hyphen-Transition hervorrufen können (Übersicht in Brown et Gow, 1999). Serum ist einer der stärksten bekannten Induktoren für die Keimschlauchbildung und findet auch in der medizinischen Diagnostik weite Anwendung. *In vitro* sind der pH-Wert und die Temperatur des Mediums wesentliche Kriterien. So wird bei neutralem und alkalischem pH und einer Temperatur von 37°C überwiegend die Bildung der Hyphenform induziert. Bei einem pH-Wert von 6,0 ist die Keimschlauchbildung bereits deutlich reduziert und bei pH 4 existiert fast ausschließlich die Sprosszellform (Buffo et al., 1984). Die pathogenetische Bedeutung dieser umweltabhängigen Hyphen-Hefen-Transition ist noch nicht abschließend geklärt. Doch konnten voneinander unabhängige Untersuchungen mehrere Virulenzvorteile dieses Phänotypenwechsels für den Erreger belegen (Mitchell, 1998; Odds, 1997). Interleukin 12 (IL-12) gilt als zentrales Signal der Immunantwort des Wirtes. Sprosszellen führen zu einer signifikant höheren IL-12 Expression und werden in einem deutlich höheren Anteil phagozytiert als keimschlauchbildende *Candida albicans* Arten (Chiani et al., 2000). *Candida albicans* findet sich bei systemischen Infektionen in der Blutbahn und bei der Kolonisation von Haut und Schleimhäuten überwiegend als Hefe. Stämme von *Candida albicans*, welchen durch Mutation die Fähigkeit der Filamentierung, also der Hyphen- oder Keimschlauchbildung genommen wurde, sind im Tiermodell nicht mehr virulent (Lo et al., 1997). Für die invasive Ausbreitung kommt der Keimschlauchbildung und der Hyphenform wohl eine besondere Relevanz zu. Diese Wachstumsform ermöglicht es *Candida albicans*, Eintrittstellen bzw. Löcher in

Oberflächen zu erkennen und hindurchzutreten. Diese Eigenschaft wird Thigmotropismus genannt (Sherwood et al., 1992). Hyphen haben darüber hinaus im Vergleich zu Hefen eine verbesserte Fähigkeit, durch Phagozytose von Endothelzellen Schleimhautbarrieren zu überwinden (Phan et al., 2000; Filler et al., 1995). Zusätzlich zu den hier erwähnten werden weitere Phänotypen bzw. Koloniewachstumsformen beschrieben (Pérez-Martin et al., 1999). Ihre pathogenetische Bedeutung ist jedoch bisher ungeklärt.

Eine weitere wesentliche Rolle für die dauerhafte Kolonisation und somit auch für die Virulenz von *Candida albicans* spielt die besondere Qualifikation zur Adhärenz an Epithelien. Repentigny et al. (2000) unterteilen die pathogenen *Candida* Arten in drei Gruppen, welche hohe (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis* und *Candida tropicalis*), mittlere oder niedrige Affinität an den Mucos von Intestinalzellen und an Wangen-Epithelzellen haben. Diese Bindungseigenschaften korrelieren dabei mit der Virulenz der jeweiligen Spezies. Neben der filamentösen Wachstumsform konnten eine Reihe unterschiedlicher Oberflächenproteine für die Adhärenz verantwortlich gemacht werden (Hostetter, 1994). So kann nicht nur durch die Deletion des *INT1*-Gens bei *Candida albicans* das Hyphen-Wachstum und die Adhäsion unterdrückt werden, sondern darüber hinaus kann durch Transformation des Gens in *Saccharomyces cerevisiae* die filamentöse Wachstumsform und zusätzlich die Adhärenz dieser ansonsten wenig oder apathogenen Hefe induziert werden (Gale et al., 1998). Ausgehend von einem Zwei-Phasen-Modell beschreibt Paula Sundstrom (1998), wie konventionelle Adhäsine vom Agglutinintyp, z.B. Ala1p und Als1p, die Anlagerung an Epithelzellen vermitteln. Induziert durch geeignete Umweltbedingungen und gegebenenfalls Wirtssignale, wie einer Immunabwehrschwäche, kommt es dann in einem zweiten Schritt, z.B. mit Hilfe von Transglutaminasen, zu einer irreversiblen Verbindung mit den Oberflächenstrukturen von Endo- und Epithelzellen.

Sezernierte alkalische Proteinase (SAP) sind wichtige Virulenzfaktoren für eine Schleimhaut- und ebenso für eine disseminierte Infektion durch *Candida albicans*. Diese Enzyme bewirken unter anderem eine Endothelzellschädigung

und die Expression von E-Selektin während des Infektionsprozesses (Ibrahim et al., 1998). Durch Deletion einzelner SAP-Gene resultiert eine reduzierte Virulenz der *Candida albicans* Stämme im Mausmodell (Hube et al., 1994). Es konnten mittlerweile zehn unterschiedliche SAP-Gene identifiziert werden (Kurzai et al., 1999). Die Sezernierung der Proteinase variiert unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen und unterliegt einer zeitlichen Abfolge (Hube et al., 1994; White et Agabian, 1995). Während beim opaque wachsenden Phänotyp der Hefe *SAP1*, *SAP2*, und *SAP3* nachgewiesen werden können, wurde bei der weißen Wachstumsvariante unter identischen SAP-induzierenden Bedingungen von diesen dreien nur *SAP2* exprimiert. *In vivo* und *in vitro* beim Infektionsversuch im rekonstruierten humanen Epithelmodell (Schaller et al., 1998) findet sich eine hohe Expression von *SAP1*, *SAP2*, und *SAP3* und in geringeren Mengen von *SAP4* und *SAP6*. Durch Hemmung der SAP-Enzyme mit Hilfe von Pepstatin A konnte die Epithelzellschädigung von *Candida albicans* signifikant reduziert werden. Das Antigen von *SAP5* ist in diesem Modell nur nach Deletion der Gene *SAP1* und *SAP3* zu detektieren (Schaller et al., 1999). Nach Phagozytose von *Candida albicans* durch Peritoneal-Makrophagen ist eine hohe Produktion von *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* zu belegen. Die $\Delta sap4\Delta sap5\Delta sap6$ Nullmutante zeigt gegenüber dem Wildtyp eine um 53% höhere Zerstörungsrate durch Makrophagen (Borg von Zeppelin, 1998).

Die beispielhaft aufgeführten Pathogenitätsfaktoren, die Hefen-Hyphen-Transition, die Adhärenz und die sezernierten alkalischen Proteinase kennzeichnen eine feinabgestimmte Regulation unterschiedlicher Pathogenitätsmechanismen, welche erst durch die gemeinsame Abfolge die Virulenz des Erregers erklären kann. Diese Interaktion und Regulation ist zum einen abgestimmt auf die Keimumgebung, wie die Wirtsnische (z.B. Temperatur und pH-Wert) und die Wirtssignale, den Infektionsweg, das Infektionsstadium und auf die Infektionsabwehr (v.a. Immunsuppression). Zum zweiten sind die Transkription der hierfür verantwortlichen Gene und die Expression der zugehörigen Proteine in bisher nur teilweise bekannten, umfangreichen Signalkaskaden aufeinander abgestimmt (Banuett, 1998). So unterscheidet sich die Sezernierung der alkali-

schen Proteinasen in den SAP-Typen und der Expressionsstärke abhängig von der Lokalisation der Hefe und dem Infektionszeitpunkt. Gleichzeitig mit der irreversiblen Verbindung von *Candida albicans* mit Endothelzellen kommt es zur Keimschlauchbildung und der Expression von hyphenspezifischen Genen. Dieses kennzeichnet beispielhaft die enge Verzahnung und Abstimmung von Regulationsprozessen. Bereits die Deletion eines einzelnen Gens, dessen Protein als Glied einer Signalkaskade oder eines Effektorproteins fungiert, kann *in vivo* den Virulenzverlust hervorrufen.

1.1.3. Molekulare Genetik

Zur molekulargenetischen Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren ist die Kenntnis der relevanten Gene, ihrer Nuklein- und Aminosäuresequenz und ebenso ihrer Regulation erforderlich. Ihre Funktion kann unter anderem durch folgende Schritte analysiert werden: Die Expressionsstärke des Gens kann unter geeigneten Promotoren reguliert werden; das Gen kann durch Ausschneiden eines funktionsrelevanten Bereichs ausgeschaltet werden oder in das Genom anderer Spezies integriert werden. So erzeugte Transformanten werden auf Änderung des Wachstumsverhaltens, des Phänotyps und der Virulenz untersucht sowie untereinander und mit dem Wildtypstamm verglichen.

Viele der zur Zeit zur Verfügung stehenden Daten beziehen sich auf *Saccharomyces cerevisiae*. Diese weitgehend apathogene Bierhefe dient als Modellkeim für Pilze und ist eine der zur Zeit am besten untersuchten eukaryonten Mikroorganismen. Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* ist seit 1997 vollständig bekannt (Goffeau et al., 1997). So wurden beispielhaft die Untersuchungen zu den Signalwegen der MAP-Kinase-Kaskaden (Gustin et al., 1998), zu den Kalium-Transportproteinen (Ko et Gaber, 1991) und ebenso erste und wesentliche Studien zum Zellwandaufbau (s.u.) an *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Die Übertragung der hier gewonnenen Daten und Zusammenhänge auf *Candida albicans* ist jedoch nur in begrenztem Umfang möglich,

denn beide Pilze trennt eine nicht unerhebliche phylogenetische Distanz. Eine Zwischenstellung zwischen diesen beiden Hefen nimmt *Candida glabrata* ein, welche sich durch eine zuletzt zunehmende klinische Relevanz als Krankheitserreger auszeichnet und zugleich deutlich näher verwandt ist mit *Saccharomyces cerevisiae* (Seoighe et Wolfe, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* bildet keine Hyphen und ist eine sexuelle Hefe mit haploiden Genom, *Candida albicans* dagegen ist asexuell und besitzt einen diploiden Chromosomensatz. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist das reduzierte pathogene Potential und das Fehlen der klinischen Bedeutung bei *Saccharomyces cerevisiae*. Eben diese Virulenzfaktoren sind aber für ein Verständnis der Klinik und der Pathogenese von *Candida albicans* von großer Bedeutung.

Parallel zur Erforschung von Genen und Proteinen oder als Voraussetzung diesen vorangehend wurde speziell für *Saccharomyces cerevisiae* eine Vielzahl molekulargenetischer Untersuchungstechniken entwickelt. Diese Techniken können jedoch nicht direkt und komplikationslos auf *Candida albicans* übertragen werden. Ein wesentlicher Grund hierfür ist das Abweichen von *Candida albicans* und einer phylogenetisch eng verwandten Gruppe von *Candida spezieis* vom universellen genetischen Code. So wird von diesen *Candida spp.* das Basentriplet CUG nicht wie bei *Saccharomyces cerevisiae* und allen bekannten pro- und eukaryonten Organismen in die Aminosäure Leucin, sondern in Serin übersetzt (Santos et al., 1997). Durch diese veränderte Transkription der mRNA werden vor allem funktionelle Genuntersuchungen zwischen den Spezieis erschwert. Dieses bewirkt, dass viele Plasmide nicht als Vektoren in beiden Systemen verwendet werden können. Auch die Expression von Genen für funktionelle Untersuchungen und deren Ergebnisse können nur sehr eingeschränkt von *Saccharomyces cerevisiae* auf *Candida albicans* und umgekehrt übertragen werden, wenn das Basentriplet CUG im offenen Leseraster eines Gens enthalten ist. Für *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine Reihe von gut regulierten Vektorsystemen etabliert werden, welche die gezielte zeitliche Expression von Genen ermöglichen. Hiermit können Unterschiede des Wachstums und auch der Virulenz eines Erregers durch

gesteuertes Ein- und Ausschalten eines Gens untersucht werden. So kann mit Hilfe eines tetrazyklinabhängigen Promotors die Expression jedes gewünschten Gens kontrolliert und unter Regulation der Antibiotikadosis gestellt werden. Durch Zugabe von Tetrazyklin wird die Expression eines solchen Gens supprimiert. Eine Manipulation, welche auch im Tierversuch möglich ist und somit *in vivo* Studien zulässt (Bellí et al., 1998). Wenn auch derselbe Promotor bei der zu *Saccharomyces cerevisiae* näher verwandten Hefe *Candida glabrata*, welche ebenso haploid ist, funktionsfähig ist (Mühlschlegel pers. Mitteilung), so ist das System bei *Candida albicans* nicht funktionsfähig. Mögliche Gründe sind der abweichende genetische Code oder eine veränderte Regulation der Transkriptionsfaktoren, welche dann nicht über die breite phylogenetische Distanz konserviert wären.

Von besonderem Vorteil für die genetische Manipulation ist das haploide Genom von *Saccharomyces cerevisiae*. So kann in einem einzelnen Schritt das einzige vorhandene Allel eines Gens in einem Stamm deletiert werden. Durch einfache Kreuzung mit dem identischen Stamm oder mit Wildtyp-Stämmen können dann diploide Einfachdeletionen zur Differenzierung von dominanten und rezessiven Genvarianten und ebenso diploide Doppeldeletionen oder Revertanten erzielt werden. Dies ist bei einem Organismus mit diploidem Genom so nicht möglich. Hier müssen beide Allele eines Gens in getrennten Arbeitsschritten zerstört werden, und der Erfolg ist für beide Ereignisse getrennt, zum Beispiel durch zwei unterschiedlich veränderte Banden im Southern-Blot, zu belegen. Fonzi und Irwin (1993) demonstrierten 1974 erstmals ein System, mit welchem dies sinnvoll durchgeführt werden kann.

Wenn auch eine Reihe von Genen bei *Candida albicans* mittlerweile identifiziert und in ihrer Expression und Funktion untersucht werden konnte, so ist ihre Bedeutung nur in Kenntnis des Zusammenspiels aller Gene des Organismus richtig zu beurteilen. Denn nur wenn alle Gene eines Organismus vorliegen, können Interaktionen, parallele Regulationen oder Kompensationsmechanismen ausreichend in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Ein Genomprojekt, welches nun die komplette Nukleinsäuresequenz von *Candida albicans*

als dritten eukaryonten Organismus entschlüsseln soll, wird zur Zeit abgeschlossen. Unabhängig hiervon sind die Identifikation bestimmter Gene sowie die exakte Charakterisierung der Transkription zu erarbeiten und die zugehörige Funktion und das Zusammenspiel der kodierten Proteine für jedes einzelne Gen zu ermitteln.

1.2. Aufbau der Zellhülle

Candida albicans findet sich als Kommensaler auf dem ganzen Integument des menschlichen Körpers. Als Infektionserreger wurde der Keim in praktisch allen humanen Organsystemen beschrieben. Darüber hinaus kann *Candida albicans* in verschiedenen Tierspezies nachgewiesen werden und ein Infektionsmodell für die Maus ist etabliert (Bernardis et al., 1998). Diese weite Verbreitung erfordert für den Pilz die Fähigkeit der Adaption an ein breites Spektrum unterschiedlichster Wirtsnischen und Umweltbedingungen. So bedarf es unter anderem einer Anpassung an diverse Wirtszellen, Elektrolyt-, Eisenkonzentrationen und pH-Werte. Während sich zum Beispiel im Blut ein neutraler bis leicht alkalischer pH von 7,35 - 7,45 findet, ist vaginal ein saurer pH physiologisch. Für die Auseinandersetzung mit diesen Umweltbedingungen, die Erhaltung konstanter physiologischer intrazellulärer Konzentrationen einzelner Elektrolyte und des osmotischen Gradienten, für die äußere Form und als Barriere für Medikamente und Stoffwechselmetaboliten ist die Zellhülle als Grenz- und Kontaktfläche gegenüber der Umwelt verantwortlich. Zudem vermittelt sie eine Reihe von zum Teil pathogenetisch wichtigen Funktionen wie der Adhäsion (Sundstrom, 1999). Sie dient als immunologische Determinante und ebenso als Immunmodulator. Die Zellhülle der Pilze erhält durch die zusätzliche Zellwand eine hohe mechanische Stabilität, so dass ihre Integrität nur mit verstärkter enzymatischer Aktivität (Laminase) oder mit mechanischer Kraft zerstört werden kann. Dieser Stabilität und Rigidität stehen Anforderungen an Dynamik und Flexibilität gegenüber. Neben dem Wachstum setzen Prozesse wie die Zellteilung und der dimorphe Wechsel zwischen

Hefen- und Hyphenform plastische Variabilität und umfassende strukturelle Anpassungsvorgänge der Hülle voraus. Zur Expansion der Zellwand werden kovalente Bindungen gespalten und neues Material integriert. Während all dieser Prozesse darf die Funktion jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Die Zusammensetzung der Zellwand ist auch abhängig vom Wachstum, dem Medium und der Morphologie von *Candida albicans* (Shepherd et al., 1993). Da die Struktur der Zellwand essentiell für den Pilz ist und bei den Säugetier-Zellen wie denen des Menschen fehlt, bietet sie eine ideale Zielstruktur für Therapeutika (Nafsika et al., 1995). Wesentliche Kenntnisse über den Aufbau der Zellhülle von Hefen beziehen sich auf Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae*. Doch konnten einzelne Ergebnisse mittlerweile auch bei *Candida albicans* bestätigt und homologe wie differente Expressionen und Funktionen von Genen bei *Candida albicans* beschrieben werden.

Die Zellhülle setzt sich aus der an das Zytoplasma grenzenden Plasmamembran, der Zellwand und dem dazwischen liegenden periplasmatischen Raum zusammen.

1.2.1. Zytoplasmamembran

Die Zytoplasmamembran entspricht einer typischen biologischen Elementarmembran und ist aus einer Phospholipiddoppelschicht und Proteinen zusammengesetzt. Wesentliche Proteine sind Signal- und Sensorproteine, Transferasen und Synthetasen für Zellwandbestandteile.

1.2.2. Zellwand

Für den Aufbau einer komplexen Struktur wie der Zellwand von Hefen ist eine Vielzahl von Genen und Enzymen verantwortlich. So konnten bei *Saccharomyces cerevisiae* 82 Gene identifiziert werden, deren Deletion Einfluß auf die Zelloberfläche hat und die Empfindlichkeit gegenüber Calcufluor, einem chemischen Aufheller, erhöht (Lussiert et al., 1997).

Grundsätzlich besteht die Zellwand von Hefen aus drei Ausgangsmaterialien. Den überwiegenden Anteil von 80 - 90% stellen Kohlenhydrate, zusätzlich finden sich zu 6 - 25% Proteine und zu 1 - 7% Fette. Die Kohlenhydratpolymere der Glucane bilden, verstärkt durch Chitin, ein maschenartiges Netzwerk, welches Struktur und Festigkeit verleiht. β -Glucan und Mannan als Hauptbestandteile stellen 47 - 60% und 40% des Trockengewichts der Zelle, Chitin ist für 0,6 - 9% verantwortlich. Die relative Verteilung der Einzelkomponenten ist abhängig von der Schicht der Zellwand und unterscheidet sich vom periplasmatischen Raum zum extrazellulären Raum hin erheblich. Zudem muß die Lokalisation innerhalb der Zelle beachtet werden (Chaffin et al., 1998).

Chitin

Chitin findet sich in höheren Konzentrationen im Bereich der Septen und am Knospungsring der Zellteilung. Bei diesem für Pilze charakteristischen Kohlenhydrat handelt es sich um lineare Homopolymere der Glukose, welche β -glykosidisch verbunden sind. Im Gegensatz zur Cellulose, dem Hauptbestandteil der meisten pflanzlichen Zellwände, ist hier die Hydroxylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom durch eine Acetylaminogruppe ersetzt. Chitin wird an der zytoplasmatischen Oberfläche der Plasmamembran synthetisiert und als Mikrofibrillen an die Zelloberfläche abgegeben. Hier kristallisieren sie durch Hydrogenverbindungen als antiparallel verlaufende Ketten zu α -Chitin. Die Chitinsynthese unterliegt nicht nur örtlicher, sondern auch zeitlicher Kontrolle. So findet sich bei *Saccharomyces cerevisiae* eine deutlich vermehrte Produktion vor der Knospung und am Ende der Mitose. An der Produktion von Chitin sind mehrere Synthetasen in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt. Chs1 liegt in oligomerer Form vor und ist ein nicht essentielles Reparaturenzym. Chs2 ist essentiell und für die Septumbildung verantwortlich. Chs3 ist die essentielle Chitin-Synthetase zur Bildung der lateralen Zellwand und des Knospungsringes. Mit dem Wirkstoff Nikkomycin liegt ein kompetitiver Hemmer der Chitinsynthese vor (Klis, 1994; Georgopapadakou et Tkacz, 1995; Segal et al., 1997; Uda et al., 2000).

Glucan

Glucan liegt in zwei Formen vor: als β -(1,3)-Glucan und als β -(1,6)-Glucan. Bei ersterem handelt es sich um ein für Pilze charakteristisches Polysaccharid aus etwa 1500 Glukoseeinheiten, welche 1,3-glycosidisch verbunden sind und gelegentliche β -(1,6)-Seitenketten aufweisen (Manners et al., 1973a). Je drei parallele Ketten bilden als Tripelhelix wasserunlösliche Fibrillen. β -(1,3)-Glucan kann weiter differenziert werden in einen Anteil, welcher durch alkalische Detergenzien aus dem Zellwandverband gelöst werden kann, und in einen alkalisch unlöslichen Anteil. Letzterer ist mit Chitin gebunden. Ebenso wie Chitin wird auch β -(1,3)-Glucan an der Plasmamembran hergestellt. Die Synthetase besteht aus zwei Untereinheiten. Der erste zytoplasmatisch gelegene, regulierende Baustein bindet GTP und aktiviert darauf die zweite, katalytische Untereinheit in der Plasmamembran. Das Zellwachstum findet vor allem in zwei Regionen statt: an der Hyphenspitze der filamentösen Form und bei Knospung, sich isometrisch von der Spitze der Tochterzelle ausbreitend. Die Glucansynthese ist dabei gut an dieses Wachstum, den Zellzyklus und die Zellarchitektur adaptiert (Georgopapadakou et Tkacz, 1995; Ram et al., 1995; Kang et Cabib, 1980). Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* sind je zwei β -(1,3)-Glucan-Synthetasen bekannt (*FKS1* und *FKS2* bzw. *CaFKS1* und *CaFKS2*). Diese Enzyme werden durch die neuen Antimykotika der Echinokandine und Pneumokandine gehemmt (Douglas et al., 1997).

Das Polysaccharid β -(1,6)-Glucan ist eine aus etwa 140 Glukose-Monosacchariden 1,6-glycosidisch verbundene Kette (Manners et al., 1973b). Dieses Kohlenhydrat kann ebenfalls in der alkalisch löslichen und in der alkalisch unlöslichen Fraktion der Zellwand nachgewiesen werden. Durch Bindung an β -(1,6)-Glucan auf der Oberfläche der Hefe kann das Toxin eines RNA-Virus die Zelle attackieren. Der Einbau dieses als Killertoxin bezeichneten Proteins führt zum Zelltod. Es konnten bei *Saccharomyces cerevisiae* eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Deletion eine Resistenz gegen dieses Toxin vermitteln. Die Proteine dieser *Kre*-(Killer resistent)-Gene wurden an verschiedenen Stufen des sekretorischen Weges, wie im Endoplasmatischen Retikulum, dem

Golgi-Apparat und der Zelloberfläche nachgewiesen. Daraus wurde geschlossen, dass β -(1,6)-Glucan im Gegensatz zu Chitin und β -(1,3)-Glucan nicht an der Plasmamembran, sondern im Zytoplasma der Zelle in einem mehrschrittigen Prozess synthetisiert und an die Zelloberfläche transportiert wird (Klis, 1994). Neuere Untersuchungen von Montijn et al. (1999) unterstützen hingegen die Hypothese, dass auch β -(1,6)-Glucan an der Zytoplasmamembran synthetisiert wird und anschließend an die Zellwand abgegeben wird.

Mannan

Das Saccharid Mannan, ein Polymer der Mannose, liegt nicht separat in der Zellwand vor, vielmehr ist es stets kovalent an Zellwandproteine gebunden. Es kann bis zu 40% der Zellwand-Polysaccharide stellen. Bezeichnungen wie Phosphomannoproteine oder Phosphopeptidomannane beziehen sich auf die komplexe Verbindung des Zuckers mit Phosphorgruppen und den Proteinen. Zwei Mannanbindungsformen an die Proteine müssen dabei differenziert werden. Zum ersten finden sich einzelne Mannose Monosaccharide oder kurze, unverzweigte, lineare Ketten, welche an die Aminosäuren Threonin oder Serin O-glykosidisch gebunden sind und sich durch milde alkalische Substanzen lösen lassen. Die zweite Bindung an Proteine erfolgt N-glycosidisch an Asparagin (über zwei di-N-Acetylchitobiose Einheiten), durch meist sehr lange Ketten von α -1,6-verknüpften Mannopyranosyl-Bausteine. Diese Ketten werden durch eine Vielzahl von α -1,2, α -1,3, β -1,2, β -1,6 Phosphodiester und anderweitig verbundene Seitenketten baumartig verzweigt (Chaffin et al., 1998).

Zellwandproteine

Eine Vielzahl von Proteinen wurde im Zusammenhang mit der Konstruktion und dem Aufbau der Zellwand beschrieben. Es existieren eine Reihe unterschiedlichster physikalischer, chemischer und enzymatischer Extraktionsverfahren, welche zur Isolierung der Proteine alleine oder in Kombination genutzt werden. Häufige Verwendung finden Detergenzien wie Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), reduzierende Agenzien wie Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol oder Enzyme wie Zymolasen, Glucanasen, Chitinasen und Proteasen. Die Anzahl

und die Charakteristika der gewonnenen Proteine ist stark abhängig von dem gewählten Nachweisverfahren. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurden mit Hilfe von reduzierenden Agenzien vier unterschiedliche hochmolekulare Proteine und mit Hilfe von SDS etwa 60 niedrigmolekulare Proteine gefunden. Bei letzteren sind zytoplasmatische Kontaminationen jedoch wahrscheinlich. Meist erfolgt eine primäre Einteilung der Proteine in die eigentlichen Zellwandproteine, welche direkt in dieser nachgewiesen werden und mit dieser verbunden sind, und in sezernierte Proteine, welche von der Zelle bzw. Zellwand an das Medium abgegeben werden. Die Lokalisation einzelner Proteine ist jedoch abhängig von den Untersuchungsbedingungen, auch entspricht sie nicht immer der für ein Enzym belegten oder vermuteten Funktion. Sezernierte Proteine befinden sich zumindest transient in der Zellwand. So unterliegen die Anzahl, die Lokalisation und die Charakteristika der ermittelten Proteine unterschiedlichsten Faktoren, wie unter anderem dem Stamm, dem Sero- oder Phänotyp. Zellwandproteine enthalten eine hydrophobe aminoterminalen Region als Signalsequenz, wie die meisten Proteine des Sekretorischen Weges. Über diesen werden sie nach der Transkription und der Translation im Zellkern vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat mit Vesikeln zur Plasmamembran transportiert. Nach Verschmelzung mit der Membran verteilen sich die Proteine in der Plasmamembran, dem periplasmatischen Raum, der Zellwand und dem Medium. Viele Zellwandproteine werden im periplasmatischen Raum oder der Zellwand selbst noch modifiziert. Hierzu zählen die beschriebene Glykosylierung mit Mannan und die Phosphorylierung. Weiterhin findet teilweise eine GPI-Verankerung, die Bindung an andere Zellwandbausteine (s.u.) und kovalent die Bindung von Ubiquitin, einem eukaryontisch hochkonservierten Polypeptid unklarer Funktion, an Lysin statt (Chaffin et al., 1998; Klis, 1994).

GPI-Anker

Glycanosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) sind ein hochkonserviertes und weit verbreitetes Motiv eukaryonter Organismen und spielen eine wesentliche Rolle bei der Verbindung von Proteinen mit der Zellmembran und der

Zellwand. Dabei haben einige, aber nicht alle Proteine der Zellhülle eine GPI-Verankerung. Voraussetzung hierfür ist erstens eine hydrophobe aminoterminal Signalsequenz, welche die Sekretion der Proteine bedingt, und zweitens eine zusätzliche carboxyterminale Signalsequenz für die Verankerung. Letztere setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer GPI-Anlagerungsstelle aus drei Aminosäuren, ω , $\omega+1$ und $\omega+2$ genannt, einem Zwischenstück von acht bis zwölf Aminosäuren und einer hydrophoben Region von mindestens elf Aminosäuren. Als Anlagerungsstelle ω sind in absteigender Reihenfolge die Aminosäuren Asn, Ser, Gly, Ala, Asp und Cys geeignet, die angrenzenden Aminosäuren $\omega+1$ und $\omega+2$ zeichnen sich durch relativ kurze Seitenketten aus. Derartige Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum an der ω -Position gespalten, und carboxyterminal wird der GPI-Anker an das Restprotein angefügt. Anschließend werden die Proteine zur Zytoplasmamembran transportiert und in deren extrazelluläre Seite eingefügt (Hamburger et al., 1995; Nuoffer et al., 1991; Nuoffer et al., 1993; Udenfriend et Kodukula, 1995). Die so verankerten Proteine ragen in den periplasmatischen Raum, wo sie ihre enzymatische Aktivität entfalten. Eine bei diesen Proteinen häufig gefundene, aminoterminal des GPI-Ankers liegende und somit membrannahe, serinreiche Region könnte dabei im Sinne eines Verlängerungskabels und Stabilisators funktionieren. Bei den eigentlichen Zellwandproteinen wird im folgenden der GPI-Anker mit Ausnahme des Glycan-Anteils abgespalten und die Proteine werden zur Zellwand transportiert. Hier werden sie mit Hilfe des Glycans über Ethanolamin, Phosphat und ein Mannoseoligosaccharid kovalent an β -(1,6)-Glucan gebunden (Protein \leftrightarrow Ethanolamin \leftrightarrow PO₄ \leftrightarrow [α -Mannose]₄ \leftrightarrow β -(1,6)-Glucan) (Kapteyn et al., 1998). Caro et al. (1997) und Hamada et al. (1998) etablierten ein Modell, nach welchem ein dibasisches Motiv und eine zusätzliche Aminosäure ($\omega-4$, $\omega-5$ und $\omega-2$) für das Verbleiben eines Teils der Proteine in der Zellmembran verantwortlich sind. Die Entfernung dieses Motivs führt zur veränderten Lokalisation eines Proteins in der Zellwand. Mit Hilfe dieser Merkmale konnten nun im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* 20 potentielle Plasmamembranproteine und 38 potentielle Zellwandproteine identifiziert

werden. Durch Hinzufügen des dibasischen Motivs an das Zellwandprotein Cwp2p von *Saccharomyces cerevisiae* konnte dieses jedoch nicht in ein Plasmamembranprotein verändert werden (Caro et al., 1997).

Weitere Proteinverbindungen

Da nur ein Teil der Zellwandproteine durch 1,6-Glucanase aus dem Verband zu lösen ist, müssen zusätzlich zu den GPI-Proteinen weitere Proteine und Verbindungen existieren. Unter milden alkalischen Bedingungen konnten Proteine gelöst werden, welche keinen GPI-Anker aufweisen. Den Genen, welche für diese Proteine kodieren, fehlt die typische GPI-Signalsequenz, nach sich wiederholenden Aminosäuresequenzabschnitten wurden sie PIR (Protein with internal repeats) genannt. Pir1p/Hsp1 (Heat shock protein) konnte sowohl im Medium als auch gebunden in der Zellwand nachgewiesen werden. Hier wird eine Verbindung über O-glycosilierte Mannan-Seitenketten an Serin vermutet (Pir-Protein-Serin/Treonin \leftrightarrow O-Mannan \leftrightarrow β -(1,3)-Glucan) (Kapteyn et al., 1999; Mrsa et al., 1997).

Organisation der Zellwand

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, abhängig von der Qualität und der Präparationsmethode, die Zellwand von Hefen als eine mehrschichtige Struktur. Es werden bis zu acht strukturell differenzierte Lagen beschrieben, wobei die innerste stets homogen und elektronendichter, die äußerste hingegen flokkulierend oder als Maschenwerk radiärer Streifen beschrieben wird. Diesen photometrischen Schichten ist die Verteilung der Einzelkomponenten zuzuordnen. Zudem sind diese Bausteine auf unterschiedlichste Weise und in unterschiedlichem Ausmaß miteinander verbunden.

Die innerste Schicht der Zellwand ist reich an Chitin. Zum Teil bereits kovalent an dieses gebunden, findet sich hier das Maschenwerk von β -(1,3)-Glucan, welches in erster Linie für die Form und Stabilität der Zellwand verantwortlich ist. Der äußersten radiär gestreiften Schicht entsprechen Fimbrien aus Mannoproteinen. Mannan stellt dabei das immunologisch dominierende Antigen der Hefezelle. Form und Länge der Fimbrien sind abhängig vom Medium. Diese

Proteine sind für die Adhärenz an und die Interaktion mit den Wirtszellen sowie weitere extrazelluläre Funktionen verantwortlich (Chaffin et al., 1998; Sundstrom, 1999).

In den letzten Jahren konnten nun zwei große Blöcke der Zellwand, zusammengesetzt aus den bekannten Einzelkomponenten, identifiziert werden (Kapteyn et al., 1999) (vgl. Schema 1/1). Zum einen finden sich Mannoproteine, welche über Reste des GPI-Ankers an β -(1,6)-Glucan gebunden sind (s.o.). Diese sind weiter kovalent mit Bestandteilen der Zellwand verbunden, zum kleinen Teil direkt mit Chitin und häufiger mit β -(1,3)-Glucan, welches untereinander und weiter mit Chitin verkettet ist. Den zweiten Block bilden die PIR-Proteine, welche direkt mit β -(1,3)-Glucan verbunden sind. Störungen in einem Block oder einzelner Elemente führen zu Kompensationsmechanismen (Kapteyn et al., 1999; Mrsa et al., 1997). So steigt bei β -(1,6)-Glucan-defizienten Mutanten der Anteil an β -(1,6)-Glucanase resistenten Proteinen von 16% auf über 80% (Kapteyn et al., 1999b). Die Expression und das Vorliegen einzelner Proteine, die Synthese von Kohlenhydraten, ihr Anteil an der gesamten Zellhülle ebenso wie die Ausprägung unterschiedlicher Vernetzungen sind zusätzlich abhängig von den Umweltbedingungen. Zusätzliche Bausteine oder Verbindungen der Zellwand können noch keineswegs ausgeschlossen werden. So beschreiben Chaffin et al. (1998) eine Reihe von Anhaltspunkten für bisher nicht identifizierte Saccharide. Darüber hinaus müssen weitere Proteine identifiziert und ihre intra- oder extramurale Lokalisation nachgewiesen werden.

1.3. Die PHR/GAS-Genfamilie

Gas1p wurde als erstes GPI-verankertes Protein bei *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Nuoffer et al., 1991). Die Deletion des für das Protein kodierenden Gens *GAS1*, auch *GGP1* und *CWH52* genannt, führt zu umfassenden Alterationen der Zellwand und der Zellform. Gene oder Proteine mit homologen Sequenzteilabschnitten wurden bei Pilzen, aber auch bei Pflanzen, wie *Triticum*

aestivum und *Arabidopsis thaliana*, bei Algen wie *Chlamydomonas eugametos* (Popolo et Vai, 1999) und Bakterien, zum Beispiel bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus xylosus* (Fonzi, 1999), beschrieben. Über diese partielle Verwandtschaft, welche sich auf einzelne funktionelle Bereiche beschränken kann, hinausgehend konnten inzwischen eine Reihe homologer Gene als Teile einer PHR/GAS-Genfamilie in einem breiten Spektrum von Hefen identifiziert werden. So finden sich als Mitglieder dieser Genfamilie

- fünf GAS-Gene (*GAS1-GAS5*) in *Saccharomyces cerevisiae*,
- *SPO1* bei *Schizosaccharomyces pombe* (Popolo et Vai, 1999),
- *EPD1* bei *Candida maltosa* (Nakazawa et al., 1998),
- *CgGas1*, *CgGas2* und *CgGas3* bei *Candida glabrata* (Weig et al., 2001),
- *PHR1* und *PHR2* bei *Candida albicans* (Mühlschlegel et Fonzi, 1997),
- *CdPHR1* und *CdPHR2* bei *Candida dubliniensis* (Heinz et al., 2000),
- sowie Fragmente weiterer homologer Gene.

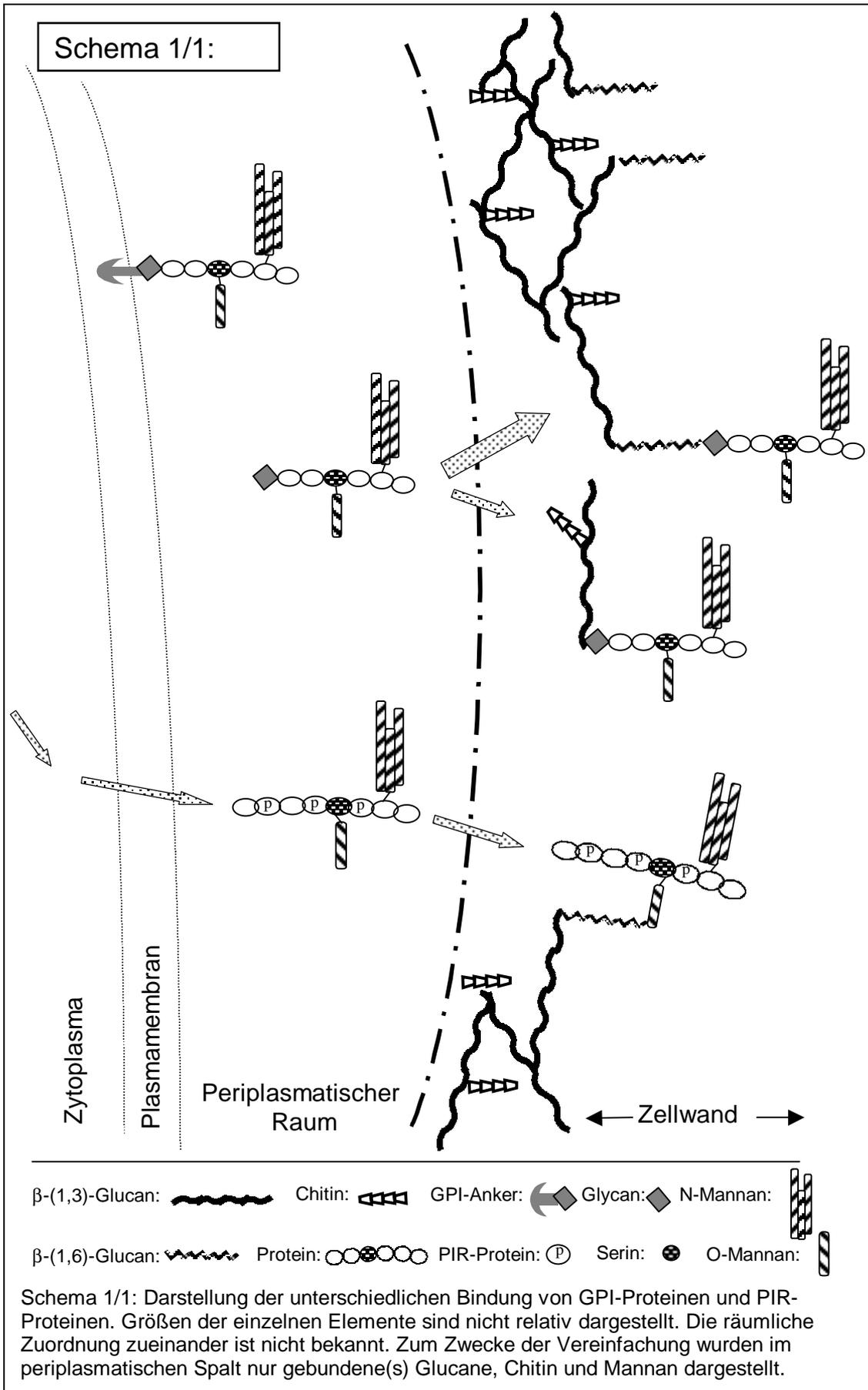
Die Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der PHR/GAS-Gene von *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida maltosa* und *Candida albicans* wird mit 32 - 80% angegeben. Zusätzlich zeichnen sich diese Gene durch eine Reihe weiterer gemeinsamer Merkmale aus (zusammengefaßt bei Fonzi, 1999; Popolo et Vai, 1999). So kodieren alle diese Gene für Aminosäuresequenzen mit einer hydrophoben N- und einer hydrophoben C-terminalen Region und einer potentiellen GPI-Verankerungsstelle. Dieser GPI-Anker konnte für das von *GAS1* kodierte Protein und ebenso für Phr1p, nach Transformation von *PHR1* in *Saccharomyces cerevisiae*, nachgewiesen werden. Es finden sich Homologien in den C-(= c/katalytischen)-Domänen und zusätzliche gemeinsame Merkmale, wie cystein- und serinreiche Aminosäureabschnitte, sowie zwei feste Glutaminsäuren an konstanter Position.

Während die Deletion von *EPD1* bei *Candida maltosa* ein Fehlen der Pseudohyphenform bewirkt (Nakazawa et al., 1998), führen die Deletion von *GAS1* bei *Saccharomyces cerevisiae* und die Doppeldeletion von *PHR1* und *PHR2* bei *Candida albicans* zu reduziertem Wachstum, zum Verlust der ellipsoiden

Zellform und resultieren in ballonierten, miteinander verklumpten Zellen mit Defekt in der Zellseparation und Knospung (Mühlschlegel et Fonzi, 1997). In der Zellwand bleibt der Anteil am gesamten Glucan konstant, doch kommt es zu einer Zunahme von β -(1,6)-Glucan, Chitin und einem Anstieg und einer veränderten Lokalisation von Mannoproteinen. Zusätzlich konnte bei der *GAS1*-Deletionsmutante eine Sekretion von β -(1,3)-Glucan ins Medium festgestellt werden (Ram et al., 1998). Basierend auf diesen Veränderungen der Zellwandzusammensetzung und auf Homologien zu Enzymen anderer pro- und eukaryotischer Organismen wurde nun eine Funktion der Proteine, welche durch die PHR/GAS-Genfamilie kodiert werden, als β -(1,3)-Glucanase oder Glucanotsyltransferase abgeleitet (Fonzi, 1999). Eine Enzymaktivität als β -(1,3)-Glucanotsyltransferase konnte in vitro von Mouyna et al. (2000) für *GAS1*, *PHR1*, *PHR2* und *GEL1*, einem homologen Gen bei *Aspergillus fumigatus*, bestätigt werden. Zusätzlich wird vermutet, dass diese Proteine für die Bereitstellung von nicht reduzierenden, daher reaktionsbereiten Endungen des β -(1,3)-Glucans verantwortlich sind. Diese sind für eine Verbindung mit reduzierenden Enden von β -(1,6)-Glucan erforderlich und nehmen somit bei der Bildung eines wesentlichen Blockes der Zellwand aus Mannoproteinen, β -(1,3)-Glucan, β -(1,6)-Glucan und Chitin eine Schlüsselrolle ein. Danach kommt es bei Verlust dieser Gene zur kompensatorischen Bindung des überwiegenden Teils der Mannoprotein- β -(1,6)-Glucan-Komplexe an Chitin, welches unter physiologischen Bedingungen nur in etwa zwei Prozent vorliegt, und hierfür zu einem Anstieg des Gehalts an β -(1,6)-Glucan und Chitin.

Einzigartig unter den Mitgliedern der PHR/GAS-Genfamilie ist die stringente pH-abhängige Genregulation der PHR-Gene von *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* (Heinz et al., 2000). RNA von *PHR1* bzw. *CdPHR1* ist bei pH-Werten über 5,5 mit Maximum bei pH 7 – pH 8 zu detektieren, *PHR2* und *CdPHR2* werden hingegen in saurem Milieu exprimiert. Die Deletion von *PHR1* oder *PHR2* führt zu einem Wachstumsverlust und einem der *GAS1*-Deletion bei *Saccharomyces cerevisiae* entsprechenden Phänotyp unter dem restriktiven pH. Darüber hinaus konnte ein pH-abhängiger Virulenzverlust in vivo

belegt werden. Die *PHR1*-Deletionsmutante ist im Mausmodell nur bei vaginaler Infektion (pH 4,5) pathogen, nicht jedoch bei systemischer Infektion (neutraler pH). Umgekehrt ist die *PHR2*-Mutante bei systemischer Infektion virulent und bei vaginaler Inokulation apathogen (Bernardis et al., 1998). Zusätzlich zu den besprochenen Sequenzhomologien zeigt die Komplementation des Phänotyps der *GAS1*-Deletionsmutanten durch Transformation dieser Gene in *Saccharomyces cerevisiae* die funktionelle Homologie der *PHR*-Gene mit *GAS1* (Mühlschlegel et Fonzi, 1997; Saporito-Irwin et al., 1995). Der Grund für zwei hochhomologe Gene mit nach jetzigem Wissensstand identischer funktioneller Wirkung wird in einer verbesserten Adaption an unterschiedliche Milieu- und pH-Bedingungen vermutet. Wesentliche Schritte der pH-abhängigen Genregulation konnten nun entschlüsselt werden. So wurden mit *PRR1/RIM8* und *RIM20* zwei Gene und potentielle Signalkaskade-Elemente identifiziert, welche *RIM101/PRR2* als zentralen Transkriptionsfaktor der pH-regulierten Genexpression bei *Candida albicans* beeinflussen (Ramon et al., 1999; Porta et al., 1999; Wilson et al., 1999). Eine hierzu homologe Signalkaskade mit einem transkriptionsregulierendem Faktor ist bei *Aspergillus nidulans* bereits seit längerem bekannt. Die Elemente der Signalkaskade, *PaIA*, *PaIB*, *PaIC*, *PaIF*, *PaIH*, *Pall* aktivieren hier *PacC* als zentralen Regulationseinheit durch Abspaltung des C-terminalen Bereiches (Orejas et al., 1995). Zudem kommt es zu einer verstärkten Expression. Ein so aktiviertes *RIM101/PRR2* hemmt auf der einen Seite die Transkription von *PHR2* und fördert auf der anderen Seite die Expression von *PHR1* (El Barkani et al., 2000). Ein Sensor für die pH-Bestimmung bei *Candida albicans*, der Ablauf der Signalkaskade, weitere vom zentralen Regulationsfaktor *RIM101/PRR2* abhängige Gene und die Interaktion mit anderen Signalkaskaden, insbesondere der für die Hefen-Hyphenwechsel verantwortlichen Kaskade, sind bisher nicht bekannt und stellen weitere wichtige Fragen dar.



1.4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Viele Bauelemente der Hefenzellwand konnten in den letzten Jahren ermittelt werden. Ihre Synthese und deren Regulation, ebenso wie Verbindungen der Elemente untereinander und der Abbau und Umbau von Zellwandbestandteilen ist bisher noch unzureichend geklärt worden.

Die Doppeldeletion der Gene *PHR1* und *PHR2* bei *Candida albicans* führt zu einem deutlich alterierten Phänotyp, die Zellen zeigen ein stark verzögertes Wachstum, sind aber lebensfähig. Dies kann bedeuten, dass die Funktion dieser Gene für das Leben des Keimes nicht essentiell ist oder dass weitere Genprodukte in reduzierter Form eine eventuell auch essentielle Funktion dieser Genfamilie aufrecht erhalten. Der wildtypische Phänotyp wäre dann durch die Addition mehrerer Genprodukte der gleichen Genfamilie zu erklären. Zudem könnten die von diesen Genen kodierten Proteine für Funktionen in unterschiedlichen Bereichen der Zelle, der Zellwand, des Zellzyklus oder als Bestandteile alternativer Signalkaskaden Verwendung finden, wie es für Chitinsynthetasen bereits teilweise beschrieben ist.

Die Bedeutung unterschiedlicher Gene, wie der PHR-Gene bei *Candida albicans*, kann noch nicht befriedigend erklärt werden. Über die Funktion und Expression der zu *GAS1*-homologen Gene bei *Saccharomyces cerevisiae* *GAS2*, *GAS3*, *GAS4* und *GAS5* finden sich zum Teil unterschiedliche und lückenhafte Informationen. Die Anzahl dieser Gene ist alleine durch die bei *Saccharomyces cerevisiae* bekannte Genduplikation, welche evolutionär nach Abspaltung der Spezies *Candida albicans* und vor Abspaltung der Spezies *Candida glabrata* erfolgte, nicht erklärt (Seoighe et Wolfe, 1999).

Die Arbeit hat daher folgende Zielsetzungen:

1. Es sollen weitere PHR/GAS-homologe Gene bei *Candida albicans* nachgewiesen werden.
2. Die Desoxyribonukleinsäure eines solchen Gens ist zu sequenzieren und die zugehörige Aminosäuresequenz abzuleiten.

3. Die resultierenden Gen- und Proteinsequenzen sind mit denen der bekannten Mitglieder der Genfamilie zu vergleichen.
4. Weiterhin soll die Expression unter besonderer Berücksichtigung von Umweltfaktoren und unterschiedlicher pH-Werte bestimmt werden und Kompensationsmechanismen der Hefe nach Deletion eines Gens innerhalb der Genfamilie durch veränderte Genregulation überprüft werden.
5. Transformationsexperimente und kontrollierte Expressionsstudien sollen homologe oder alternative Funktionen dieser Gene differenzieren. Potentielle Änderungen des Phänotyps, wie auch Effekte auf die Wachstumsrate, sind dabei zu erfassen.
6. Die Bedeutung des Gens für die Hefe *Candida albicans* soll durch Disruption des Gens überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte, Materialien und Bioreagenzien

2.1.1. Geräte

Brutschrank:	thermiconT von Heraeus, Hanau
DNA-Sequenzierer:	ABI Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmar, Weiterstadt
Elektrophoresekammern:	Agagel Maxi von Biometra, Göttingen Flachgel-Elektrophoresekammer "Maxi", Nr. 2730181-00, Keutz, Reiskirchen
Elektroporation:	Gene Pulser (Model: 1652077), BIO-RAD, München Pulse Controller (Model: 1652098), BIO-RAD, München
Gel-Dokumentation:	UVT-20Lp und UVT-28MP, Herolab, Wiesloch - Kamera E.A.S.Y, Herolab, Wiesloch - Drucker Video graphic Printer UP-890CE, Sony
Heizblock:	2099-DA, Gebr. Libiesch, Bielefeld
Hybridisierungsöfen:	Hybaid, Biometra Analytik GmbH, Göttingen
Magnetrührer:	M35 von der Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
PCR-Thermocycler:	TRIO20-Thermoblock, Biometra, Göttingen T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen
pH-Meter:	pH 530, WTW, Weilheim
pH-Elektrode:	SenTix 61, WTW, Weilheim
Röntgen-Filmkassette:	X-Omatic, Kodak, USA
Scanner:	UC1200Se, UMAX Data System, Taiwan
Schüttelinkubatoren:	GYROTORY Water Bath Shaker Model 676, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Schüttler:	Virion, Würzburg

Spannungsgeräte:	E431, Consort, Belgien Model 200/2.0, BIO-RAD, München
Speedvac-Concentrator:	Speed Vac Plus Sc110A, Savant, New York, USA
Spectrophotometer:	U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan
Sicherheitswerkbank:	BSB4A von Gelaire, Opera, Italien
Szintillationszähler:	Tri-Carb 2100 TR, Canberra-Packard, Dreieich
Thermostat:	5320 von Eppendorf, Hamburg
UV-Fixierung:	UV Stratalinker 1800 von Stratagene, La Jolla, USA
Vortexer:	REAX 2000 von Heidolph-Instrumenta, Kelheim
Waagen:	PT120 von Sartorius GmbH, Göttingen R160P von Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbad:	3043 von Köttermann KG, Häningsen
Wiege:	Entfärbe-Apperatur, Nr. 90814 von Desaga, Heidelberg
Zentrifugen:	Mikro Rapid/K von Hettich, Tuttlingen EBA 12 von Hettich, Tuttlingen Omnifuge 2,0RS von Heraeus, Hanau Sorval RC5B PLUS von DU PONT, Newtown, CT, USA

2.1.2. EDV

Verwendete Programme

Lasergene Navigator, Version 1.60, 1989 - 1996, DNASTAR Inc.

Sequence Manager (SeqMan), Version 3.51, 1989 - 1996, DNASTAR Inc.

Sequence Editor (EditSeq), Version 3.89, 1989 – 1996, DNASTAR Inc.

Protean, Version 3.08, 1990 - 1996, DNASTAR Inc.

MapDraw, Version 3.08, 1989 - 1996, DNASTAR Inc.

MegAlign, Version 3.11, 1993 - 1996, DNASTAR Inc.

MacPlasmap, v2.1, 1995, CGC Scientific Inc.

Adobe Photoshop 3.0.5; Adobe Systems Inc.

Internet Explorer, Microsoft Corporation.

Microsoft Office 2000, Microsoft Corporation.

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

(Bestellnummer in Klammern)

Chromatographiepapier: Blotting Papier GB46, A. Hartenstein, Würzburg

Nitrozellulosemembranen: Hybond-N (RPN303N), Amersham, Braunschweig

Einmal-Vakuumfiltrationsaufsätze: Bottle-Top-Filter, Porengröße 0,2µl,

für 150ml (FGB2), für 500ml (ZA02) von A. Hartenstein, Würzburg

Reaktionsgefäße:

0,5ml (0030121.023), 1,5ml (0030 120.086), 2,0ml (0030 120.094),

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Cellstar PP-Röhrchen 15ml (188271), 50ml (227261), Greiner GmbH,

Frickenhausen

1,5ml Rnase-free Microfuge Tubes (12400), Ambion, Austin, USA

Elektroporationsküvetten (CE-0002-25), Eurogentec, Seraing, Belgien

Petrischalen: 92x16mm (82.1473) Sarstedt, Nümbrecht

Röntgenfilme: Hyperfim MP (RPN7H), Amersham, Braunschweig

Pipettenspitzen: 0,5-10µl (PSK), 10-100µl (PSG), 100-1000µl (PSB),

A. Hartenstein, Würzburg

Zentrifugengefäße: Sorvall 250ml DRY-SPIN und Bootle, PP, 50ml QTY25

(03530), Sorvall, Newtown, CT, USA

2.1.4. Chemikalien

(Bestellnummer in Klammern)

Amersham Pharmacia, Freiburg

-³²P dCTP (PBI 0205-250)

AppliChem, Darmstadt:

EDTA(-Dinatriumsalz-Dihydrat) (A 1104), Natriumchlorid (A 1371), tri-Natrium-citrat-Dihydrat (A 1351), Natriumhydroxid-Plätzchen (A1551), Tris (A 1086)

Difco, Augsburg:

Nutrient Broth (0003-17-8), Proteose-Pepton (0120-17-6), Yeast Nitrogen Base w/o AminoAcids and Amonium Sulfate (0335-15-9), Yeast Extract (0127-07-1)

GibcoBRL, Karlsruhe:

Medium 199 (31100-084), LB Broth Base (12780-052), LB Agar (22700-025)

ICN, Eschwege:

-³²P dCTP (0139011X.5), Zymolase-20T (1038A)

Merck KGaA, Darmstadt:

Ammoniumsulfat (1.01211), Chloroform (1.02445.1000), Dimethylformamide (8.22275.2500), 96% Essigsäure (1.00058.2500), Ethidiumbromid (1.11608.0030), Glucose (D(+)-Monohydrat) (1.08342.), Glycerin 87% (1.04094.1000), Kaliumacetat (1.04820.5000), Kaliumchlorid (1.04936.), di-Kaliumhydrogenphosphat (5101), tri-Kaliumphosphat-Trihydrat (1.05102.1000), Magnesiumchlorid (-Hexahydrat) (1.05832.), Magnesiumsulfat-(Heptahydrat) (1.05886).

Pharmacia Biotech, Waldkirch-Buchholz:

Lachssperm DNA (27 4564 01)

Roth, Karlsruhe:

Hepes (9105.3), Roti-Phenol (0038.2), Aqua-Roti-Phenol (A980.1), Agarose NEEO (2267.4)

Sigma, Daisenhofen:

Ampicillin (A-9518), Adenin (A-2786), L-Arginin (A-5131), DEPC (Diethyl-Pyrocabonate) (D-5758), Formaldehyde 36,5-38% Aqueous Solution (F8775), Formamide (F-9037), L-Histidine (H-8125), Leucine (L-8000), Lithium Acetate (L-6883), MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonicacid) (M-3295), Polyethy-

lenglycol Wt.8000 (P2139), L-Tryptophan (T-0254), Uridine (U-3750), X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranosid) (B-4252)

2.1.5. Reaktionskits

Qiagen, Hilden:

QIAquick Nucleotide Removal Kit (28306)

QIAprep Spin Miniprep Kit (27106)

Invitrogen, Groningen, Niederlande:

TOPO TA Cloning (450641)

Stratagene (La Jolla, USA):

Prime-IT II Random Primer Labelling Kit

Dynal, Hamburg: Dynabeads Oligo(dT) (610.02)

2.1.6. Enzyme

Enzyme

Restriktionsendonukleasen mit Puffer und Bovinem Serum Albumin (BSA)
soweit nicht anderweitig aufgeföhrt von New England Biolabs,
Schwalbach / Taunus

DNAse I (7767858), Boehringer, Mannheim

AmpliTaq DNA Polymerase inklusive 10 x Puffer und Magnesium-Stocklösung,
Perkin Elmer, Vaterstetten

Pfu DNA-Polymerase inklusive 10 x Puffer, Promega, Madison, USA

Phosphatase, alkaline shrimp (1758250), Boehringer, Mannheim

RNAse (1119915), Boehringer, Mannheim.

SuperScript II (18064-022), Rnase H⁻ reverse Transcriptase, (mit 5 x First
Strand Puffer, 0,1M DTT), GibcoBRL, Karlsruhe

DNA-Marker

Smart-Ladder (MW-1700-10), Eurogentec, Seraing, Belgien

1Kb-DNALadder (15615-016), GibcoBRL, Karlsruhe

Größe (und DNA-Gewicht) der Banden bei einer Menge von 5µl:

Smart-Leiter:

Banden: 10000bp (100ng), 8000bp (80ng), 6000bp (60ng), 5000bp (50ng),
4000bp (40ng), 3000bp (30ng), 2500bp (25ng), 2000bp (20ng), 1500bp (15ng),
1000bp (100ng), 800bp (80ng), 600bp (60ng), 400bp (40ng),

1Kb-Leiter:

Banden: 12216bp, 11198bp, 10180bp, 9162bp, 8144bp, 7126bp, 6108bp,
5090bp, 4072bp, 3054bp, 2036 bp, 1636bp, 1018bp, 200bp (20ng), 517/506
bp, 396bp, 344bp, 298bp, 220bp, 201bp, 154bp, 134bp, 75bp.

2.1.7. Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde Aqua dest. als Lösungsmittel verwendet. Thermostabile Substanzen und Lösungen wurden autoklaviert, thermolabile wurden sterilfiltriert.

Stocklösungen für Selektivmedien

Ampicillin-Stocklösung: 100mg Ampicillin in ml dH₂O.

(Endkonzentration im Medium: 100µg/ml)

Uridin-Stocklösung: 100 mg Uridin in 100µl dH₂O.

(Endkonzentration im Medium: 25µg/ml)

Histidin-Stocklösung: 240µg Histidin in 100µl dH₂O.

(Endkonzentration im Medium: 20µg/ml)

Arginin-Stocklösung: 240µg Arginin in 100µl dH₂O.

(Endkonzentration im Medium: 20µg/ml)

Für die Gel-Elektrophorese und Extraktion

Probenbeladungspuffer: 0,2% Bromphenolblau
0,02% Xylencyanol
25mM EDTA (pH 7,5)
0,1% SDS
in 99% Glycerin

50 x Tris-Acetat (TAE) Stocklösung (1l):

2M Tris
100mM EDTA (pH 8,0)
57,1ml Eisessig

1 x Tris-Acetat (TAE) Puffer (1l):

0,04M Tris
2mM EDTA (pH 8,0)
1,14ml Eisessig

Ethidiumbromidlösung: 1% Ethidiumbromid in dH₂O

QX1 Solubilization Buffer von Qiagen, Hilden

Für Blot-Arbeiten

20 x SSC: 3M NaCl
0,5M Natriumcitrat
pH 7,0

Neutralisationspuffer: 1,5M NaCl
1,0M Tris pH 8,0

Denaturierungspuffer: 1,5M NaCl
0,5M NaOH

Für die Plasmid-DNA-Schnellpräparation

Lösung 1: 50mM Glukose
25mM Tris pH 8,0
10mM EDTA

- Lösung 2: 0,2N NaOH
 1% SDS
- Lösung 3: 5M Kaliumacetat
 Aqua dest. ad 88,5ml
 11,5ml Essigsäure.

Für die Klonierungen

5 x DNA-Ligase-Puffer (von NEB):

- 250mM Tris-HCl
- 50mM MgCl₂
- 50mM DTT
- 5mM ATP
- 100µg/ml BSA, pH 7,8

- X-Gal-Stocklösung: 400mg X-Gal
 Dimethylformamid ad 10ml.
 (Hiervon werden 20µl je Platte ausplattiert)

Für die DNA-Präparation

- Zymolase-Lösung: 2M Sorbitol
 1M K₃PO₄ (pH 7,5)
 1M DTT in Aqua dest.
 4T Zymolase/ml

Für RNA-Arbeiten

Alles in DEPC-H₂O: Aqua dest. 2ml/l DEPC zugegeben, für 12-24h auf dem Magnetrührer gemischt und anschließend doppelt autoklaviert

RNA-Probenbeladungspuffer:

- 0,01% Bromphenolblau
- 50% Glycerin
- in DEPC- H₂O

TES:	10mM TrisCl (pH 7,5) 100mM EDTA (pH 8) 0,5% SDS
10 x MOPS-Puffer:	200mM MOPS 10mM EDTA 50mM NAOAcetat mit 5N NaOH pH auf 6,7-7,0 eingestellt DEPC-H ₂ O ad 1l lichtgeschützt in Silberfolie gelagert.
Premix:	100µl 10x MOPS 175µl 37% Formaldehyd 500µl Formamid

Für die Transformation

TrisHCl/CaCl ₂ -(10x)Stock:	1M TrisHCl (pH 7,4) 1M CaCl ₂
SPE:	1M Sorbitol 50mM tri-Kaliumphosphat 10mM EDTA (pH 7,5)
0,09% Zymolase-Lösung (frisch angesetzt):	0,09% Zymolase in SPE
STC:	1M Sorbitol 1 x TrisHCl/CaCl ₂
PEG/Tris/CaCl ₂ :	20g Polyethylenglycol Wt: 80.000 in 90ml Aqua dest. gelöst, 10ml 10 x TrisHCl/CaCl ₂
SOS: 1ml 2M Sorbitol (frisch angesetzt),	13µl 1M CaCl ₂ 670µl 1 x YPD-Medium Selektionsmarker (2µl 25mg/ml Uridine) Aqua dest. ad 2ml.

10 x TE:	100mM trisCl (pH 7,5) 10mM EDTA
10 x LiAc:	1M Lithium Acetat (LiAc) in Aqua dest.
1xTE/1 x LiAc:	10mM trisCl (pH 7,5) 1mM EDTA 0,1M Lithium Acetat (LiAc)
PEG 50%:	½ Polyethylenglycol ½ Aqua dest.
PEG/TE/LiAc:	100µl 10 x LiAc 100µl TE 800µl 50% Polyethylenglycol

Für radioaktive Arbeiten

Hybridisierungspuffer (nach Monod):

7% SDS
1mM EDTA
0,5M NaH₂PO₄ pH 7

Hybridisierungs-Waschpuffer:

2 x SSC
0,1% SDS

Für die rTPCR

- Für den DNase-Verdau

10 x DNase Puffer:	400mM Tris-HCl (pH 7,5) 100mM NaCl 60mM MgCl ₂
10 x Terminator Mix:	0,1M EDTA (pH 8,0) 1,0mg/ml Glycogen

- Für die mRNA-Isolierung

Bindungspuffer (zweifach konzentriert):

20mM Tris-HCL pH 7,5

1,0M LiCl

2mM EDTA

Waschpuffer:

10mM Tris-HCl pH 8,0

0,15M LiCl

1mM EDTA

Eluationspuffer:

10mM Tris-HCl pH 8,0

Lagerungspuffer:

250mM Tris-HCl pH 8,0

20mM EDTA

0,1% Tween-20

0,02 Natrium Azid

Aufbereitungspuffer:

0,1m NaOH

2.1.8. Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide (Primer) werden in 5' => 3' Richtung wiedergegeben. Bei allen mit WH beginnenden Primern kennzeichnet eine gerade Zahl die Richtung des offenen Leserasters, ungerade Zahlen sind entgegengesetzt ausgerichtet.

T7: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

M13: CAG GAA ACA GCT ATG AC

EM3: CAT ATG TCA AAG CGG TGG

EM4: ATC TAT CAT ATC GTT TGT GT

WH1: CCA CCG CTT TGA CAT ATG

WH2: ATG CAC CAA GAA CCA TCC

WH3: GCT GTA GAA TGT CTG GTC

WH4: CCA GTA TTG TAC ACA AACG

WH5: ACG AAT GGT GTT GAT ACC

WH6: ACG CAA AGG ATA TAC ACC
WH7: GGC ATT GCA TTA CTT GAC G
WH8: CCA TGG TGG AAG TTG ATG
WH9: GAG GCA TTG CAT TAC TTG AC
WH10: CAT CAT CAT CCA CGG CCA C
WH11: GAT CCA CCT GGC TGG TAG
WH12: TCA TCG TGT CTC AAA TAG TC
WH13: GTG GCC GTG GAT GAT GAT G
WH14: GTC AAG TAA TGC AAT GCC TC
WH15: GAC TAT TTG AGA CAC GAT GA
WH16: CTA CCA GCC AGG TGG ATC
WH17: CTA CAT TTA ATG GCG ATT CC
WH18: GGG ACT AAT AAA CCC ATA CG
WH20: CGT GGA ATT CGT ACA ACT TG
WH21: GCT AGT GGC ATT CGA TAG
WH22: CGG GTT CAA CTC TAA CGG
WH23: CGA TTA TAG ATT ACT ATA CAC
WH24: GCT CAT ATT TAT ATG CCT AC
WH25: GTG TGG AAT TGT GAG CGG
WH26: GTT ACA GTG TAT CTT GAT TG
WH27: GCT ATG ACC ATG ATT ACG C
WH28: CAA ATG TCC ACC CCA TAC
WH29: ACT CAT TAG GCA CC CAG
WH30: CAA CAC ATT CTT GCG CCA
WH32: CCA AGT GTA CAC CCT GG
WH34: CGA AGG GTC CTT CTT GTG
WH-Eco2: GAT ATC ATG AAA ACC TTT TCA ATT AGC

Der unterstrichene Abschnitt kennzeichnet die angehängte *EcoRV*-Schnittstelle.

WH-Eco4: GAT ATC ATG TTA CAG TGT ATC TTG ATT

Der unterstrichene Abschnitt kennzeichnet die angehängte *EcoRV*-Schnittstelle.

WH-Nhe1: GCT AGC ATG ATG TGC ACA AGG ATG TT

Der unterstrichene Abschnitt kennzeichnet die angehängte *NheI*-Schnittstelle.

WH-1-RT: GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TT

Der unterstrichene Abschnitt kennzeichnet die in WH-2-RT wiederholte Sequenz.

WH-2-RT: GAC TCG AGT CGA CAT CGA

PHR3-5': AAC ACT TAC TAA CCA ACC TTA CAG TTC TAC ATC AAG
GGA ATA GAC TAC CAG CCA GGT GGA GTT TTC CCA
GTC ACG ACG TT

Der unterstrichene Bereich ist homolog zu NS-Abschnitten der Plasmide pGEM-URA3, pGEM-HIS1 und pRS-ARG4 Δ spel.

PHR3-3': GGG TGA ACT CGT ATA CCA ATC CGC CAC TGA AAA CAT
CTA TCA TAT CGT TTG TGT ACA ATA TGT GGA ATT GTG
AGC GGA TA

Der unterstrichene Bereich ist homolog zu NS-Abschnitten der Plasmide pGEM-URA3, pGEM-HIS1 und pRS-ARG4 Δ Spel.

5'-Vect: GTT TTC CCA GTC ACG ACG

PHR2-1: CCA AGA AAT TCA AGG AAT

FM3: CAA TAT CTA ACA CAG TGT

ACT-Ca1: TCA TTC AAA ATG GAC GGT G

ACT-Ca2: CTT TCA GCA CTA GTA GTG A

2.2. Genbank Nummer von *PHR3*: AF221545

(„Genbank Accession Number“ im Internet unter „www.ncbi.nlm.nih.gov“)

<u>Stamm</u>	<u>Gendelektion</u>	<u>Beschreibung Transformation in dieser Arbeit</u>	<u>Auxotrophien</u>	<u>Ausgangs- stamm</u>	<u>Publikation</u>
<i>Candida albicans:</i>					
SC5314				Wildtyp	Saporito-Irwin et al., 1995
CAS8	<i>phr1</i>		Uridin	CAS7	Saporito-Irwin et al., 1995
CFM2	<i>phr2</i>			CFM1	Mühlschlegel et Fonzi., 1997
CFM4	<i>phr2, ura3</i>		Uridin	CFM2	Mühlschlegel et Fonzi., 1997
BSP17	<i>ura3, his1, arg4</i>		Uridin, Histidin, Arginin	RM1000	Wilson et al. 1999.
CWH1	<i>phr2</i>	<i>PHR3</i> mit dem <i>TEF1</i> -Promotor (pEco2/1: 1 - +295)		CFM4	diese Arbeit
CWH2	<i>phr2</i>	<i>PHR3</i> mit dem <i>TEF1</i> -Promotor (pEco4/1: -148 - +295)		CFM4	diese Arbeit
CWH3	<i>his1, arg4</i>	<i>URA3</i> Einfachdisruption von <i>PHR3</i>	Histidin, Arginin	BWP17	diese Arbeit
CWH4	<i>his1, phr3</i>	<i>ARG4</i> Doppeldisruption von <i>PHR3</i>	Histidin	CWH3	diese Arbeit
CWH5	<i>phr2</i>	<i>PHR3</i> mit dem <i>PHR2</i> -Promotor (pEco4/1: -148 - +295)		CFM4	diese Arbeit
CWH9	<i>phr2</i>	<i>PHR3</i> (p4g-34/9: -877 - +473)		CFM4	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae:</i>					
Wb2d	<i>gas1, ade2, ura3, his3, trp1</i>		Uracil, Adenin, Histidin, Tryptophan	W303-1B	Vai et al., 1996
SWH3	<i>gas1, ade2, his3, trp1</i>	<i>PHR3</i> (p3g34/9-EcoRV/KpnI)	Adenin, Histidin, Tryptophan	Wb2d	diese Arbeit
SWH4	<i>gas1, ade2, his3, trp1</i>	<i>pFL45S</i>	Adenin, Histidin, Tryptophan	Wb2d	diese Arbeit

Tab. 2/1: Stämme. Spalte 3: In Klammern der transformierte Abschnitt von *PHR3*

2.3. Stämme, Plasmide und Vektoren

2.3.1. Stämme

Siehe Tabelle (2/1).

2.3.2. Plasmide und Vektoren

Kommerzielle Plasmide:

pBluescript II SK(+) von Stratagene

pCR 2.1-Topo von Invitrogen

pFL45S von ATCC, Manassas, USA.

Name	Genetische Eigenschaften / Intron	Quelle
pFM30	<i>PHR1</i>	Mühlschlegel, unveröffentlicht
pFM5	<i>PHR2</i>	Mühlschlegel et Fonzi, 1997
pFM4	pBSK(+): <i>TEF1</i> : <i>URA3</i>	Mühlschlegel et Fonzi, 1997
pSM1	pBSK(+): <i>URA3</i> ; <i>PHR2</i> -Promotor	Mühlschlegel, unveröffentlicht
pSM2	pBSK(+): <i>URA3</i>	El Barkani et al, 2000

Tab. 2/2: Nicht kommerzielle Plasmide und ihre Herkunft

2.4. Medien und Agar

Bei Medien und Lösungen für Nährböden wurde, soweit angegeben, durch Zugabe von 10%iger Salzsäure oder 5N Natriumlauge der pH-Wert eingestellt. Der erforderliche pH-Wert wurde abschließend anhand eines 10ml Aliquots des Endmediums kontrolliert.

Die Autoklavierung erfolgte jeweils bei 125°C über 15min.

2.4.1. YPD

YPD Medium ohne definierten pH

20g Glukose, 20g Pepton und 10g Yeast Extrakt wurde mit Aqua dest. zu 1000ml ergänzt, gemischt und autoklaviert (Rose et al. 1990).

YPD-Medium mit definierten pH

20g Glukose und 35,7g HEPES wurden in 700ml Aqua dest. gelöst, der pH-Wert eingestellt und das Volumen zu 800ml ergänzt. Die Mischung wurde durch Vakuumfilter sterilfiltriert. 20g Pepton, 10g Yeast Extrakt wurden mit Aqua dest. zu 200ml ergänzt, gemischt und mit Rührfisch autoklaviert. Beide Ausgangsmethoden wurden mit Hilfe des Magnetrührers miteinander vermengt.

YPD-Nähragarplatten

Hierfür wurde den zu autoklavierenden Medien 2% (20g/l) Agar zugegeben.

2.4.2. YNB

YNB-Nähragarplatten mit definiertem pH

Für 1l YNB-Nährmedium wurde 20g Glukose, 5g Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und 35,7g HEPES in 350ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert eingestellt und mit Aqua dest. zu 400ml ergänzt. 1,6g YNB Pulver wurden in 100ml Aqua dest. gelöst. Beides wurde vermischt, sterilfiltriert und auf 50°C erwärmt. 20g Agar wurden in 500ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde dies im Wasserbad auf 50°C abgekühlt und mit der filtrierten Lösung gemischt. Platten wurden mit einem Volumen von etwa 18ml gegossen.

YNB-Medium mit definiertem pH

20g Glukose, 5g Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und 35,7g HEPES wurden in 800ml Aqua dest. aufgenommen, der pH-Wert eingestellt und die Lösung mit Aqua dest. zu 900ml ergänzt. 1,6g YNB Pulver wurden in 100ml Aqua dest. gelöst. Beides wurde sterilfiltriert und mit Magnetrührer gemischt.

YNB-Nähragarplatten mit Sorbitol

Für diesen Agar wurde das Basismedium YNB vor dem Sterilfiltrieren mit 1M Sorbitol supplementiert.

2.4.3. LB

LB-Medium

20g LB Broth Base wurde in 1l Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

LB-Nährböden

32g LB-Agar wurde in 1l Aqua dest. gelöst und autoklaviert, auf 50°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen mit einem Plattenvolumen von etwa 20ml.

Für Selektivmedien wurde dem Nähragar oder Medium 1mg Ampicillin pro Liter zugegeben (Endkonzentration 100µg/ml).

2.4.4. M199-Medium mit definiertem pH

10mg M199 wurde mit 35,7g HEPES in 900ml Aqua dest. gelöst, der pH-Wert eingestellt und das Gesamtvolumen mit Aqua dest. zu 1000ml aufgefüllt. Abschließend wurde das Medium mit Vakuumsfilter sterilfiltriert.

2.4.5. Spider-Medium

10g Mannit, 2g di-Kaliumhydrogenphosphat und 10g Nutrient Broth wurden in 800ml Aqua demineralisata gelöst und der pH auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Bouillon mit Aqua demineralisata auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert (Liu et al., 1994).

2.4.6. SAB

40g Glukose und 10g Pepton wurden in 1000ml Aqua demineralisata gegeben und bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert auf 5,6 eingestellt und das Medium autoklaviert.

2.4.7. SOC

20g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt (Yeast Extract), 10mM Natriumchlorid, 2,5mM Kaliumchlorid, 10mM Magnesiumchlorid, 10mM Magnesiumsulfat und 20mM Glukose wurden in Aqua demineralisata ad 1l gelöst und autoklaviert.

2.4.8. Sporulations- und Präsporulationsmedium

Als Präsporulationsmedium wurden 4g Bacto-Hefeextrakt (08%), 1,5g Bacto-Pepton (0,3%), 50g Dextrose (10%) in Aqua demineralisata ad 500ml gelöst und autoklaviert. Für das Sporulationsmedium wurden 5g Kaliumacetat (1%), 0,5g Bacto-Hefeextrakt (0,1%) und 0,25g Dextrose (0,05%) mit Aqua demineralisata auf 500ml ergänzt, darin gelöst und abschließend autoklaviert.

2.4.9. Weitere Nährmedien

Zur Prüfung des Wachstums der *PHR3*-Deletionsmutanten CWH3, CWH4-2 und CWH4-8 mit den Stämmen BWP17 und SC5314 wurden zusätzlich allgemein gebräuchliche Nährmedien der mikrobiologischen Routinediagnostik verwendet. Im einzelnen Müller-Hinton Kochblut, Columbia-Blut, Schaedler-Agar (anaerob) (alle von Beckton Dickenson), Negersaat, Bierwürz und SAB-Agar.

2.5. Keimzahl unnd Wachstumskurven

2.5.1. Keimzahl und Keimdichte

Zur Bestimmung der Keime einer Kultur wurde von einem Aliquot eine geeignete Verdünnung erstellt und von dieser wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mikroskopisch wurden die Keime in fünf Feldern, mit jeweils 16 kleinen Quadraten ausgezählt. Die Zahl sollte zwischen 50 und 500 liegen, andernfalls wurde die Verdünnung angepasst. Der Mittelwert von zwei Mengenbestimmungen wurde mit dem Verdünnungsfaktor und mit 50000 multipliziert und entspricht der Anzahl der Kolonie-bildenden-Einheiten in einem Milliliter.

Zur Keimdichtebestimmung wurde eine Probe der zu untersuchenden Kultur in eine Plastikkuvette gegeben und anschließend im Photometer die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt. Als Nullwert diente zum Vergleich und zur Eichung ein steriles Medium. Überschritt der resultierende Wert den direkten proportionalen Bereich (ab 1,5), wurde die Kulturprobe und das sterile Medium mit Aqua dest. verdünnt und das Messergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.5.2. Wachstumskurven

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurden die zu untersuchenden Stämme in YPD-Medium inokuliert und über Nacht bei 30°C im Schüttelbad inkubiert. Die Keimzahl wurde bestimmt und die erforderliche Menge für eine Keimdichte von 3×10^5 /ml wurde in 100ml YNB mit Supplemetierung aller erforderlichen Aminosäuren angeimpft. Nach Kontrolle der Zellzahl pro Mililliter erfolgte die Inkubation bei 30°C im Schüttelbad. Alle zwei Stunden wurde die Keimzahl und die Keimdichte bestimmt. Diese Messung wurde für alle zu untersuchenden Stämme parallel durchgeführt und an drei verschiedenen Tagen wiederholt. Die Werte aller Tage wurden zusammengefasst und die

Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen berechnet. Mit dem Programm Excel wurde die jeweilige Wachstumskurve bestimmt.

2.6. Allgemeine Arbeitsschritte

2.6.1. Phenolextraktion

Zur Aufreinigung von RNA, chromosomaler und plasmid DNA, Inaktivierung und Entfernung von Enzymen und Proteinen wurde dem DNA- oder RNA-enthaltenden Ansatz soweit nicht anders angegeben das identische Volumen eines 1:1 Phenol-Chloroformgemisches zugegeben, gut geschüttelt und anschließend zur erneuten Phasentrennung 2min. bei 14000Upm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt.

2.6.2. Präzipitation und Reinigung

Die Präzipitation wurde zur Einengung von Volumen und zum Pufferwechsel durchgeführt. Hierfür wurde dem Ansatz das 2,5-fache Volumen an eiskaltem (-20°C) 96% Ethanol und Natriumchlorid (aus einer 3M Stocklösung) bis zu einer Endkonzentration von 100mM zugegeben und für mindestens 20min bei -20°C gelagert (Fällung). DNA und RNA wurde durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 4°C über 15min sedimentiert und die Flüssigkeit abpipetiert. DNA wurde anschließend mit einer Menge an 70% Ethanol gewaschen, welche dem doppelten Volumen des Ausgangsansatzes entsprach, und erneut für 15min zentrifugiert. Abschließend wurden die Pellets im Heizblock bei 35°C getrocknet und in Aqua dest. aufgenommen.

2.6.3. Horizontale Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse und Aufreinigung von DNA und RNA wurde diese in der Agarosegel-Elektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Helling et al.,

1974). DNA und RNA wandert hierbei aufgrund der negativen elektrischen Ladung mit der angelegten Spannung von der Kathode zur Anode.

DNA-Gel

Für DNA-Arbeiten wurde ein 0,8% Agarose-Gel verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Unter wiederholtem Schwenken kühlte diese auf etwa 35-45°C ab, bevor sie in eine Gelkammer mit Kämmen gegossen wurde. Nach vollständigem Polymerisieren bei Raumtemperatur (RT) wurden die Kämmen aus dem festen Gel gezogen. Das Gel wurde in einer Elektrophorese-Kammer vollständig mit TAE bedeckt und in die entstandenen Vertiefungen wurden Proben mit einem Volumen bis zu 25µl gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 - 120V. Zur Kontrolle der DNA-Wanderung im Gel und zur Bindung der aufgetragenen Proben wurde diesen 10% des Volumens an Blaumarker zugegeben. Wenn die Bromphenolblau-Bande zwei Drittel der Gelstrecke durchwandert hatte, wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung für 15min gefärbt und anschließend die DNA bei UV-Licht von 302nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit parallel aufgetragenen DNA-Markern bestimmt (nach Sambrook et al., 1989).

RNA-Gel

Für RNA-Arbeiten wurde ein Gel mit 1% Agarose verwendet. Nach Aufkochen von Agarose in 200ml MOPS-Puffer im Glaskolben wurde dieses unter Schwenken auf 35-45°C abgekühlt, 3,52ml Formaldehyd (37%) zur Denaturierung der RNA hinzugefügt und sofort in eine Gelkammer mit einem Kamm gegossen. 1 x MOPS-Puffer wurde als Laufpuffer verwendet. Die RNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Premix vermischt und für 10min bei 65°C inkubiert, dann kurz abzentrifugiert, auf Eis gelagert und in die vom entnommenen Kamm hinterlassenen Taschen des erstarrten Gels gegeben. Die Gel-Elektrophorese von RNA wurde mit 80V durchgeführt.

2.6.4. Gelextraktion

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese in einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht mit dem Skalpell Gelblöcke ausgeschnitten. Die Gel-Fragmente wurden in dem 3-fachen Volumen an QX1-Puffer bei 50°C gelöst. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Quiagen Nukleotide Removal Kits entsprechend den Angaben des Herstellers über Ionenaustauschersäulen aufgereinigt und abschließend in Aqua dest. aufgenommen.

2.7. DNA-Arbeiten

2.7.1. Präparation von genomischer DNA

Die Hefezellen einer 15ml Übernachtskultur in YPD-Medium wurden abzentrifugiert und mit 1ml 1M Sorbitol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Lyse in 500µl frischer Zymolase-Lösung aufgenommen und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren über 1min bei 14000Upm wurde das Pellet erneut mit 1M Sorbitol gewaschen und dann in 500µl (50mM EDTA/ 0,2% SDS) gelöst. Zum Ausfällen der Proteine wurde der Ansatz kräftig mit 500µl Chloroform/neutralen Phenol (25:25) vermischt und anschließend für 5min bei 14000Upm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde zur besseren Aufreinigung zweimal mit abnehmenden Volumina von jeweils 450µl und 400µl wiederholt. Abschließend wurde die chromosomale DNA präzipitiert, gewaschen und das Pellet nach dem Trocknen in 100µl aufgenommen. Die enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 1µl RNase und Inkubation bei 37°C abgedaut.

2.7.2. Plasmid-DNA-Präparation

Zur Präparation von plasmid DNA wurde eine Einzelkolonie eines plasmidtragenden Bakterienstammes unter Selektionsdruck (meist Ampicillin) in der

erforderlichen Menge LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator oder im Wasserbad bei 37 °C über Nacht bzw. für mindestens 12h inkubiert.

a) Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde 5ml einer Übernachtskultur mit Hilfe des Quiagen Mini Kits entsprechend den Angaben des Herstellers über Ionenaustauschersäulen aufgereinigt.

b) Plasmid-DNA-Schnellpräparation: 1,5ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden bei RT für 2min bei 14000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 100µl der Lösung 1 aufgenommen, gemixt und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 200µl von frisch angesetzter Lösung 2 hinzugefügt, kurz gemixt und für 5min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150µl der Lösung 3 wiederholte sich das Vortexen und Inkubieren für 5min auf Eis. Danach wurde der Ansatz für 4min bei 14000Upm zentrifugiert und anschließend der Überstand präzipitiert, gewaschen, getrocknet und in 30µl Aqua dest. aufgenommen.

2.7.3. Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde DNA an Stellen mit definierter Basenfolge in bekannter Weise geschnitten. Für Blots und Fragmentgrößenbestimmungen erfolgte diese Reaktion in einem Volumen von 20µl, zum Zwecke der Gelaufreinigung wurde ein Volumen von 50µl verwendet. Dem Reaktionsansatz wurde die vom Hersteller des Enzyms empfohlene Menge an Puffer und gegebenenfalls BSA sowie 10 bis 20 Einheiten Enzym hinzugefügt und dieser entsprechend dem angegebenen Reaktionstemperaturoptimums des Enzyms für 3h inkubiert. Soweit nach Angaben des Herstellers möglich, wurde das Enzym abschließend hitzeinaktiviert.

2.7.4. Southern-Blot

Zur Identifikation und dem Nachweis von Genen in der Hybridisierung wurde genomische DNA nach einem Restriktionsverdau gelelektrophoretisch nach der

DNA-Fragmentgröße aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Bei diesem Vorgang, Blotten genannt, wird die DNA zunächst denaturiert und dann unter Beibehaltung der Verteilung durch Kapillarkräfte auf ein Filterpapier übertragen.

Nach der Horizontalen-Agarose-Gelelektrophorese wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel mit einem Lineal als weitere Zuordnungshilfe unter UV-Licht dokumentiert. Anschließend wurde das Gel durch Schwenken für 2 x 30min in der Denaturierungslösung und danach für 2 x 30min in Neutralisationspuffer vorbehandelt.

Zum Blotten wurde das Gel auf einen blasenfrei durchtränkten Whatmann-Papierstreifen gelegt, welcher mit beiden seitlich überhängenden Enden in 20 x SSC Puffer eintauchte. Auf dem Gel wurde in gleicher Größe die Nylonmembran, ein weiteres Whatmann-Papier, mehrere Lagen saugfähiger Papierhandtücher und ein Gewicht von etwa 300-600g aufgeschichtet. Nach einem Blotvorgang von 8-16h (das Gel wurde maximal dehydriert) wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Licht mit einer Energie von 120.000 Mikrojoule und dem Auto crosslinking Programm des Stratalinkers kovalent mit der Membran verbunden. (Southern, 1975)

2.7.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die exponentielle Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgt mittels der PCR. Durch Erhitzen wird die DNA zunächst in Einzelstränge gespalten. Die Grenzen der Amplifikation werden durch Oligodesoxinukleotide (Primer) festgelegt. Diese zu der primären DNA-Sequenz komplementären Nukleinsäuresequenzen lagern sich an die Einzelstrang-DNA an (Annealing). Das Temperaturoptimum der Reaktion ergibt sich aus dem Gehalt an Purinen und Pyrimidinen der Primer nach der Formel $T=4x(GC)+2x(AT)$. Im folgenden Schritt werden dNTPs durch das Enzym Polymerase an die Primer in 3' Richtung angehängt (Extension). Dabei dient der Ausgangseinzelstrang der DNA als Matrize und wird zum Doppelstrang ergänzt. Zur Bestätigung der exakten Gensequenz von *PHR3*

und zur Konstruktion der Plasmide Pfu-Eco2/1, Pfu-Eco4/1 und p3g-34/9 wurde die Proof-reading Polymerase (Pfu) von *Pyrococcus furiosus* verwendet. Dieses Enzym katlaysiert die Polymerisation von Nukleotiden in 5'->3' Richtung zur Ergänzung eines einzelnen Strangs zu einer Doppelstrang-DNA und besitzt zusätzlich eine 3'->5' Exonuklease-Aktivität. Letztere schneidet fehlerhaft eingebaute Nukleotide, wie sie vereinzelt vorkommen können, wieder aus. Für die weiteren Amplifikationen wurde die Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq) verwendet.

Taq-PCR

Ansatz: 6µl 25mM MgCl, 5mM dNTP, 10µl 10xPuffer, je 50mM beider Primer in 1µl Aqua dest., 0,1-0,5µg DNA, 2 Einheiten Taq-Polymerase, Aqua dest. ad 100µl.

Zyklusparameter:

	3min	95°C,	(Primäre Denaturierung)
je 25 - 30 Zyklen	50sec	94°C,	(Denaturierung)
	1min	AT	(Annealing)
	ET	72°C	(Extension)
abschließend	5min	72°C.	(Finale Extension)

Dabei wurde als AT (=Annealing Temperatur) das niedrigere Temperaturoptimum (s.o.) von beiden Primern gewählt, die ET (Extension Time) errechnete sich aus der zu erwartenden Amplifikatgröße in kb multipliziert mit dem Faktor 0,7, jedoch mindestens 1,5min.

Pfu-PCR

Ansatz: 10µl 10fach Puffer, 4µl dNTP, je 50pm beider Primer, 0,1-0,5µg DNA, 2Einheiten Pfu Polymerase, Aqua dest. ad 100ml.

Zyklusparameter:

	2min	95°C,	(Primäre Denaturierung)
je 25-30 Zyklen	[50sec	94°C, (Denaturierung)
		1min	AT (Annealing)
		ET	72°C (Extension)
abschließend	7min	72°C.	(Finale Extension)

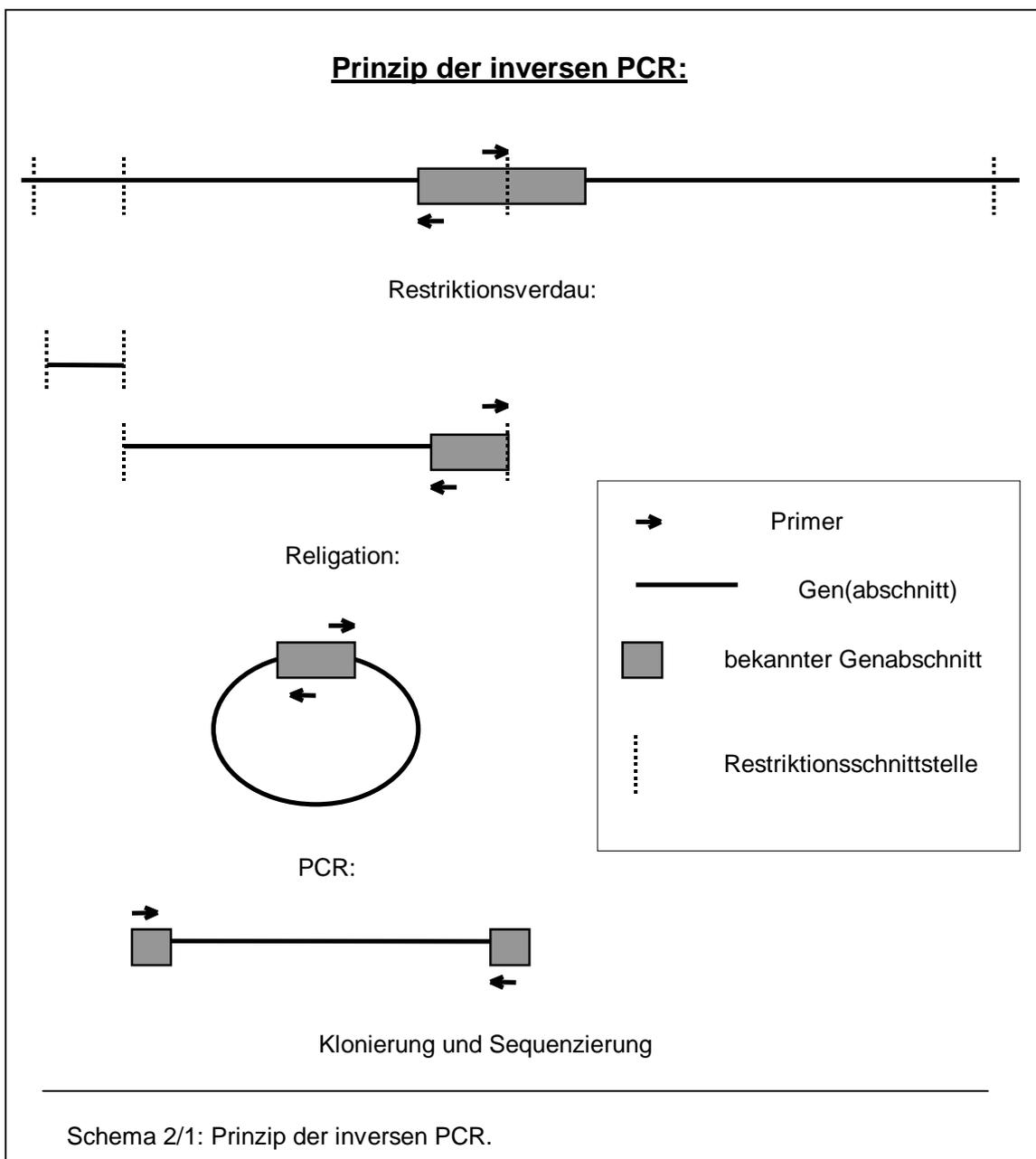
Die AT wurde hier 2°C unter der niedrigeren optimalen Temperatur der beiden Primer gewählt. Die ET entsprach 1,5min für jede Kilobase des zu erwartenden PCR-Produktes.

2.7.6. Inverse PCR

Ausgehend von einem kleineren bekannten Sequenzabschnitt wurden das gesamte Gen und anliegende Regionen mit Hilfe der inversen PCR identifiziert (Silver, 1992). Hierbei wird genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente zerkleinert. Diese Nukeinsäureabschnitte werden mit sich selbst zu zirkulären Strukturen religiert und anschließend wird ausgehend von Primern der bekannten Sequenz der unbekannte Anteil des Rings in der PCR amplifiziert. Dieses PCR-Produkt kann dann kloniert und sequenziert werden. Für größere Abschnitte bzw. 5'- und 3'-terminale Regionen eines Gens sind häufig mehrere Zyklen der inversen PCR erforderlich (vgl. Schema 2/1).

Je 1µg der DNA des Stammes SC5314 wurden mit den Enzymen *Accl*, *XhoI* bzw. *BspDI* verdaut. Zur Religation der verdauten DNA wurde ein Aliquot (etwa 0,2µg) in einem Endvolumen von 200µl mit 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer und einer Einheit T4-Ligase für 12-16h bei 14°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA phenolisiert, präzipitiert und in einem Volumen von 30µl Aqua dest. aufgenommen. 10µl der religierten DNA wurden mit geeigneten Primern, für den 5' (WH1, WH2) und 3' (WH3, WH4) unbekanntem Bereich des *PHR3*-Gens, in eine PCR eingesetzt. Hieraus resultierte aus der *BspDI* verdauten und religierten DNA mit den Primern WH1 und WH2 ein Produkt von etwa 2,2kb, mit den Primern WH3 und WH4 ein Amplifikat von 1,8kb. Ausgehend von der *Accl* verdauten

DNA zeigte sich nach PCR mit den Primern WH1 und WH2 in der Gel-Elektrophorese eine Bande von etwa 2,5kb. Alle PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Gel-Extraktion aufgereinigt und dann entsprechend der TOPO-Klonierung in den Vektor pCR2.1 ligiert und transformiert (vgl. Punkt 2.7.6). Plasmide wurden mit Quiagen Mini Kit präpariert (s. 2.7.2). Die Introns wurden mit den vektorspezifischen Primern T7 und M13 sowie mit *PHR3*-spezifischen Primern sequenziert.



2.8. Klonierung

2.8.1. Erstellung von stumpfen DNA-Fragmentenden ("Blunten")

Wenn keine kompatiblen Schnittstellen der DNA-Restriktionsfragmente von Vektor bzw. Plasmid und Insert gefunden werden konnten, wurde(n) an einer oder beiden Ligationstellen die Überhänge der kohäsiven Enden ("sticky ends") entfernt und beidseits der Ligationstelle universell passende stumpfe Enden ("blunt ends") mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase erstellt. In einer balancierten Reaktion hat dieses Enzym eine DNA-Synthese-Aktivität in 5'→3' Richtung, zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA-Enden, und eine Exonuklease-Aktivität in 3'→5' Richtung, welche den Abbau von überhängenden 3'-DNA-Enden bewirkt. Hierfür wurde die DNA in 1 x T4-DNA-Polymerase-Puffer oder einem geeigneten Restriktionspuffer supplementiert mit 50µg/ml BSA und 100µM dNTP, mit 1-2 Einheiten der T4-DNA-Polymerase für 20min bei 12°C inkubiert. Durch Erhitzen auf 75°C für 10min wurde das Enzym inaktiviert und die Reaktion gestoppt.

2.8.2. Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden

Um die Religation des Vektors/Plasmids ohne Einbau des Inserts zu verhindern, wurden die terminalen Phosphatgruppen an den offenen 5' DNA-Enden vor der Ligation abgespalten. Hierzu wurde der Ansatz linearisierter Vektoren, im Anschluß an den Restriktionsverdau und vor Phenolisierung und Aufreinigung, mit 0,01-0,1 Einheiten/(pmol 5' Termini) Shrimp alkalischer Phosphatase für 30min bei 37°C im Puffer der Restriktionsendonuklease oder in 1 x SAP-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 68°C für 15min.

2.8.3. Ligation

Die DNA-Ligase katalysiert *in vitro* die Ausbildung von kovalenten 3'->5' Phosphodiesterbindungen zwischen zwei kompatiblen Restriktionsschnittstellen. Ein DNA-Fragment als Insert und ein linearisierter Vektor werden so zu einem geschlossenen Plasmid verbunden. Für den Zusammenschluß von zwei unterschiedlichen DNA-Abschnitten wurden diese mittels Gel-Extraktion aufgereinigt. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20µl, mit 2µl Ligase-Puffer und einer Einheit T4-DNA-Ligase bei 14°C über 10 bis 16h. Für Insert und Vektor wurde dabei, nach Schätzung der Volumina im Agarose-Gel im Vergleich zum DNA-Marker, ein Verhältnis von etwa 5:1 bis 10:1 gewählt. Es wurde parallel jeweils eine Kontrolle bestehend aus Vektor ohne Insert mitgeführt. Zur Aufreinigung wurden die Ligationsansätze phenolisiert, präzipitiert, gewaschen, getrocknet und in 10µl Aqua dest. resuspendiert.

2.8.4. Herstellung elektrokompetenter Zellen

10ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden in 700ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C im Schüttelbad mit 250Upm inkubiert bis zu einer OD600 von 0,6. Anschließend wurden die Kulturen für 15min auf Eis gelagert, die Zellen mit 4000Upm abzentrifugiert und erneut für 15min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit 250ml und mit 200ml eiskaltem Aqua dest. gewaschen, abzentrifugiert und in 20ml 10% Glycerin resuspendiert. Darauf wurden sie erneut abzentrifugiert, getrocknet und in 1,5ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in Portionen zu 40µl in vorgekühlte 0,5ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.8.5. Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Vorsichtig wurden 5-10µl der aufgereinigten Ligation untergemischt und dieser Ansatz blasenfrei in eine Elektroporationsküvette pipetiert. Diese wurde für 5min auf

Eis gekühlt und anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Spannung von 2,5kV bei einer Kapazität von 25 μ FD und 400 Ω Widerstand elektroporiert. Nach Zugabe von 1ml SOC-Medium wurden die Zellen zur Regeneration für 30min bei 37°C inkubiert. Zum Einengen des Volumens wurden die Zellen dann vorsichtig bei 4000Upm für 1min abzentrifugiert, 0,8ml des Überstandes abpipetiert und die Zellen im Restvolumen resuspendiert und auf einer geeigneten Selektiv-Nähragarplatte (LB-Ampicillin-Agar) ausplattiert. Geeignete Klone wurden unter Berücksichtigung der Klonierungseffizienz der Ligationskontrolle durch Plasmidpräparation, Restriktionsverdau oder PCR des Inserts selektiert.

2.8.6. Klonierung in *E. coli*

Zur Sequenzierung und zur Amplifikation für weitere Klonierungsschritte wurden PCR-Produkte in den Vektor pCR2.1 mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit kloniert. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde im ersten Schritt das PCR-Produkt als Insert in den Vektor pCR2.1 über 5min ligiert und im zweiten direkt anschließenden Schritt mit den chemisch kompetenten Topo One Shot Zellen vermischt, 30min auf Eis gelagert und anschließend durch Hitzeschock bei 42°C für 30sec kloniert. Nach einer Inkubation für 30min in SOC-Medium wurden die Zellen auf LB-Agar ausplattiert. Als Selektionsmarker war diesen Platten Ampicillin zugegeben und zusätzlich 1ml X-Gal-Stocklösung aufgetragen worden. Die gewünschten Klone wurden durch weiße Koloniefarbe, Plasmidpräparation oder PCR mit den vektorspezifischen Primern T7 und M13 identifiziert.

PCR-Produkte, welche mit einer Pfu-Polymerase erstellt wurden, haben wegen der zusätzlichen Exonuklease-Aktivität des Enzyms stumpfe ("blunt"), nicht phosphorylierte Enden. Daher erfolgte hier als Zwischenschritt zur Erhöhung der Klonierungseffizienz eine Phosphorylierung. Nach der Amplifikation wurde dem Ansatz 10mM ATP und 1-2 Einheiten der Taq-Polymerase zugegeben und dieses für 30min bei 72°C inkubiert. Danach schloß sich die Gelextraktion an.

2.9. Transformation von Hefen

2.9.1. Spheroblasten-Transformation

Eine Übernachtskultur der Hefen in 10ml YPD-Medium wurde in 200ml YPD angeimpft, gegebenenfalls wurden Auxotrophien supplementiert (z. B. mit 25mg/ml Uridin), und diese Kultur im Schüttelbad bei 30°C inkubiert, bis nach etwa 4h eine Zellzahl von $2,5 \times 10^7$ erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1ml 1M Sorbitol gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils bei 4000Upm über 5min. Anschließend wurden die Zellen in 19,6ml SPE-Puffer mit 40µl β-Mercaptoethanol gelöst, 0,4ml einer frischen 0,09% Zymolase-Lösung zugegeben und für 12min bei 30°C inkubiert (Andauen der Zellwand). Durch vorsichtiges Zentrifugieren über 5min bei 2000Upm wurden die Zellen pelletiert, zunächst mit 20ml 1M Sorbitol, dann mit 10ml STC gewaschen und schließlich in 1,5ml STC aufgenommen und zu Portionen von 100µl aliquotiert. Einem Aliquot wurden je 5µl Lachssperm-DNA (5mg/ml) und Plasmid-DNA zugegeben und für 15min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1ml PEG8000/Tris/CaCl₂ wurde der Ansatz erneut für 10min bei RT gelagert und dann die Zellen vorsichtig pelletiert durch Zentrifugation über 10min bei 2000Upm, der Überstand verworfen und die Zellen zur Regeneration in 150ml SDS gelöst und für 30min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf YNB-Platten mit Sorbitol ausplattiert und für 2 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Transformanten wurden durch Prototrophie des Selektionsmarkers (meist Uridin) und PCR oder Southern-Blot kontrolliert (modifiziert nach Beggs, 1978; Rose et al., 1990).

2.9.2. Lithiumacetat-Transformation

Die Zellzahl einer Übernachtskultur in YPD-Medium wurde bestimmt und 1×10^7 Zellen in 50ml vortemperiertes neues YPD-Medium gegeben (entspricht 2×10^6 Zellen/ml). Auxotrophien des Stammes wurden jeweils supplementiert. Im Schüttelbad wurden die Hefen bei 30°C inkubiert bis eine Zellzahl von 1×10^7

Zellen/ml erreicht war. Die Zellen wurden über 5min bei 4000Upm pelletiert, der Überstand verworfen und die Hefen zunächst in 1,5ml Aqua dest. und dann in 500µl 1 x TE/1 x LiAc gewaschen (Zentrifugation bei 4000Upm über 10sec). Dann wurde die Zellzahl in neuem 1 x Te/1 x LiAc durch Auszählen, Verdünnen oder Abnehmen von Überstand auf 1×10^9 /ml eingestellt und zu Portionen von je 50µl aliquotiert. Einem Ansatz wurde 10µl Lachssperm-DNA, welcher vorher über 5min bei 95°C denaturiert wurde, 300µl PEG/TE/LiAc und die Plasmid-DNA etwa 10µg in 10µl zugegeben und für 30min im Wasserbad bei 30°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen zum Hitzeschock für 2min bei 42°C gelagert, kurz abzentrifugiert mit 200µl Aqua dest. gewaschen, in 200µl 1 x TE aufgenommen und auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationsphase von 2 bis 4 Tagen wurde die DNA einzelner Kolonien präpariert und zusätzlich zum Nachweis der neuen Prototrophie mit Hilfe der PCR oder mit Southern-Blot und Hybridisierung untersucht und geeignete Transformanten ausgesucht (Gietz et al., 1995).

2.10. RNA-Arbeiten

Vor Arbeitsbeginn wurden die Arbeitsfläche und alle Materialien gereinigt, desinfiziert und mit 10%-SDS Lösung abgewischt. Pipettenspitzen wurden doppelt autoklaviert und nur DEPC vorbehandeltes Aqua dest. (im weiteren "DEPC-H₂O") verwendet.

2.10.1. RNA-Präparation

Zur Isolierung der RNA wurde das gewünschte Medium mit der Keimzahl aus einer Übernachtskultur angeimpft, welche etwa einem Hundertstel bis einem Zwanzigstel der maximalen Keimdichte dieses Stammes in dem spezifischen Medium entspricht. So wurde von SC5314 in YPD zur Induktion 2×10^7 Zellen inokuliert, da das Plateau (steady state) von diesem Wildtyp-Stamm in YPD bei etwa 2×10^9 Keimen/ml liegt. Die Kultur wurde für 1-3h bei 37°C inkubiert. Danach wurden alle Arbeitsschritte auf Eis oder mit gekühlten Zentrifugen

(4°C) durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert über 5min bei 5000Upm, in 1-2ml DEPC-H₂O gewaschen und in 600µl TES resuspendiert. Nach Zugabe von 600µl saurem Phenol wurde der Ansatz für 60min bei 65°C inkubiert und dabei alle 15min für 10sec kräftig gemixt. Dann wurde das Reaktionsgefäß für 10sec in ein -80°C Bad aus Trockeneis in Ethanol getaucht und anschließend für 5min bei 12000Upm zentrifugiert. Die obere hydrophile Phase (ca. 600µl) wurde in ein neues Gefäß überführt, erneut saures Phenol im Verhältnis 1:1 zugegeben, jeweils 10sec gevortext und in ein -80°C Bad getaucht und dann für 5min bei 12000Upm zentrifugiert. Um eine Kontamination durch Proteine weitestgehend zu vermeiden, wurde sukzessive ein Volumen von 550µl und 500µl des wässrigen Überstandes phenolisiert und am Ende 400µl der hydrophilen Phase präzipitiert und in 30 bis 100µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA wurde stets separat bei -80°C gelagert.

2.10.2. Northern-Blot

Zum Transfer der Gesamt-RNA eines Stammes unter spezifischen Induktionsbedingungen wurde die RNA vor der Größenauftrennung in der Gel-Elektrophorese bereits mit Formaldehyd denaturiert, so dass die RNA-Moleküle in einer entfalteten linearen Form vorliegen. Die RNA des gefärbten und dokumentierten Gels konnte so ohne weitere Vorbehandlung mittels vertikaler Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran transferiert und mit dieser vernetzt werden. Der Aufbau des Blots, der 20 x SSC-Puffer und der Ablauf entsprach hierbei der beim Southern-Blot beschriebenen Vorgehensweise.

2.11. Radioaktive Arbeiten

Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden in dem für diese Zwecke eingerichteten und zugelassenen Labor durchgeführt und die erforderlichen Sicherheitsbestimmungen strikt eingehalten.

Zum Nachweis von RNA- und DNA-Abschnitten bestimmter Gene wurde die gesamte RNA oder DNA nach Transfer auf eine Membran mit radioaktiv markierten genspezifischen Sonden hybridisiert und das Signal durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert.

2.11.1. Erstellung von radioaktiv markierten genspezifischen Sonden

Für Sonden wurden Plasmide oder aufgereinigte PCR-Produkte von Plasmiden verwendet. Um eine möglichst reine Sonde ohne kontaminierende genomische DNA zu erzielen, wurde für die Hybridisierung des *PHR3*-Gens eine PCR-Amplifikation mit den Primern EM3 und EM4 und dem Plasmid pEM3/4 als Template durchgeführt und das erhaltene Produkt mit Hilfe der Gelextraktion aufgereinigt. Zur Kontrolle der *PHR3*-Disruption wurde das aufgereinigte PCR-Produkt der Primer WH13 und WH24 eingesetzt. Die Untersuchung von *PHR1* erfolgte mit dem Plasmid pFM30, für eine *PHR2*-spezifische Sonde wurde das 1,6kb große *HindIII*-Fragment des Plasmids pFM5 verwendet. Für die Actin-sonde wurde das 1,2kb große PCR-Produkt der Oligonukleotide Act-Ca1 und Act-Ca2 aufgereinigt.

Für die radioaktive Markierung wurden kurze randomisierte Oligonukleotid-Primer an die denaturierte einstränge DNA angelagert und mit Hilfe einer Klenow-Polymerase ohne 3' Exonuklease-Aktivität radioaktives Monophosphat als Nukleotidmonophosphat-Gruppe an die freien Hydroxylgruppen der Random-Primer angefügt.

Diese Reaktion wurde mit dem Prime-It II Random Primer Labeling Kit durchgeführt. Dabei wurde etwa 0,2-0,5ng DNA in 23µl Aqua dest. mit 10µl der Random Oligonukleotid-Primer für 5min in kochendem Wasserbad denaturiert, kurz abzentrifugiert und nach Zugabe von 10µl 5 x dCTP-Primer-Puffer (enthält dATP, dGTP und dTTP, kein dCTP), 5µl [α - 32 P]-dCTP, und 1µl Exo(-)Klenow Polymerase (entspricht 5 Einheiten) für 20 - 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2µl Stopmix beendet und danach überschüssige freie Aktivität mit Hilfe des Nukleotide Removal Kits entsprechend

den Angaben des Herstellers über Ionenaustauschersäulen entfernt und die aufgereinigte Sonde in 200µl Aqua dest. aufgenommen. Von einer Probe der Sonde von 2µl wurde im Szintillationszähler mit Hilfe des Programms Counter Diagnostics (Version 1.06) die Radioaktivität bestimmt. Ab 1×10^6 Signalen/min ist eine ausreichende Aktivität sichergestellt.

2.11.2. Hybridisierung

Die zu untersuchende Membran wurde mit der ursprünglich dem Gel zugewandten Seite nach innen in einen Glaskolben gelegt und für 30min mit 20ml Monodpuffer im Hybridisierungsofen bei 65°C präinkubiert. Danach wurde der Puffer durch einen neuen vorgewärmten Monodpuffer ersetzt und die vorbereitete radioaktiv markierte Sonde einsträngig, nach Denaturierung über 5min im kochenden Wasserbad, hinzugegeben. Die Hybridisierung wurde im rotierenden Glaskolben unter stringenten Bedingungen von 65°C über 10-24h durchgeführt. Im Anschluß wurden Puffer und Sonde entsorgt und die Nylonmembran für 2 x 30min mit Waschpuffer von ungebundener Radioaktivität gereinigt. Die Abdrücke der Geltaschen auf der Membran wurden zur Orientierung mit einem Gemisch aus Tusche und verdünnter Restradioaktivität markiert. Dann wurde die Membran in Klarsichtfolie eingelegt und in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Zeitraum der Exposition des Röntgenfilms richtete sich nach der Stärke des zu erwartenden Signals und der nach der Hybridisierung gemessenen Signalintensität des Blots und variierte von 4h bis 3d. Bei Bedarf wurde ein zweiter Film für einen veränderten Zeitraum exponiert.

2.12. Erstellung der cDNA mit Hilfe der rTPCR

Die primäre RNA als originales Transkript der DNA wird zur messenger RNA (mRNA) modifiziert. Im Rahmen dieser Prozessierung werden Introns anhand ihrer Signalsequenzen ausgeschnitten (Spleißen) und die verbleibenden Exons aneinandergelängt. Zusätzlich wird das 3'-terminale Ende zum Schutz vor

Degradation polyadenyliert, das heißt es wird eine Kette aus Adenosinen angehängt. Das primäre Transkript und die mRNA beginnt oberhalb des Translationsstartpunktes des Proteins (ATG) und endet hinter dem Translationsstoppsignal (TAA).

Um das offene Leseraster des *PHR3*-Gens exakt zu bestimmen sollte der Translationsendpunkt und ein potentielles Intron nachgewiesen werden. Hierfür wurde mit Hilfe der reversen Transkription der 5'-terminale und der 3'-terminale Teil der modifizierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend nach Amplifikation mit der PCR und Klonierung durch Sequenzierung bestimmt. Durch Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen Nukleinsäuresequenz eines Gens können die genauen Spleiß-Schnittstellen eines Introns bestimmt und das letzte Stop-Kodon innerhalb des durchgehenden Leserasters als Translationsendpunkt nachgewiesen werden. Für diese Untersuchung wurde die Überexpressionsmutante CWH2 verwendet, da bei diesem Stamm eine stärkere Genexpression von *PHR3* und somit mehr *PHR3*-RNA vorliegt.

2.12.1. DNase-Verdau

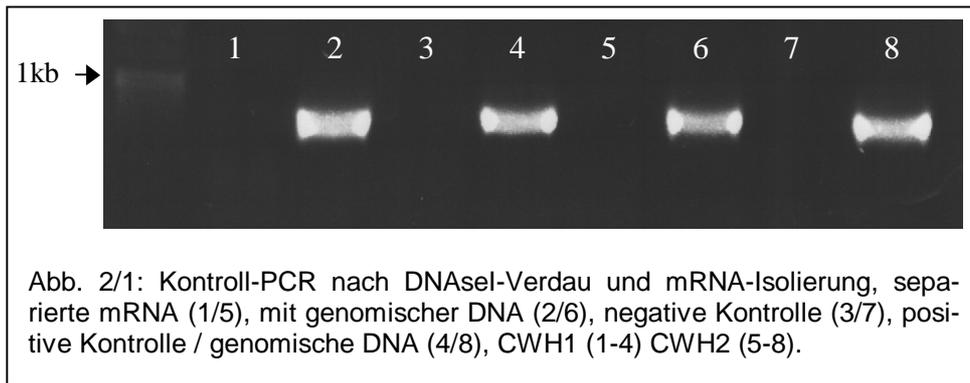
Reste genomischer DNA nach der RNA-Präparation konkurrieren in der PCR mit der cDNA und können insbesondere bei schwach exprimierten Genen mit geringen Mengen an genspezifischer mRNA das Ergebnis verfälschen. Daher wurde zunächst die DNA verdaut. Zu diesem Zweck wurde 50µl der präparierten RNA (etwa 5-20µg) mit 3 Einheiten DNase I in 1 x DNase-Puffer und DEPC-H₂O mit einem Gesamtvolumen von 200µl für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl 10 x Terminator Mix gestoppt. Dann wurde die RNA phenolisiert, präzipitiert und das Pellet wurde in 200µl DEPC-H₂O aufgenommen.

2.12.2. Isolierung der mRNA

Zur weiteren Aufreinigung der modifizierten RNA wurde die mRNA mit Hilfe von Dynabeads isoliert. Das Primärtranskript der RNA wird durch Spleißen der Introns und durch Polyadenylierung des 3'-Terminus modifiziert. Das Prinzip der mRNA-Isolierung beruht darauf, daß dieser angehängte Poly-Adenosin-Schwanz an komplementären Thyminen einer Oligo-Deoxy-Thymidin-(25)-Kette haftet, wobei letztere ihrerseits an Eisenpartikel gebunden ist. Mit Hilfe eines Magneten werden diese Partikel aus der gesamten RNA herausgefischt und anschließend zweifach mit Waschpuffer gereinigt. Diese Separation wurde mit Hilfe des Dynabeads mRNA Direkt Kits, entsprechend den Angaben des Herstellers, durchgeführt.

2.12.3. PCR-Kontrolle

Um nach der zweifachen Aufreinigung der mRNA kontaminierende DNA und damit fehlerhafte Ergebnisse, wie eine nicht gespleißte Nukleinsäuresequenz, ausschließen zu können, wurde vor der reversen Transkription eine Kontroll-PCR durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot der mRNA nativ und, um eine Hemmung der PCR durch Puffer oder Reste der Aufreinigung ausschließen zu können, mit Zusatz von genomischer DNA, sowie als weitere positive Kontrolle genomische DNA des Wildtyp-Stamms SC5314 und eine negative Kontrolle ohne DNA oder RNA mitgeführt. Es wurden hier mit WH26 und WH1 dieselben Primer verwendet wie bei der späteren Amplifikation der cDNA. Die PCR erfolgte mit der Taq-Polymerase (wie unter 2.6.5 beschrieben) mit einer AT von 54°C und einer ET von 1,5min. Ein PCR-Produkt als DNA-Nachweis konnte in der Gel-Elektrophorese nur bei jenen Ansätzen sichtbar gemacht werden, bei denen zusätzlich DNA zugegeben wurden (Abb. 2/1). Die Amplifikation von *PHR3*-DNA war in der aufgereinigten mRNA nicht möglich.



2.12.4. Reverse Transkription

Die gesamte mRNA von CWH2 wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase und des Primers WH-1-RT in cDNA umgeschrieben. Als Enzym wurde die Superscript-Polymerase vom pol-Gen des Moloney-Murinen-Leukemie-Virus verwendet. Der Primer WH-1-RT setzt sich aus einer Poly-Thymidin-Kette, welche am Poly-Adenosin-Ende der mRNA anlagert, und einer spezifischen Sequenz, als Bindungsstelle für die nachfolgende PCR-Amplifikation mit dem Primer WH-2-RT zusammen. Da die 5'-Region häufig bereits degradiert ist, wurde zusätzlich spezifisch dieses Ende des *PHR3*-Gens mit dem *PHR3*-antisense Primer WH1 in cDNA umgeschrieben.

2pmol des jeweiligen Primers wurden an 11µl der kontrollierten mRNA durch Inkubation bei 70°C über 10min angelagert (Annealing). Anschließend wurden 4µl 5 x First Strand Puffer, 2µl 0,1M DTT und 1µl 5mM dNTP auf Eis zugegeben, 2min bei 42°C präinkubiert und dann mit 1µl Superscript II Polymerase (entspricht 200 Einheiten) über 50min bei 42°C der erste Strang der komplementären DNA von der RNA synthetisiert. Durch Erhitzen auf 70°C über 15min wurde das Enzym inaktiviert.

2.12.5. PCR und Klonierung

Die Einzelstrang-DNA der reversen Transkription wurde mit Hilfe der PCR mit der Taq-Polymerase entsprechend Punkt 2.6.5 zur Doppelstrang-DNA ergänzt und amplifiziert. Für die gesamte cDNA aus der reversen Transkription mit dem

Primer WH-1-RT erfolgte dies mit dem Primer WH-2-RT und den Primern WH4 und WH26, für die *PHR3*-spezifische cDNA mit den Primern WH3 und WH26. Parallel wurde ein Ansatz mit genomischer DNA von *Candida albicans* als Kontrolle mitgeführt. Bei der Amplifikation mit dem synthetischen Primer WH-2-RT erzielt diese Kontrolle kein Produkt, denn die Bindungsstelle des Primers war erst bei der reversen Transkription künstlich durch den Primer WH-1-RT an die cDNA angehängt worden und fehlt in der nativen Sequenz. Für die PCR der genomischen DNA mit den *PHR3*-spezifischen Primern WH26 und WH3 zeigte sich in der Gel-Elektrophorese ein Produkt, welches etwa 50bp größer war als das PCR-Produkt der gleichen Primerkombination mit der cDNA. Diese Differenz ist durch das genomisch vorliegende in der cDNA fehlende Intron verursacht. Schwächere Banden dieser cDNA-Amplifikation welche dem Produkt der genomischen DNA in der Größe entsprechen können durch unprozessierte primäre RNA oder geringste Mengen zuvor nicht detektierter genomischer DNA erklärt werden.

Die PCR-Produkte der cDNA wurden mit Hilfe der Gel-Extraktion aufgereinigt, in den pCR2.1 Vektor kloniert, die Plasmide präpariert und abschließend sequenziert (vgl. 2.5.3, 2.5.4, 2.7.6, 2.12).

2.13. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach dem Kettenabbruchverfahren mit fluoreszenz-markierten Terminatoren (Sanger et al., 1977; Sanger, 1981).

Entsprechend dem Vorgehen bei der Polymerase Kettenreaktion wird hierbei der komplementäre Strang zur initial einsträngigen DNA mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase verlängert. Zusätzlich werden dem Reaktionsansatz 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben, welche mit den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) um die Bindungsstellen konkurrieren und zufällig eingebaut werden. Diese 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate können jedoch wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe nicht verlängert werden und führen zum Kettenabbruch. Es entsteht so eine Mischung von unterschiedlich langen,

partiell doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Diese werden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Größe des jeweiligen Abschnittes entspricht hierbei der Position des ddNTP im Genprodukt und somit der Entfernung vom Primer. Da die ddNTPs fluoreszenz-markiert sind, können diese Enden des komplementären Stranges mit Hilfe eines Laserscanners detektiert und die Nukleinsäure identifiziert werden. Die Signale werden dann vom automatischen Sequenziergerät entsprechend der Größe des DNA-Fragmentes zu einem Chromatogramm addiert und von den einzelnen Signalsummen jeder Position die Nukleinsäuresequenz abgeleitet.

Reaktionsansatz: 0,4µg DNA (bei Plasmiden, 0,2µg bei PCR-Produkten)
 5pmol Primer
 2µl Prämix
 ad 10µl Aqua dest.

Prämix stammt aus dem ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit und enthält dITP, dATP, dCTP, dTTP, Dye-Terminatoren, Tris/HCl pH 9,0, MgCl₂, thermostabile Phosphatase und AmpliTaq-DNA-Polymerase

Sequenzierung:	<u>Schritt:</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
	Denaturierung	10sec	96°C
	Hybridisierung	5sec	primerspezifisch
	Synthese	4min	60°C

Die genspezifischen Primer für die Sequenzierungen wurden von bereits bekannten Sequenzabschnitten abgeleitet. Es wurden jeweils beide Stränge eines DNA-Moleküls sequenziert und jede Base mindestens viermal bestimmt.

Die Chromatogramme wurden mit Hilfe des „Sequence Editors“ kontrolliert und die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe von „Lasergene“ bearbeitet und analysiert.

2.14. Blast

Zur Untersuchung einer bekannten Sequenz eines Gens oder eines Genabschnitts wurde dieser im Programm BlastP unter der Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov eingegeben und nach verwandten Genen gesucht.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation und Sequenzierung einer zu *PHR1* und *PHR2* homologen Sequenz bei *Candida albicans*

Ausgehend von einem Sequenzabschnitt von 609bp Länge mit Homologie zu den bereits bekannten GAS-homologen Genen bei *Candida albicans*, *PHR1* und *PHR2*, sollte ein weiteres Gen dieser Familie identifiziert werden. Das initiale Genfragment entstammt einer EST-Bank von Nukleinsäureabschnitten exprimierter Gene (Choi, G. et Calderone, R., persönliche Mitteilung).

Ein Vergleich mit den von *PHR1* und *PHR2* abgeleiteten Proteinen zeigt, dass die von diesem Sequenzabschnitt abgeleitete Aminosäuresequenz die größte Ähnlichkeit mit den Aminosäuren 112 – 302 von Phr1p und 104 – 294 von Phr2p hat, dies entspricht den mittleren Regionen der bekannten Gene. Um die fehlenden 5'- und 3'-terminalen Genabschnitte zu ermitteln, wurde das Verfahren der inversen PCR gewählt. Mit drei Restriktionsendonukleasen (*AccI*, *BspDI*, *XhoI*), für welche in dem ursprünglichen Abschnitt zentral eine Schnittstelle verzeichnet war, wurde genomische DNA partiell verdaut, religiert und mit zwei Primerpaaren (WH1 und WH2 bzw. WH3 und WH4), auf beiden Seiten der potentiellen Restriktionsschnittstellen, eine PCR durchgeführt (vgl. Schema 2/1).

Unter Verwendung des *AccI*-Restriktionsverdau für die inverse PCR wurde ein 2,5kb großes Fragment amplifiziert, für welches in den folgenden Sequenzierungen kein Bereich der Ausgangssequenz nachgewiesen werden konnte. Aus der inversen PCR mit dem Restriktionsenzym *XhoI* resultierte kein Produkt. Nach Religation des *BspDI*-Partialverdau und PCR konnte in der Gel-Elektrophorese jeweils eine singuläre Bande für die Primerkombination WH1 und WH2 von einer Größe von 2,2kb und für die Primer WH3 und WH4 von 1,8kb nachgewiesen werden. In der Sequenzierung des ersten Fragments mit den genspezifischen Primern (WH1 bis WH6) und den vektorspezifischen Primern (T7 und M13) wurden neben Teilen der Ausgangssequenz bisher nicht bekannte 5' und 3' von dieser gelegene Nukleinsäureabschnitte identifiziert.

Die Primer WH9 und WH10 umschließen den linearisierten DNA-Abschnitt. In der Nukleinsäuresequenz von 1925bp kann ein potentielles Startkodon (ATG) und ein sich anschließendes durchgehendes offenes Leseraster von 1176bp Länge nachgewiesen werden. Sequenzanalysen zeigten eine typische Spleiß-Stelle eines potentiellen Introns im 5'-Ende und legten somit die Existenz eines weiteren kodierenden Bereichs oberhalb des bekannten Sequenzabschnittes nahe. Um ein solches erstes Exon sowie ausreichend 5'-terminale nicht kodierende Sequenz, welche den kompletten Promotor einschließen sollte, zu ermitteln, erfolgte die zweite Runde einer inversen PCR.

Ein Partial-Verdau genomischer DNA von *CAS8* mit den Enzymen *Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI und *Xba*I wurde aliquotiert und hiervon etwa 8µg in der Gel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mit Hilfe der Southern-Blot-Technik auf eine Nylonmembran aufgetragen. Mit den Primern WH10 und WH11 wurde eine spezifische Sonde für den 5'-terminalen Bereich amplifiziert und mit 32 P radioaktiv markiert. Nach Hybridisierung des Southern Blots konnte für den *Pst*I-Verdau ein Signal von etwa 7kb, für die Restriktion mit *Bam*HI von 1,2kb sowie für *Sal*I und *Xba*I von über 8kb detektiert werden (Abb. 3/1). Da große

Fragmente für die Religation ungeeignet sind, wurden die Ansätze mit *Xho*I und *Sal*I verworfen. Ein Aliquot der Restriktionen mit *Pst*I und *Bam*HI wurde in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die zu den Signalen in der Hybridisierung korrespondierenden Gelabschnitte ausgeschnitten, extrahiert, aufgereinigt und religiert. Die inverse PCR wurde abgeschlossen durch die Amplifikation mit den Primern WH13 und WH16. Einzig aus dem *Bam*HI-Ansatz resultierte hierbei ein Produkt in der erwart-

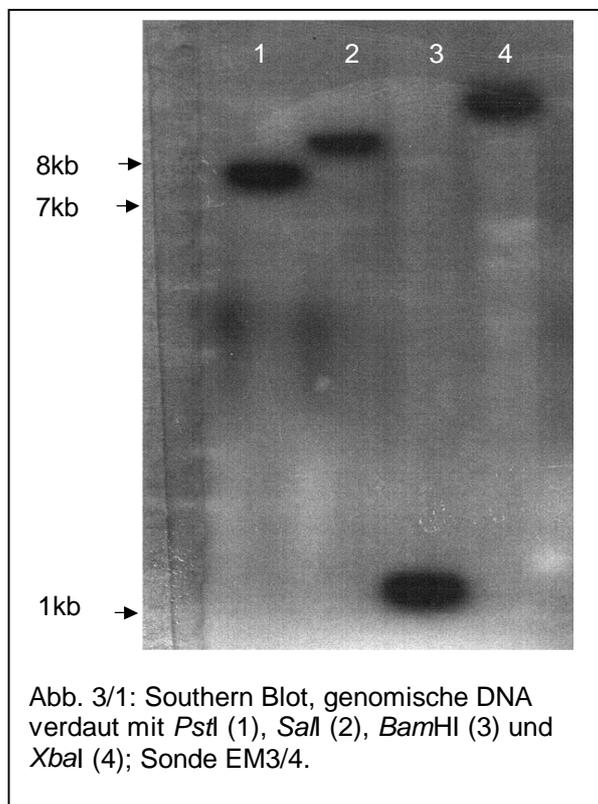


Abb. 3/1: Southern Blot, genomische DNA verdaut mit *Pst*I (1), *Sal*I (2), *Bam*HI (3) und *Xba*I (4); Sonde EM3/4.

ten Größe von 1,1kb. Die Differenz zum Hybridisierungssignal von etwa 0,1kb ist durch den in der zirkulären Form zwischen den Primern liegenden, nicht amplifizierten Genabschnitt erklärt. Das erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert. Begrenzt durch zwei *Bam*HI-Schnittstellen (GGATCC) ist es 1128bp lang. Bei einer Überlappung von 173bp mit der Sequenz von p9/10 resultiert somit eine Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 2879bp.

Zur Verifikation der erhaltenen Sequenz wurde diese mit unterschiedlichen Primerpaaren in mehreren getrennten PCR erneut amplifiziert. Hierfür wurde genomische DNA vom *Candida albicans* Wildtyp-Stamm SC5314 verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Gel-Extraktion aufgereinigt, in den Vektor pCR 2.1 transformiert und kloniert. Von allen Transformationen wurden mindestens 5 Kolonien erneut ausgestrichen und die Plasmide präpariert. Durch Restriktionsverdau wurde die korrekte Größe überprüft und von jeweils zwei Inserts die Sequenz analysiert. Die Plasmide wurden in beiden Richtungen sequenziert und somit jede Nukleinsäure eines Plasmids in vier unabhängigen Analysen bestimmt.

Mit den Primern WH34 und WH 9 wurde somit das Plasmid p3g-34/9 erstellt. Hierfür wurde die Proof-reading-Polymerase Pfu verwendet, da diese zusätzlich falsch eingebaute Nukleotide korrigiert. Der Primer WH34 setzt hierbei 16 Nukleotide nach der 5' *Bam*HI-Stelle an. Weiterhin wurde der zentrale Bereich, welcher das offene Leseraster und die Region des Terminators umfasst, mit den Primerpaaren WH-Eco2/WH-Nhe1 und WH-Eco4/WH-Nhe1 amplifiziert. Neben den zur bekannten DNA homologen Sequenzabschnitten von 21 (WH-Eco2 und WH-Eco4) und 20 Nukleotiden (WH-Nhe1), für das Annealen,

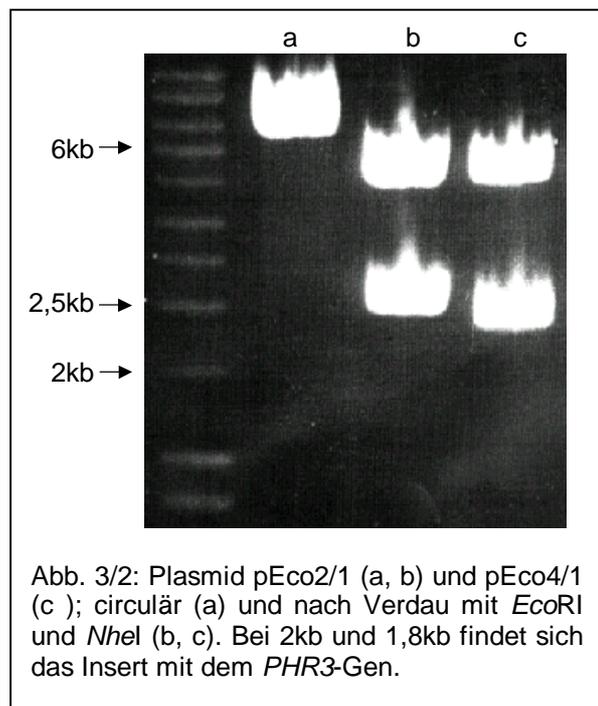


Abb. 3/2: Plasmid pEco2/1 (a, b) und pEco4/1 (c); circular (a) und nach Verdau mit *Eco*RI und *Nhe*I (b, c). Bei 2kb und 1,8kb findet sich das Insert mit dem *PHR3*-Gen.

wurde den Oligonukleotiden eine *EcoRV*- Schnittstelle (für WH-Eco2 und WH-Eco4) bzw. eine *NheI*-Schnittstelle (für WH-Nhe1) angehängt. Diese Restriktionsstellen dienen dem Ausschneiden der Sequenz aus einem Vektor bei folgenden Klonierungsschritten und bei Plasmidkonstruktionen. Beide Schnittstellen sind nicht innerhalb des DNA-Abschnitts nachweisbar. Bei den resultierenden Plasmiden pEco2/1 und pEco4/1 wurden die korrekte Größe des Inserts und die Schnittstellen mit einem Doppelverdau mit *EcoRV* und *NheI* bestätigt (Abb. 3/2). Diese Plasmide (Pfu-Eco2/1 und Pfu-Eco4/1) wurden ebenso mit der Proof-reading-Polymerase Pfu erstellt.

Die einzelnen Sequenzen aller Plasmide wurden mit Hilfe des Programms Sequence Manager analysiert und die daraus resultierende Summationssequenz bestimmt. Einzelne divergierende oder nicht sicher bestimmte Nukleinsäuren, als Folge von Signalüberlagerungen, lagen stets in nur einer einzelnen Sequenzierung vor. Da in allen weiteren Sequenzanalysen unabhängig voneinander ein identisches Nukleotid festgestellt wurde, konnte die mit Hilfe der inversen PCR erhaltene Sequenz bestätigt werden (Abb. 4/1).

3.2. Bestimmung des offenen Leserasters und der Aminosäuresequenz

Aus der DNA-Sequenz sollte nun das offene Leseraster identifiziert werden, welches für ein PHR/GAS-verwandtes Protein kodiert. Hierfür sind der Startpunkt und der Endpunkt der Transkription zu ermitteln und eventuelle Unterbrechungen des Leserasters nachzuweisen. In dem vorliegenden DNA-Abschnitt finden sich oberhalb des Startkodons des bereits erwähnten durchgehenden Leserasters zusätzliche Translationsstartsignale. Diese sind jedoch in einem versetzten Leseraster oder durch einen nicht kodierenden Nukleinsäureabschnitt vom beschriebenen, PHR/GAS-homologen Genabschnitt getrennt. Der potentielle Startpunkt ist also durch eine Anzahl von Nukleotiden vom Leseraster entfernt, welche nicht ein Vielfaches von drei ist, bzw. ist von diesem durch Basentriplets, welche für keine Aminosäure kodieren (Non-Sense-Triplets), getrennt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz für das durchgehende Leseraster von 1176bp entspricht 392 Aminosäuren (AS). Ein Vergleich dieser

Sequenz mit denen von Phr1p und Phr2p von 549 AS bzw. 547 AS (Mühlschlegel et Fonzi, 1997) zeigt eine Homologie, die erst 112 AS bzw. 104 AS vom Startpunkt dieser bereits bekannten Proteine beginnt. Sollte das neu zu identifizierende Gen eine äquivalente Größe haben, so war von einem getrennten zusätzlichen kodierenden Abschnitt (Exon) auszugehen.

Bei Analyse der Nukleinsäuresequenz finden sich die von *Saccharomyces cerevisiae* bekannten und über die Spezies hinaus konservierten Motive eines Introns. Hierzu zählen die 5' Schnittstelle aus der Nukleotidkombination G-U-A-Pyrimidin-G-U, eine 3' Schnittstelle aus drei Nukleotiden (Pyrimidin-A-G) und eine Verzweigungsstelle („branchpoint“), welche näher zum 3' Ende des Introns gelegen und durch die Nukleotidfolge von U-A-C-U-A-A-C definiert ist (Woolford, 1989). Die entsprechenden Nukleinsäuren der Schnittstellen in vorliegendem genomischen Abschnitt sind G-T-A-T-G-T (als 5' Ende) und C-A-G (3' Ende). Die Verzweigungsstelle, mit identischer Sequenz, findet sich 29 Nukleinsäuren nach der 5'- und acht Nukleinsäuren vor der 3'- Schnittstelle. Das Intron hat somit eine Größe von 53bp.

Nach Entfernen des als Intron identifizierten Sequenzabschnittes resultiert ein neues durchgehendes Leseraster. Dieses ist, ohne Stopkodon, 1461bp lang und teilt sich in zwei Exons von 111bp und 1350bp auf. Der Anfang ist durch das Startkodon ATG gekennzeichnet, das Genende wird durch ein mit dem Stoppsignal endendes Leseraster definiert. Von den drei Stopkodons „ambre“ (TAG), „opal“ (TGA) und „ochre“ (TAA) signalisiert hier das letztere das Kettenende für die Protein-Biosynthese.

Von dieser Gensequenz wurde mit Hilfe des Computerprogramms MapDraw die zugehörige Aminosäuresequenz abgeleitet. Hierbei wurde, entsprechend dem vom universellen genetischen Code abweichenden Code von *Candida albicans*, für das Basentriplett C-U-G die Aminosäure Serin verwendet (Santos et al., 1997). Es resultiert ein Protein mit 487 Aminosäuren.

In der Analyse der Aminosäuresequenzen mit dem Programm Protean wurde für das Protein eine theoretische Masse von 55320.90 m.w. errechnet. Es findet sich nach Ableitung der Hydrophilizität (Kyte-Doolittle-Blot) ein aminoterminaler

hydrophober Bereich von etwa 28 AS. Ein bei anderen Proteinen beschriebener carboxyterminaler hydrophober Bereich kann jedoch nicht abgeleitet werden. Auch eine Region mit hohem Serinanteil, Serin-Stretch genannt, findet sich nicht; insgesamt ist der Anteil von Serinen 6,37% nicht signifikant erhöht und ohne nachweisbare fokale Häufung.

3.3. Homologieanalyse und Namensgebung von *PHR3*

Um eine erste Zuordnung des sequenzierten Genes zu erhalten, wurde mit dem Blast-Verfahren nach bekannten Genen mit möglichst hoher Homologie gesucht. Es wurde, um störende Einflüsse des Introns zu vermeiden, die abgeleitete Aminosäuresequenz verwendet. Unter den ersten zehn gefundenen Sequenzen zeigen neun eine deutliche Homologie, während alle weiteren (High Score unter 100) keinen Anhaltspunkt für eine sequentielle Verwandtschaft ergeben (Tab. 3/1). Alle neun stammen von Hefen. Es handelt sich hierbei um die bereits bekannten Mitglieder der GAS/PHR-Genfamilie, mit den fünf GAS-Genen von *Saccharomyces cerevisiae*, *EPD1* von *Candida maltosa* und *PHR1* und *PHR2* von *Candida albicans*.

Aufgrund dieser signifikanten Verwandtschaft zu den Genen der GAS/PHR-Genfamilie erhielt das Gen als drittes bekanntes Gen bei *Candida albicans*, nach *PHR1* und *PHR2*, den Namen ***PHR3***. Das zugehörige Protein hat folglich den Namen Phr3p.

Um die Homologie der Gene exakt zu bestimmen, wurde die Nukleinsäuresequenz von *PHR3* mit denen von *PHR1*, *PHR2*, *GAS1*, *GAS4* und *EPD1* mit Hilfe des MegAlign Programms nach der Clustal-Methode aneinander gelagert und Ähnlichkeit bzw. Unterschiede berechnet (Tab. 3/2).

Da bei dem Vergleich mehrerer Sequenzen die Anlagerung nicht nach der maximalen Homologie aller anderen zu einer einzelnen Sequenz, in diesem Fall *PHR3*, erfolgt, ist hier der ermittelte Verwandtschaftsgrad zweier Sequenzen meist niedriger als im direkten, paarweisen Vergleich. Es wurde daher zusätzlich mit dem Programm Husar die abgeleitete Aminosäuresequenz von *PHR3* jeweils einzeln mit den Proteinen Phr1p und Phr2p von *Candida albicans* und

mit Gas4p bestimmt. Das letzte Protein wurde als einziges von *Saccharomyces cerevisiae* in den Vergleich eingeschlossen, da für dieses in den vorangegangenen Untersuchungen die höchste Homologie ermittelt werden konnte. In dieser paarweisen Zuordnung ergibt sich für Phr3p und Phr1p eine Ähnlichkeit von 51,96% und eine Homologie von 32,71%, für Phr3p und Phr2p sind die Werte 53,8% und 34,39% und für Phr3p und Gas4p 68,80% und 51,18%. Ein Homologievergleich der letzten vier genannten Proteine ist im folgenden dargestellt (Abb. 3/3).

In sechs Abschnitten der bekannten Gene der GAS/PHR-Familie wurden eine Reihe von Aminosäuren gefunden, welche sich bei allen bisher bekannten Genen in homologer Position nachweisen lassen (Popolo et Vai, 1999). Von den beschriebenen drei Aminosäuren in Box 1 finden sich alle in der von *PHR3* abgeleiteten Aminosäuresequenz wieder. Ebenso sind die drei in Box 2, neun in Box 4, 13 in Box 5 und 12 in Box 6 vollständig bei Phr3p nachzuweisen. Einzig in Box 3 existiert für das Phenylalanin in Position 165 von *PHR1* kein Äquivalent in Phr3p. Alle anderen fünf Aminosäuren dieses Bereichs liegen auch bei diesem Protein vor. Von 12 homologen Aminosäuren der Cys Box können nur fünf in Phr3p nachgewiesen werden. Die essentiellen Glutaminsäuren in Position 169 und 270 von *PHR1* (Fonzi, 1999) sind auch bei *PHR3* konserviert und entsprechen E157 und E261.

Abb. 3/3 auf der folgenden Seite: Alignment der Proteine Phr1p, Phr2p, Phr3p und Gas4p. Vergleich der von der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Zuordnung erfolgte mit dem Programm MegAlign. Homologe Aminosäuren wurden grau hinterlegt. Die essentiellen Glutaminsäuren in Position 169 und 270 von *PHR1* wurden mit einem Stern markiert. Die katalytischen (Box), serinreichen (Ser Box) und cysteinreichen (Cys Box) Abschnitte wurden entsprechend der für *PHR1* beschriebenen Lokalisation durch eine Linie über der Sequenz gekennzeichnet. Die Position der Aminosäuren ist rechts, der Name des Proteins links aufgeführt.

1	MYSLLKSLATFATLFSLLTLAKFFESST---	Box 1	PPVEVVGNKFFYSNNGSQFLIRGIA	YQQDAAGSVSSGYDAD	Phr1P
1	M--LLKSL--FPSI--LAATSFVSSVA		EDLPAIEIVGNKFFYSNNGSQFYIKGIA	YQQN-----NLD	Phr2P
1	M-----L--QCIL-IALILLVSI--		TANVHPIIHHGHYFIDISITKEPFIK	YQPGGSSAVSE-----	Phr3P
1	M-----MVFSSTF-IFLILLELVVL		CEASVHTIQIKDKHFVDTVTGKPF	FFIKGVYQYQPGGSSDVSE-----	Gas4P
		Box 2			
68	PNRKYNDPLADRACKRDVKYFK--		ESNTNTRVYADDPKDHEECMKIFSD	AGIYIVADLSEP--TVSINR	Phr1P
58	SNESFVDPPLANPEHCKRDI		PYLEAVDYDSNVIRVYALDTSQDHT	ECMQMLQDAGIYVIADLSQP--	Phr2P
56	---LNDPLSDPKCARDIILFQEL--		GINTIRIYSINAHLNHDKCMTLAK	AGIYFLFDVNSPLPHHLLNR	Phr3P
60	---KQDPLSNPDACARDIILFQEL--		GINTVRIYSINPDLNHDACMTL	AMAGIYLIILDVNSPLQNHLLNR	Gas4P
		Box 3			
136	NNPEW---NLDDLKRYTKVIDKMQE		YSNVLGGFFAGNEVTNNRNSNTD	ASAFVKAARI	Phr1P
128	DDPSW---DLDLFERYSVVDL		FHNNTIILGFFAGNEVTNKKSN	TDASAFVKAARI	Phr2P
122	YEP-WNSYNLYFENVF		KVVEQFQSHYNNTLGFIAGNE	IIVNDPISASVAA	Phr3P
126	YEP-WTTYNEVYLEHVFKVVEQF		QFQSHYNNTLGFFAGNEI	VNDKRSQYSPAYVKEL	Gas4P
		Box 4			
204	VGYSSNDDEEIRVAIADYFSCGSLD		---DRADFFGINM	YEWCGKSTFETSGYKDRTE	Phr1P
196	VGYSANDDSAIRVSLADYFACGDED		---EADFFGINM	YEWCGDSSYKAGYESAT	Phr2P
193	VGYSAADDLNYRMLAQYLEC		-GDDNPKESVDFYGVNSYQ	WCGDQTFYSGGYNIL	Phr3P
197	VGYSAADDLNYRVSLEYLECKDD		DKPENSVDYFYGVNSYQ	WCGGQTMQTSGYDTL	Gas4P
		Box 5			
273	CNANRRLFOEIGTLYS		DKMTDVWGGIIVMYFE	EANKYGLVSV	Phr1P
265	CNEVRPRKFT		EVATLFGDQMPVWGGIIVMYFE	EENNYGLVSIK	Phr2P
264	CNEVLP		RNFDEVPVLYTNDMIDV	FSGGLVYEFTQEPNNYGLV	Phr3P
269	CNKVLP		RQFQEI	GYLFSSEMYSVFCGGLV	Gas4P
		Box 6			
344	TSTLSSSDASKTLQCPGTA		ASTWKAATNLPPTPDES	YCDCISKSLECVVADD	Phr1P
336	ASAESASSISRT-TCP		-TNTNNWEASTNLPPTPDK	EVCECMSASLKC	Phr2P
331	--ELDYSYIIQSMKENAK		DIHQ-KLTTFKTSIPK--	CELSYPNLD--ISRGV	Phr3P
333	--NIEVP-SMKTLET		VQ-----MEETPS--	CAEDYENLK--IESK	Gas4P
		CYS_BOX			
416	AISADGSKGEYGVASF		CSDKDRLSYVLNQY	YLDQDKSSACDFKGSAS	Phr1P
406	GINANGTIGEYGAYSP		CHSKDKLSFVMNLY	YEQNKESKSACDFGGS	Phr2P
386	-TGVDAKRGEYVTL--		-SNEDLTTTYK-FFQSE	GEK---LAINRIETM	Phr3P
378	-KGVKVEKGYIDI--		-HEDQLSTNVT-ILD	QHGDRL--WNGPKK	Gas4P
		SER_BOX			
482	TGKASSSGSSKSGSSS		ASASGSSSSSTSSGSSS	-SSGVKATQQMSMVK	Phr1P
477	TVSGTVRTDT		TSQSTSDSGSSSSSS	SSSSSSSSGSKSAAS	Phr2P
430	DEKALENRET		PQEPAESAEPAEPT	EPAEPPSPPTP-----	Phr3P
422	TLADLEG---		-EEQEDADEDKDDL	KRKHNSASISGP-----	Gas4P

Nr.	Sequenz-Nr.	GB-Name	Protein	High Score	Organismus
1	Q08271	YON 2	Gas4p	777	<i>S. cerevisiae</i>
2	Q08193	YOD0	Gas5p	168	<i>S. cerevisiae</i>
3	P56092	EPD1	Epd1p	298	<i>C. maltosa</i>
4	Q03655	YM64	Gas3p	311	<i>S. cerevisiae</i>
5	O13692	YDYD	Spo1p	152	<i>Schizos. pombe</i>
6	Q06135	YL43	Gas2p	281	<i>S. cerevisiae</i>
7	P43076	PHR1	Phr1p	259	<i>C. albicans</i>
8	P22146	GAS1	Gas1p	267	<i>S. cerevisiae</i>
9	O13318	PHR2	Phr2p	290	<i>C. albicans</i>
10	P48038	ACRO		78	Kaninchen

Tab. 3/1: BlastP-Ergebnis (6.7.99), GB-Name: Genname/Protein laut Genbank.

		Ähnlichkeit (Similarity)					
		<i>PHR1</i>	<i>PHR2</i>	<i>PHR3</i>	<i>GAS1</i>	<i>GAS4</i>	<i>EPD1</i>
Unterschied (Divergence)	<i>PHR1</i>		51.0	26.6	48.6	37.5	50.5
	<i>PHR2</i>	37.4		25.8	55.3	34.4	77.1
	<i>PHR3</i>	63.2	60.8		25.1	43.5	26.7
	<i>GAS1</i>	40.1	35.3	62.4		31.3	54.2
	<i>GAS4</i>	62.9	60.1	40.9	62.2		35.9
	<i>EPD1</i>	36.9	19.7	61.6	36.9	59.0	

Tab. 3/2: Alignment der Nukleinsäuresequenzen mit der Clustal-Methode.

3.4. Expressionsanalysen

Als erster Schritt der Funktionsanalyse sollte im folgenden die Expression von *PHR3* untersucht werden. Da *PHR1* und *PHR2* in Abhängigkeit vom pH des Mediums transkribiert werden, wurde zunächst die Höhe der *PHR3*-spezifischen RNA bei unterschiedlichen pH-Werten in Relation zu den bekannten Homologen von *Candida albicans* bestimmt (Abb. 3/4). Hier zeigt sich im deutlichen Unterschied zum kräftigen Signal von *PHR2* bei pH 4 bis pH 6 und von *PHR1* bei den pH-Werten 6-8 für *PHR3* ein gleichmäßiges Signal im alkalischen und sauren Milieu. Dieses ist jedoch deutlich schwächer als von *PHR1* und *PHR2* und nach identischem Vorgehen mit radioaktiver Markierung der genspezifischen Sonden und stringenter Hybridisierung wiederholt erst nach einer Exposition des Röntgenfilms von mindestens 24 Stunden als schwache Bande zu detektieren. Im Gegensatz hierzu findet sich für die anderen PHR-Gene nach etwa sechs bis zwölf Stunden ein ausreichendes Signal.

Um eine Kreuzhybridisierung der Transkripte von *PHR1* und *PHR2* auszuschließen, wurden Plasmide mit der DNA beider Gene mit der identischen *PHR3*-Sonde EM3/4 hybridisiert. Hier konnte trotz der deutlich höheren Kopienzahl für *PHR3* keine Bande detektiert werden. Nach Hybridisierung der gleichen Plasmide mit der genspezifischen Sonde, als positive Kontrolle, findet sich ein kräftiges Signal. Zur Klärung dieser Frage sollten zusätzlich die RNA jener Stämme geprüft werden, in denen eines oder beide der bekannten PHR-Gene deletiert wurde. Gleichzeitig wurde hierbei untersucht, ob und in welchem Rahmen die Transkriptionsrate von *PHR3* abhängig ist von der für *PHR1* bzw. *PHR2*. Es wurde daher die Expression von *PHR3* bei den singulären Deletionsmutanten von *PHR1* (CAS8) und *PHR2* (CFM4) sowie bei der Doppeldeletionsmutanten CAP2 ($\Delta phr1, \Delta phr2$) jeweils getrennt für die pH-Leiter bestimmt. Bei allen der beschriebenen Knock-out-Stämme sind unveränderte, gleichmäßige Banden für alle pH-Werte nachzuweisen, eine Änderung der *PHR3*-spezifischen Signalstärke kann nicht festgestellt werden.

Da eine Vielzahl unterschiedlichster Umweltsignale sich auf intrazelluläre Signalkaskaden und die Proteinbiosynthese auswirken, wurden als nächstes

unterschiedliche Temperaturen und Medien geprüft. In Fünf-Grad-Schritten wurde der *Candida albicans* Wildtypstamm SC5314 bei 15° bis 40°C in M199 für 60min inkubiert. Bei den differenten Medien erfolgte die Induktion bei der humanen Körpertemperatur von 37°C über denselben Zeitraum. Verwendet wurden wie in den Vorversuchen M199 sowie die in der Mykologie bekannten und zur Anzucht eines breiten Spektrums von Pilzen bewährten Medien SAB, YNB und YPD. Zusätzlich wurde das Sporulationsmedium und das Spider-Medium eingesetzt. Die beiden letzteren rufen mit der Ausbildung von Sporen bzw. von Keimschläuchen eine Veränderung der Zellform hervor und sind für diese Induktion einer Phasenverschiebung bekannt (Abb. 3/5). Die Rate der *PHR3*-RNA an der gesamten RNA bleibt unter allen aufgeführten Untersuchungsbedingungen ohne signifikante Variation.

3.5. Kontrollierte Genexpression von *PHR3*

3.5.1. *PHR3* unter dem konstitutiven Promotor EF1 α in CWH1 und CWH2

Um die Funktion von *PHR3* zu bestimmen, sollte im folgenden das Gen in einer Stärke exprimiert werden, wie sie sich bei *PHR1* oder *PHR2* findet oder bei diesen als ausreichend belegt ist. Für *PHR2* konnte bereits gezeigt werden, dass es konstitutiv unter dem Promotor des Gens *TEF2* exprimiert auch bei alkalischem pH die Funktion eines fehlenden *PHR1*-Proteins ersetzen kann (Mühlschlegel et Fonzi, 1997). Das Plasmid pFM4 basiert auf dem Vektor pBSK(+) und enthält mit EF1 α , den Promotor von *TEF2*. In die *Xba*I-Schnittstelle wurde ein 3,85kb großes Fragment mit dem kompletten Gen *URA3* ligiert. Dieses dient als unabhängiger Selektionsmarker bei den folgenden Klonierungen. Die korrekte genomische Integration des Plasmids am *URA3*-Genort ohne Auswirkung auf den Phänotyp einer *PHR2*-Deletionsmutanten (negative Kontrolle) konnte bereits belegt werden (Mühlschlegel et Fonzi, 1997).

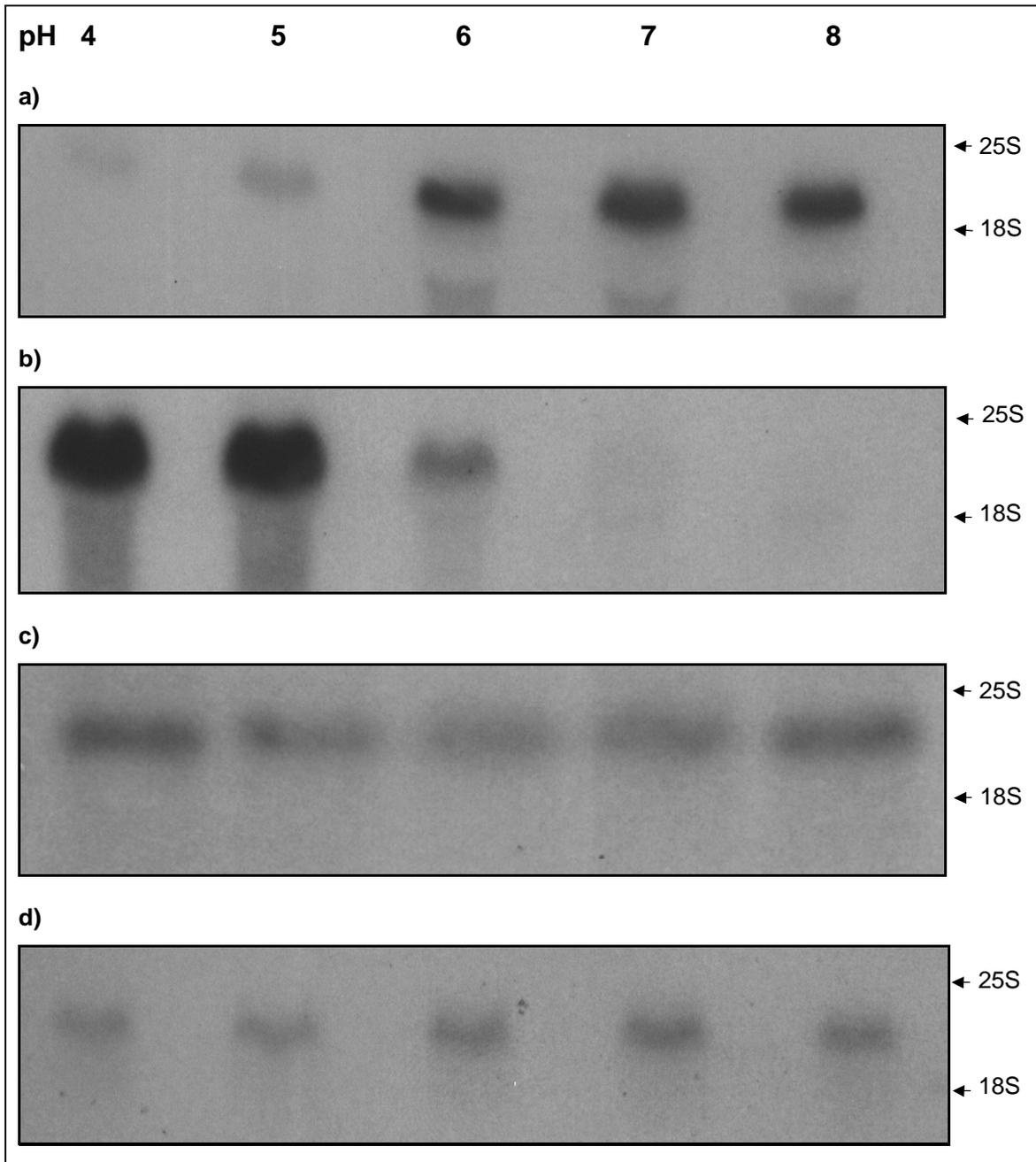
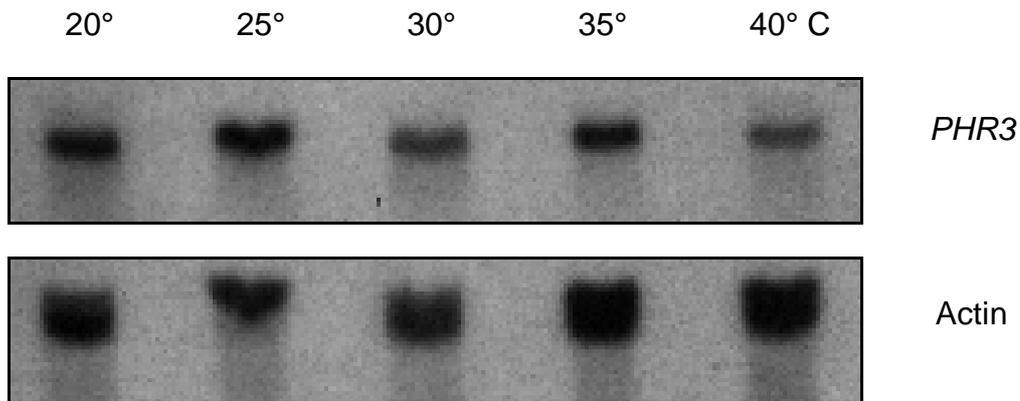


Abb. 3/4: Expressionsanalyse von *PHR1* [a], *PHR2* [b] und *PHR3* [c, d]; Northern-Blots der Stämme SC5314 (Wildtyp) [in a, b, c] und von CAS8 [$\Delta phr2$] [in d]. Northern-Blots der Stämme CFM2 und CAP2 zeigen für *PHR3* ein zu [d] identisches Signalmuster (Daten nicht gezeigt). Die zugrunde liegenden pH-Werte der Medien sind oben angezeigt. Identische RNA-Mengen wurden durch Vergleich der ribosomalen Banden in der Gel-Elektrophorese bestimmt, die Laufhöhe dieser ribosomalen Banden ist jeweils rechts markiert.

a) Temperaturskala:



b) Medienskala:

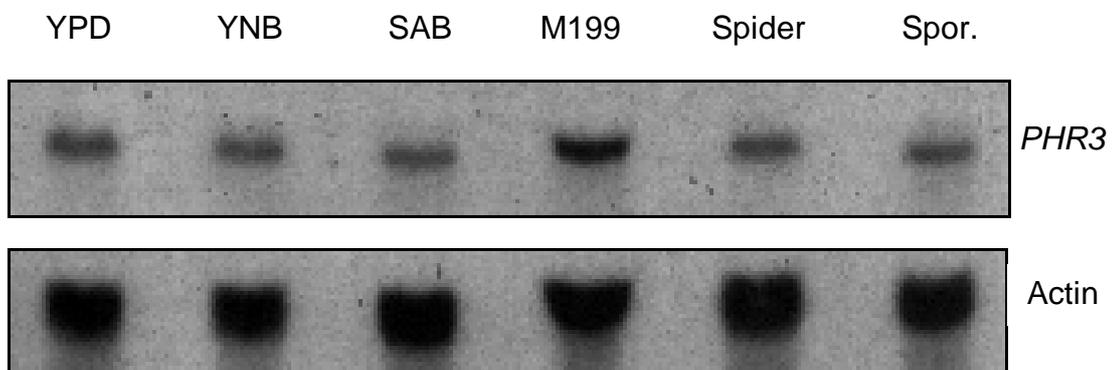


Abb. 3/5: Expression von *PHR3* bei unterschiedlichen Temperaturen [a] und in verschiedenen Medien [b]. Bei allen abgebildeten Induktionsbedingungen findet sich keine signifikante Differenz der Banden. Um gleiche RNA-Mengen vorauszusetzen, wurden die ribosomalen Banden der Gel-Elektrophorese verglichen, abschließend wurde zur Kontrolle der Blot ein zweites Mal mit dem konstitutiv transkribierten Gen Act3 (Actin) hybridisiert. Untersucht wurde der Wildtyp-Stamm SC5314. Medien: YPD = Yeast-Pepton-Dextrose, YNB = Yeast-Nitrogen-Base, SAB = Sabaraud-Medium, M199, Spider = Spidermedium, Spor. = Sporulationsmedium. Bei letzterem erfolgte eine einstündige Vorinkubation im Präsporulationsmedium.

Zur Konstruktion der Plasmide pWH1 und pWH2 wurde nun das Plasmid pFM4 zunächst mit *Pst*I direkt 3' nach dem Promotor EF1 α linearisiert. Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase wurden stumpfe Fragmentenden erzeugt und dann mit einem zweiten Restriktionsverdau das vom Promotorende entferntere Plasmidende an der *Nhe*I-Schnittstelle geschnitten und hiermit eine kohäsive Schnittstelle durch eine Spitze für eine direktionale Klonierung ersetzt. Als Intron wurde das amplifizierte und in *E. coli* klonierte *PHR3*-Fragment, mit 295bp carboxy-terminal aus pEco4/1 zur Erzielung von pWH1 und mit zusätzlichen 148 5'-terminal gelegenen Basen aus pEco2/1 zur Erstellung von pWH2, mit den in der PCR angehängten Restriktionsstellen *Eco*RV (stumpfe Schnittstelle) und *Nhe*I ausgeschnitten, aufgereinigt und in das vorbereitete, linearisierte Plasmid pFM4 ligiert und erneut in *E. coli* kloniert. Die korrekte Ligation wurde mit Hilfe der Sequenzierung mit EF1 α - und *PHR3*-spezifischen Primern sowie einer PCR bestätigt. Mit einem Oligonukleotid komplementär zur Leserichtung des Promotors (FM3) und einem zweiten (WH5) entgegengesetzt zur Leserichtung von *PHR3* konnte durch die erfolgreiche Amplifikation die korrekte Lage des offenen Leserasters von *PHR3* direkt vor dem EF1 α nachgewiesen werden. In der Agarosegel-Elektrophorese divergieren die Produkte von pWH2 und pWH1, entsprechend der unterschiedlichen Ausgangsgrößen der Introns um etwa 0,15kb.

Die Plasmide pWH1 und pWH2 wurden an der singulären *Hpa*I-Schnittstelle, welche im *Xba*I-Genabschnitt von *URA3* außerhalb des offenen Leserasters des Gens lokalisiert ist, linearisiert und bei alkalischem pH in die *PHR2*-Deletionsmutante CFM4 transformiert. Transformanten wurden auf Komplementation der Uridin-Auxotrophie auf YNB-Platten ohne Uridin bei pH 7 selektioniert und so eine von den *PHR*-Genen unabhängige Transformation gewährleistet. 50 Uridin-prototrophe Stämme aus jeweils zwei unabhängigen Transformationen wurden zunächst auf identischen Platten vereinzelt. Anschließend wurden diese auf YNB-Platten mit einem pH von 4 erneut ausgestrichen. Hier wurde ihr Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp studiert. Im Gegensatz zu SC5314 zeigte sich für die mit pWH1 oder pWH2 transformierten Stämme kein Wachstum bei saurem pH.

Die genomische DNA von jeweils 10 Stämmen der Transformation mit pWH1 und pWH2 und von CFM4 wurde präpariert und mit dem Enzym *NheI* bzw. *EcoRI* verdaut. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Southern-Blots auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiven *PHR3*-Sonde EM3/4 hybridisiert. Das deutliche positive Signal für eine zusätzlich in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetragene Probe des Plasmids pEco2/1 bestätigt die *PHR3*-Spezifität der P³²-Hybridisierung. Zusätzlich zu der singulären Signalbande von *PHR3* in CFM4 fand sich bei sechs der mit pWH1 und bei sieben der mit pWH2 transformierten Stämme eine einzelne zusätzliche Bande. Je ein zufällig ausgewählter Stamm wurde CWH1 bzw. CWH2 benannt.

Von jeweils vier Stämmen beider Transformationen wurde nach Induktion über eine Stunde in YPD bei pH 7 die RNA präpariert. Nach Auftrennung etwa gleicher Mengen RNA wurde diese mit dem Northern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen, fixiert und anschließend ebenso mit der Sonde EM3/4 hybridisiert. Bereits nach vier Stunden konnte ein deutliches Signal detektiert werden. Dieses ist bei allen Stämmen ohne signifikanten Unterschied und entspricht in der Laufhöhe und somit der Größe der ursprünglichen nativen *PHR3*-RNA-Bande. Zusätzlich findet sich je eine schwächere Bande unterhalb der 18S ribosomalen Bande.

3.5.2. *PHR3* unter dem pH-abhängigen Promotor von *PHR2* in CWH5

Um aus potentiellen Interaktionen des Promotors EF1 α mit dem Gen *PHR3* resultierende Störungen der Überexpression von *PHR3* in CWH1 und CWH2 ausschließen zu können, sollte *PHR3* zusätzlich zum nativen Gen im folgenden unter dem Promotor von *PHR2* exprimiert werden.

Hierfür wurde das Plasmid pSM1 verwendet. Dieses basiert auf dem Plasmid pBSK(+) und enthält neben dem von pFM4 bekannten 3,85kb *URA3*-Fragment ein 1,15kb großes Fragment des Promotors von *PHR2*, welches unmittelbar vor dem Startkodon des Gens endet.

Das Plasmid pSM1 wurde mit dem Enzym *PstI* unmittelbar am Ende des Promotors linearisiert. Die resultierenden kohäsiven Enden wurden mit der T4-

DNA-Polymerase in stumpfe Enden überführt und das 1,8kb große *HindIII/EcoRV*-Fragment von *PHR3* aus Pfu-Eco4/1 in den Vektor ligiert. Das Plasmid wurde in *E. coli* kloniert. Von 20 präparierten Plasmiden zeigten vier nach Linearisierung mit *HpaI* die korrekte Größe, welche zum Ausgangsplasmid um 1,85kb zugenommen hatte. Durch PCR mit spezifischen Primern für den *PHR2*-Promotor (PHR2-1) und für *PHR3* (WH5) in bzw. entgegen der Leserichtung des Gens konnte für drei Plasmide die korrekte directionale Anordnung des *PHR3*-Gens in der ursprünglichen Richtung und Position des Gens *PHR2* nachgewiesen werden. Ein Plasmid wurde zufällig ausgewählt und pWH5 benannt.

Entsprechend dem Vorgehen bei CWH1 und CWH2 wurde zur Generierung von CWH5 das Plasmid pWH5 bei alkalischem pH in den Stamm CFM4 transformiert (Schema 3/1). Transformanten wurden auf Komplementation der Uridin-Auxotrophie selektioniert und die resultierenden Klone replikaplatziert. 20 der so erhaltenen Klone wurden dann auf YNB-Platten pH 4 ausgestrichen. Ebenso wie CFM4, CWH1 und CWH2 und im Unterschied zu den parallel ausgestrichenen Stämmen SC5314 und CAS8 zeigten die Transformanten kein Wachstum innerhalb von zwei Tagen Inkubation bei 25 °C.

Von neun Klonen wurde die genomische DNA präpariert und diese sukzessive mit *BglII* und *NotI* verdaut. Nach dem Southern-Blot und der Fixierung wurde die auf eine Nylonmembran transferierte DNA mit der *PHR3*-Sonde EM3/4 radioaktiv hybridisiert. Hier zeigte sich für den Ausgangsstamm CFM4 eine einzelne Signalbande über 10kb; keine der beiden Schnittstellen ist im

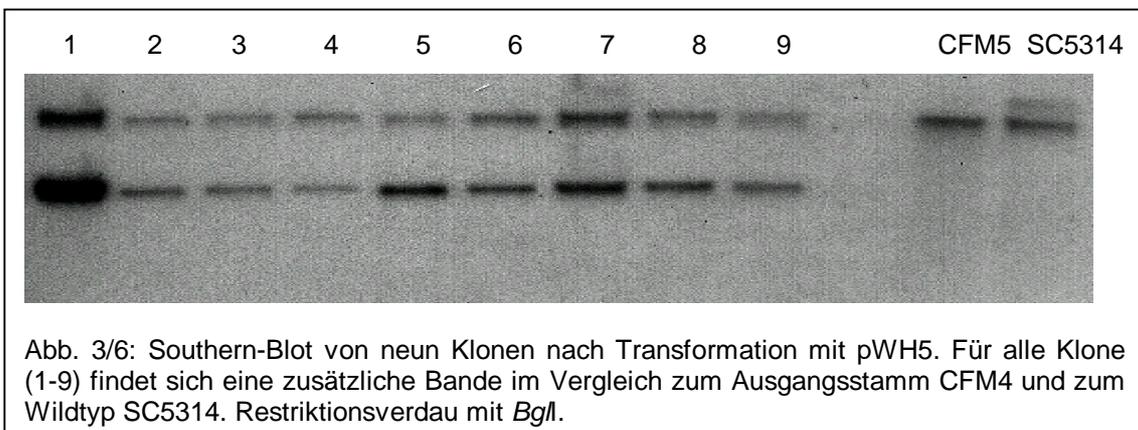
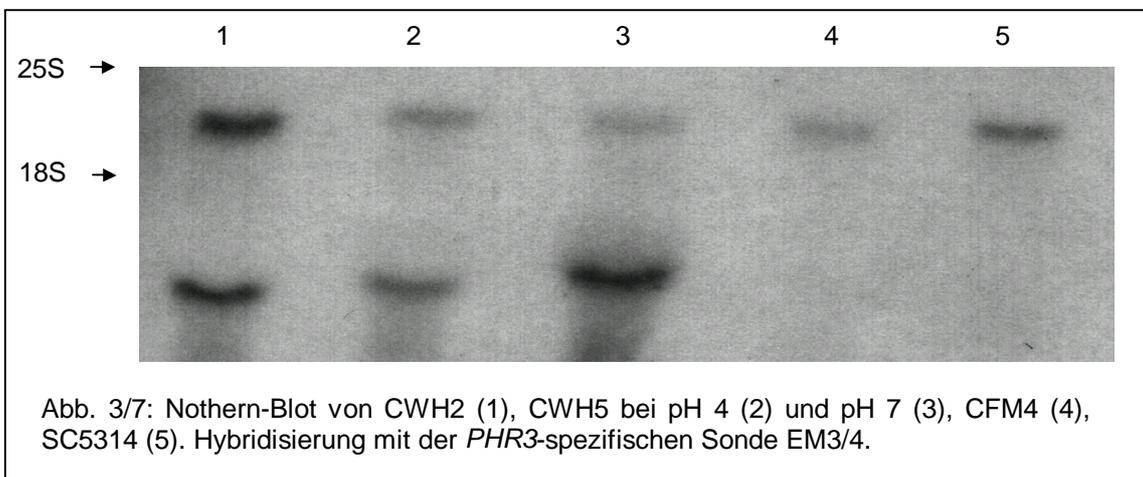


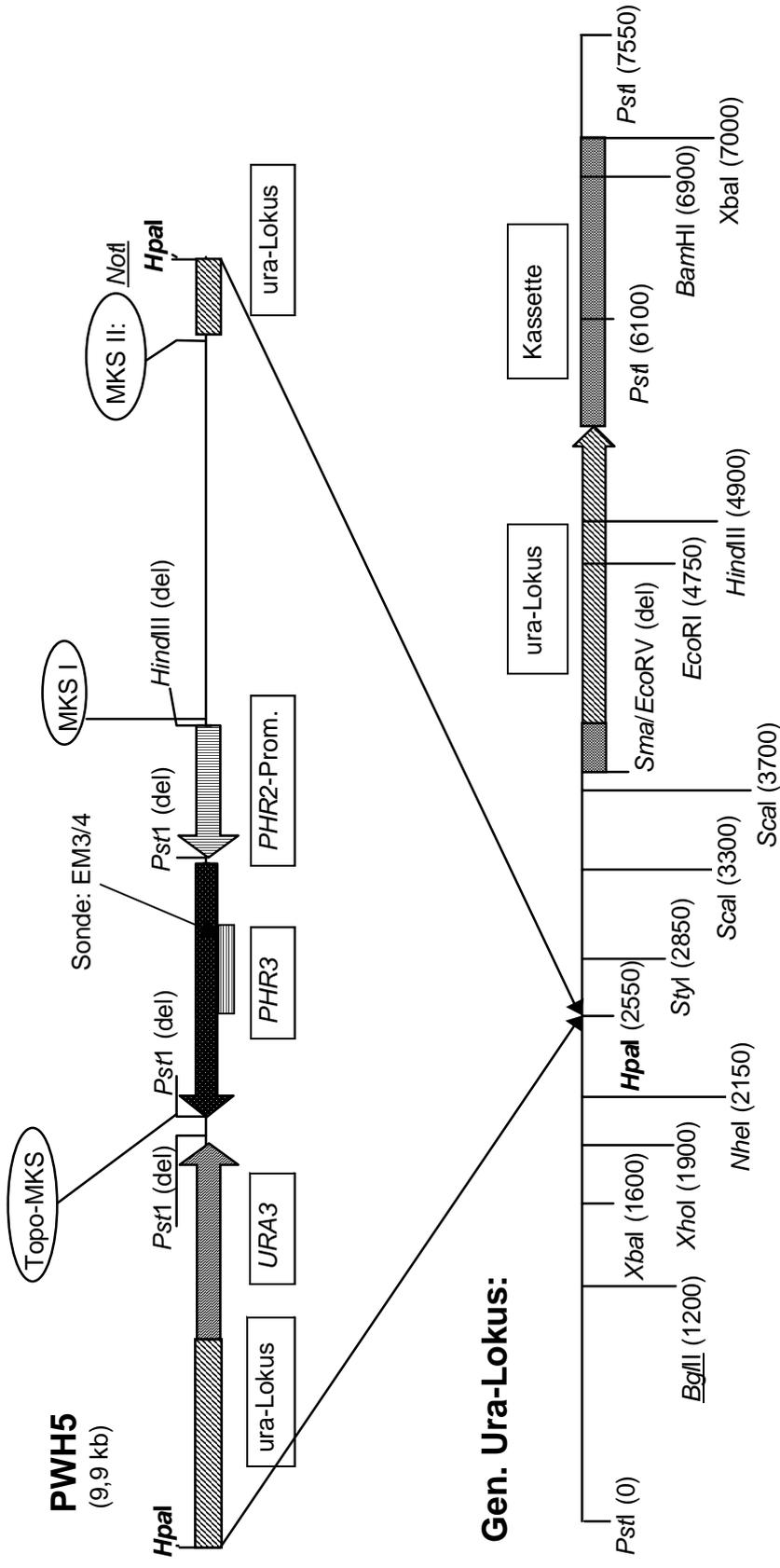
Abb. 3/6: Southern-Blot von neun Klonen nach Transformation mit pWH5. Für alle Klone (1-9) findet sich eine zusätzliche Bande im Vergleich zum Ausgangsstamm CFM4 und zum Wildtyp SC5314. Restriktionsverdau mit *BglI*.

bekanntem Genabschnitt nachweisbar. Für alle transformierten Klone findet sich eine zweite Bande, entsprechend der berechneten Höhe, bei 9kb (Abb. 3/6). Ein Klon wurde zufällig als CWH5 ausgewählt.

Es wurde die RNA von CWH5, CWH2, dem gemeinsamen Ausgangsstamm CFM4 und vom Wildtyp SC5314 präpariert. Hierzu wurden die Stämme in einer Keimdichte von 2×10^5 in YPD pH 4,0 für eine Stunde inkubiert. Etwa gleiche Mengen RNA wurden nach photometrischer RNA-Mengenbestimmung und Vergleich der ribosomalen Banden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem Northern-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde mit einer radioaktiven EM3/4 Sonde hybridisiert. Bei allen Proben findet sich ein etwa gleich kräftiges Signal zwischen den ribosomalen Banden, welches der nativ exprimierten *PHR3*-RNA entspricht. Zusätzlich kann bei den Stämmen CWH2 und CWH5, in deren Genom eine weitere Kopie des *PHR3*-Gens unter einem nicht nativen Promotor integriert wurde, eine zweite deutliche Signalbande direkt unter der 18S ribosomalen Bande detektiert werden (Abb. 3/7).



PWH5 Transformation in CWH5



Schema 3/1: Aufbau des linearisierten Plasmids PWH5 und Darstellung des Genorts in CFM4 zur genomischen Integration von PHR3 unter dem Promotor von PHR2 (PHR2-Prom.) in den nicht kodierenden zu URA3 benachbarten gen. DNA-Abschnitt. Die integrierten Gene und Genabschnitte sind eingerahmt, Kassette, mit welcher das native URA3-Gen in CFM4 deletiert ist, EM3/4-Sonde: Sonde zur radioaktiven Hybridisierung. Die für den Southern-Blot verwendeten Enzyme NotI und BglII sind unterstrichen, das Enzym HpaI für die Linearisierung und die Integrationsstelle sind fett gedruckt.

3.5.3. Überexpression von *PHR3* unter dem nativen Promotor in CWH9

Da bei den eingangs beschriebenen Transformanten CWH1, CWH2 und CWH5 zusätzlich zu dem nativen RNA-Signal von *PHR3* ein weiteres von diesen divergierendes nachzuweisen ist, sollte im folgenden Versuch das *PHR3*-Gen in einem wesentlich größeren Fragment mit dem eigenen nativen Promotor in mehreren Kopien in den Stamm CFM4 integriert werden.

Als Ausgangsplasmid wurde pSM2 verwendet, bei welchem das 3,85kb Fragment mit dem *URA3*-Gen in die *Sma*I-Schnittstelle von pBSK(+) eingefügt ist. Mit einem Doppelverdau der Enzyme *Spe*I und *Not*I, welche auf beiden Seiten des Inserts den multiplen Klonierungsbereich von pCR2.1 schneiden, wurde ein 2,9kb großes Fragment mit dem kompletten offenen Leseraster von *PHR3* inklusive Intron und zusätzlich 877bp 5'-terminal und 473bp 3'-terminal des angrenzenden Genbereichs aus dem Plasmid p3g-34/9 ausgeschnitten. Anschließend wurde dieses Insert mit dem durch einen identischen Verdau linearisierten Plasmid pSM2 ligiert und in *E. coli* kloniert. Das resultierende Plasmid pWH9 wurde durch Größenbestimmung nach Linearisierung mit *Hpa*I und Nachweis von *PHR3*-DNA durch PCR mit *PHR3*-spezifischen Primern verifiziert.

Entsprechend den vorangegangenen Transformationen wurde das Plasmid mit *Hpa*I linearisiert und bei alkalischem pH in das Genom von CFM4 integriert. Nach Selektion durch Komplementation der Uridin-Auxotrophie wurden 20 der resultierenden Klone auf YNB-Platten mit einem pH von 4 ausgestrichen. Erneut zeigte sich identisch zu CFM4 und im Gegensatz zum Wildtyp kein Wachstum innerhalb von 48 Stunden.

Von 15 Klonen wurde die DNA präpariert, mit *Bgl*II und *Not*I verdaut und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Für drei der Klone konnte in der folgenden Hybridisierung eine im Vergleich zu CFM4 zusätzliche Bande und für einen weiteren konnten zwei zusätzliche Banden nachgewiesen werden. Von ersteren wurde einer CWH9 benannt. Nach Präparation der RNA kann in der Hybridisierung für keinen dieser vier Klone ein zum Elternstamm CFM4 signifikant höheres Transkript nachgewiesen werden.

3.6. Expression von *PHR3* in *Saccharomyces cerevisiae*

Aus p3g-34/9 wurde mit den Enzymen *EcoRV* (stumpfes Ende) und *KpnI* (kohäsives Ende) das 2763bp große Genfragment von *Candida albicans* mit *PHR3* aus der Klonierungsstelle des Vektors pCR2.1. ausgeschnitten und in den mit *SmaI* (stumpfes, zu *EcoRV* kompatibles Ende) und *KpnI* linearisierten Vektor pFL45S ligiert. Letzterer ist ein Multy-Copy-Vector, mit welchem in einer einzelnen Transformation mehrere Kopien des Plasmids (pWH8) extrachromosomal in *Saccharomyces cerevisiae* eingebracht werden können. Nach Lithium-Acetat-Transformation von pWH8 in den *GAS1*-deletierten Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* Wb2d wurden die Klone unabhängig von den *PHR/GAS*-Genen auf Komplementation der Tryptophan-Auxotrophie selektioniert. Die erfolgreiche Integration des Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* wurde durch Nachweis eines PCR-Produktes nach Amplifikation mit *PHR3*-spezifischen Primern, bei fehlendem Produkt bei Wb2d, bestätigt. Ein Klon wurde zufällig ausgewählt und SWH3 benannt. Parallel zum Ansatz mit dem *PHR3*-tragenden Plasmid erfolgte als Kontrolle die SWH4 ergebende Transformation des nackten Vektors pFL45S in Wb2d.

Jeweils zehn resultierende Klone beider Transformationen wurden nach Inkubation in YPD mikroskopisch untersucht. Der bekannte Phänotyp der *GAS1*-Deletionsmutanten mit ballonierten, unregelmäßig geformten Zellen findet sich ohne wesentlichen Unterschied bei allen weiteren untersuchten Stämmen wieder. Somit konnte *PHR3* im Genabschnitt von p3g-34/9 nicht das fehlende *GAS1*-Gen ersetzen.

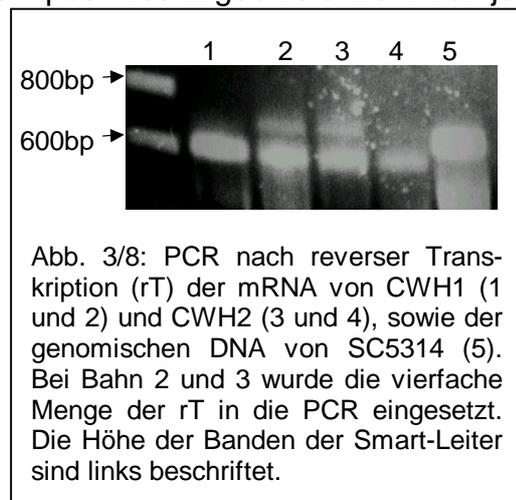
3.7. Bestimmung der Pre-mRNA und mRNA von *PHR3*

Um das in der Genanalyse ermittelte, für das Protein Phr3p kodierende vollständige Leseraster und die resultierende mRNA zu verifizieren und um den in der Sequenzanalyse vermuteten Startpunkt sowie die korrekte Prozessierung der Pre-mRNA mit Spleißen des Introns *in vitro* zu bestätigen, erfolgte die Bestimmung des 5'-terminalen Endes der zugehörigen mRNA. In einem weiteren Versuch sollte das 3'-terminale Gen-Ende und das Anhängen eines Poly-

adenosin-Anhanges als zweiter relevanter Bestandteil der posttranskriptionellen Prozessierung nachgewiesen werden (Schema 3/2 und 3/3).

Ein wesentliches Problem einer reversen Transkription und folgender PCR (rT-PCR) ist kontaminierende DNA, welche ein falsch negatives Ergebnis, im Sinne einer nicht geschnittenen DNA mit erhaltenem Intron, hervorrufen würde. Zugleich ist eine möglichst große Menge genspezifischer RNA wünschenswert, um nach Verlusten durch die wiederholten Aufreinigungsschritte noch eine ausreichende Kopienzahl für die abschließende PCR zur Verfügung zu haben. Wegen der relativ niedrigen Expressionsrate von *PHR3*, im Vergleich zu *PHR1* und *PHR2*, wurde die RNA der Überexpressionsmutanten CWH1 und CWH2 verwendet. Kontaminierende DNA wurde mit einem DNaseI Verdau entfernt. Anschließend wurde die mRNA als der relevante Bestandteil der RNA mit Hilfe von magnetisch gekoppelten Polythymidin-Ketten (Dynabeads) separiert. Zur Kontrolle der erhaltenen mRNA wurde eine PCR mit den Primern WH1 und WH26 durchgeführt. Für die mRNA konnte erwartungsgemäß kein Produkt amplifiziert werden. Um eine inhibierende Wirkung des Eluationspuffers der mRNA-Selektion ausschließen zu können, wurde zusätzlich zur negativen Kontrolle ohne RNA oder DNA und zur positiven Kontrolle mit genomischer DNA (von CAS8) eine weitere positive Kontrolle durchgeführt, welcher neben der identischen Menge mRNA genomische DNA zugesetzt wurde. Nur für die Amplifikationen mit genomischer DNA (positive Kontrollen) konnte in der Gel-Elektrophorese eine Bande nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2/1). In der Folge wurde der *PHR3*-Anteil der mRNA mit dem *PHR3*-spezifischen Oligonukleotid WH1 revers transkribiert. Der somit erhaltene zur *PHR3*-RNA komplementäre singuläre *PHR3*-DNA-Strang wurde mit den Primern WH1 und WH26 zum Doppelstrang ergänzt und amplifiziert. WH1 liegt 415-398 Basen nach dem Intron, WH26 beginnt mit dem Guanosin des Startkodons und wird durch 90 Basen vom Intron getrennt (Position: 3-22). Hierdurch resultierten PCR-Produkte von einer Größe von fast 600bp. Bei Einsetzen der vierfachen Menge mRNA findet sich zusätzlich ein etwa 50bp größeres Amplifikat. Dieses ist als singuläre Bande auch bei Verwendung von genomischer DNA als Kontrolle nachzuweisen und entspricht dem Sequenzabschnitt mit Intron (Abb. 3/8). Aufgrund der

doppelten Banden ist also von einer im Vergleich zur RNA relativ kleinen Menge konkurrierender Rest-DNA auszugehen. Die kleineren Banden der Gel-Elektrophorese wurden aufgereinigt und kloniert. Zum Nachweis des fehlenden Introns erfolgte eine PCR von jeweils drei präparierten Plasmiden der Transformation mit den Primer WH1 und WH28 (Position: 50-68) bzw. WH1 und WH30 (im Intron gelegen). Mit Ausnahme eines Plasmids, welches in der zweiten PCR eine unspezifische Bande über 1,3kb erbrachte, wurde erwartungsgemäß nur für die erste Kombination ein positives Ergebnis erzielt. Von je einem Plasmid wurde das Insert abschließend sequenziert. Alle resultierenden Sequenzen waren identisch. Im Vergleich mit der genomischen Sequenz fehlen hier die 56 Basen, welche durch die vorbezeichneten Spleiß-Stellen eingegrenzt werden. Das vermutete Intron und das korrekte Spleißen *in vitro* konnten somit bestätigt werden.



Die Transkription eines Gens endet einige Basen nach dem Stopkodon, die Translation hingegen bricht unmittelbar am Stoppsignal ab. Da im Rahmen der posttranskriptionellen Prozessierung dem primären Transkript, der Pre-mRNA, ein Adenosin-Schwanz angehängt wird, kann durch reverse Transkription dieses Anhangs mit dem vorausgehenden Transkript das Transkriptionseende und durch Nachweis des Stopkodons und des Endes eines durchgehenden Leserasters zusätzlich das Translationsende eines Gens bestimmt werden. Die im vorangegangenen Versuch zugrunde liegende mRNA wurde mit identischen Verfahren aufgereinigt und anschließend in der reversen Transkription mit dem nicht genspezifischen Primer WH-1-RT alle exprimierten und adenylierten mRNA-Produkte in die komplementäre DNA (cDNA) überschrieben. Durch die folgende Amplifikation mit dem spezifischen Primer WH4 wurde der 5'-terminale Transkriptionsabschnitt von *PHR3* mit dem Polyadenosinende für die Stämme CWH1 und CWH2 amplifiziert. Nach Aufreinigung, Transformation und Klonierung wurde für beide rTPCR-Produkte in der Sequenzierung der dem Oligo-

nukleotid WH4 folgende Bereich und damit ebenso das in der Sequenzanalyse ermittelte Stopkodon von *PHR3* bestätigt. Die hier nachgewiesenen Transkriptionsendpunkte differierten um 39 – 47bp und lagen für CWH1 39 - 44bp und für CWH2 83 - 86bp hinter dem Stopkodon. Die exakte Position des Poli-A-Schwanzes kann aufgrund von bereits in der nativen genomischen DNA-Sequenz vorhandenen Folge von fünf bzw. drei Adenosinen nicht bestimmt werden. Daten, welche eine unterschiedliche Translation durch diese minimale Transkriptionsdifferenz im nicht kodierenden 3' terminalen Bereich nahelegen, sind nicht bekannt.

Folgende Seiten:

Schema 3/2: rTPCR:

A) Darstellung der genomischen DNA mit: 1. Schematischer Aufteilung in den Einzelstrang, 2. Transkription der mRNA vom Chromosom, 3. Prozessieren der mRNA durch Anhängen eines Poly-Adenosin-Endes und durch Ausschneiden (Spleissen) des Introns und 4. erneutem Anlagern der RNA-Enden.

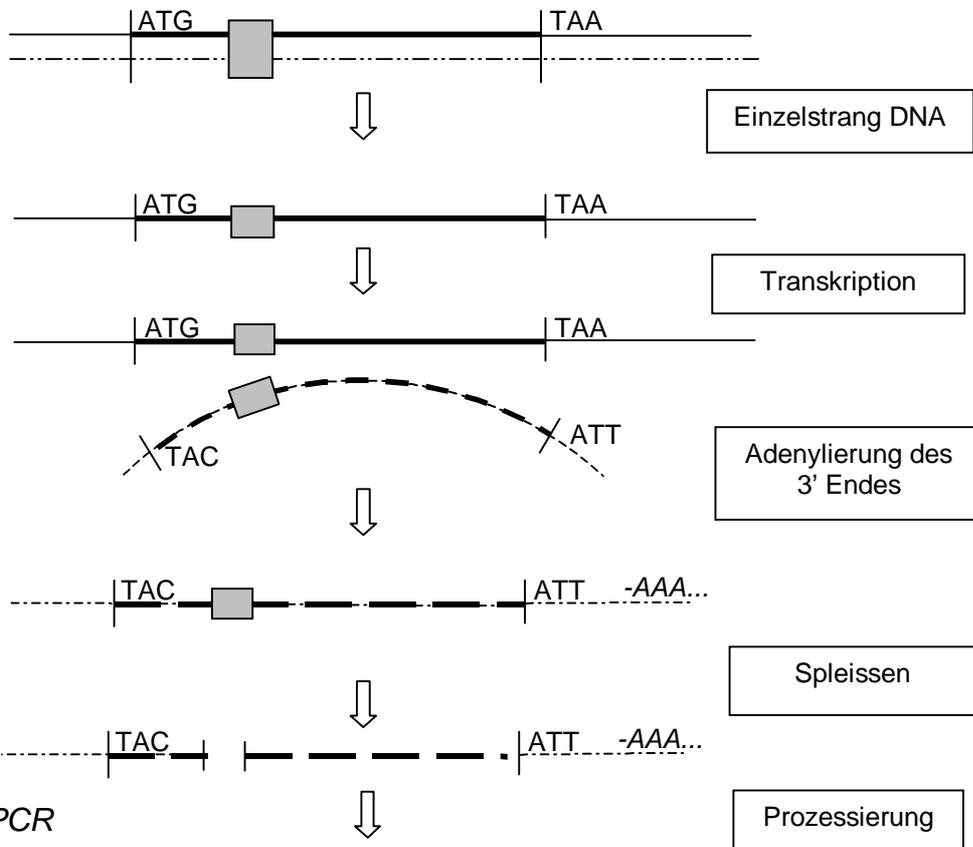
B) reverse Transkription der prozessierten RNA in einen einzelnen DNA-Strang. 1. Mit einem gen-spezifischen Primer (WH3), welcher in der Mitte eines definierten Gens ansetzt und nur von diesem den 5'-terminalen Anteil zurückübersetzt in die komplementäre DNA. 2. Mit Hilfe eines universalen Poly-T-Primers, welcher an die Polyadenilierung jeder prozessierten mRNA anlagert und somit komplette mRNA-Abschnitten revers transkribiert. Die so entstandenen Einzelstränge werden mit Hilfe der PCR vervielfältigt und sind dann in der Gel-Elektrophorese detektierbar und mit Hilfe der Klonierung und Sequenzierung nachzuweisen. Im Kreis ist der Vergleich des initialen chromosomalen Gens mit Intron, mit den rTPCR-Produkten als Nachweis der prozessierten RNA (ohne Intron und mit Poly-A-Ende) dargestellt. Der Startpunkt des offenen Leserasters (ORF) eines Gens ist mit ATG, das Stoppkodon mit TAA markiert. Dicker Balken – 5'-3' Strang des ORF von *PHR3*, doppelt unterbrochene Linie – Gegenstrang (3'-5'), dicke gestrichelte Linie – RNA, grau schraffierte Box - Intron, kleine Pfeile – Primer.)

Schema 3/3: rTPCR (nach Frohman et al. 1988):

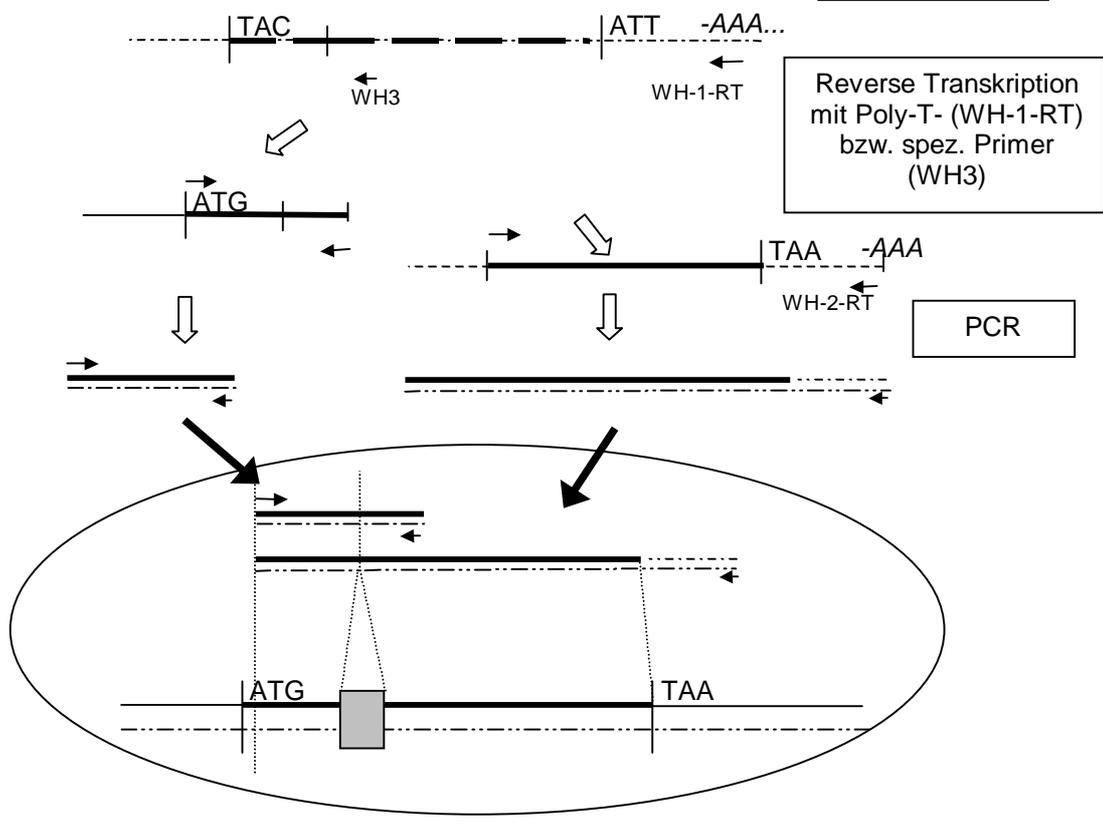
Schematische Darstellung der reversen Transkription und der anschließenden Polymerase Kettenreaktion (PCR), von der prozessierten mRNA ausgehend. Zur Vereinfachung wurde nur die reverse Transkription mit WH-1-RT vollständig dargestellt. Durch Analyse der carboxyterminalen Sequenz des PCR-Produkts kann der Transkriptionsendpunkt verifiziert werden. Primer: *****TTTTTTT entspricht WH-1-RT, ***** entspricht WH-2-RT, (TR) kennzeichnet einen im Vergleich zum Ausgangsstrang trunkierte Nukleotidsequenz.

Schema 3/2

A) Transkription und Prozessierung genomischer DNA:

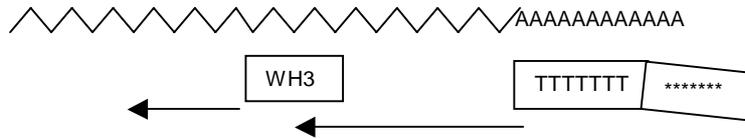


B) rTPCR



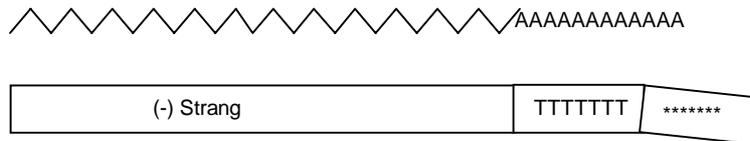
Schema 3/3: rTPCR

mRNA

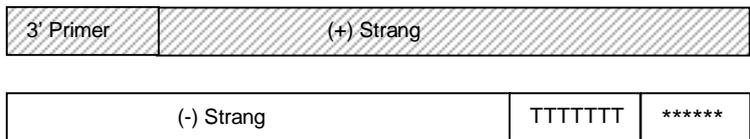


Denaturierung
3'-Primer WH-1-RT (bzw. WH3) Anlagerung
reverse Transkription

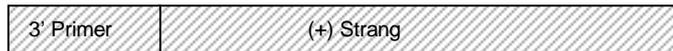
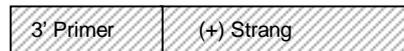
mRNA



Denaturierung
3'-Primer WH-6 (bzw. WH24) Anlagerung
Extension des 2. Stranges



P
C
R



3.8. *PHR3*-Disruption

Die Gendisruption ist ein wesentliches Element der Prüfung der funktionellen Relevanz eines Gens. Um dieses bei dem *PHR3*-Gen durchzuführen, wurde die Methode von Wilson et al. (1999) gewählt. Ausgehend vom Stamm BWP17, welcher drei Auxotrophien für die Aminosäuren Arginin, Histidin und Uridin aufweist, werden Kassetten, welche je eine der Auxotrophien komplementieren, in das offene Leseraster des *PHR3*-Gens integriert. Hierfür wurden die Gene *ARG4* bzw. *URA3* aus den Plasmiden pRS-*ARG4*Δ*SpeI* bzw. pGEM-*URA3* mit den Oligonukleotiden *PHR3*-5' und *PHR3*-3' amplifiziert. Diese Primer tragen je 20 Nukleotide, welche homolog sind zu den das Insert flankierenden Abschnitten der Plasmide pRS-*ARG4*Δ*SpeI*, pGEM-*HIS1* und pGEM-*URA3*. Daran angefügt und somit dem resultierenden PCR-Produkt angehängt finden sich je 60 Nukleinsäuren, welche den Positionen von 140 bis 200 im Gen von *PHR3* für *PHR3*-5', inklusive 24 Nukleinsäuren des 3' Bereichs des Introns, und den Positionen 883 bis 942 für *PHR3*-3' entsprechen. Die resultierenden Kassetten haben eine Größe von 2,1kb für die *ARG4*-, 2,6kb für die *HIS1*- und 1,6 für die *URA3*-Kassette. Nach Amplifikation und Aufreinigung der so erzeugten Knock-out-Kassetten in der Gel-Extraktion wurden sie in den Stamm BWP17 transformiert. Hierbei lagern sich die homologen Abschnitte von *PHR3* aneinander und werden ausgetauscht. Ein zentraler Bereich von 683bp Länge von *PHR3* wird somit entfernt und durch die Gene *ARG4* bzw. *URA3* ersetzt. Zur Kontrolle der Transformation wurden neben Southern- und Northern-Blot zunächst Polymerase Kettenreaktionen der resultierenden Klone durchgeführt. Hierbei wurde ein aminoterminal der Knock-out-Kassette gelegener, *PHR3*-spezifischer Primer (WH26) mit einem zweiten aus dem Disruptionsbereich von *PHR3* (WH3) bzw. einem carboxyterminal der Knock-out-Kassette (WH9) gelegenen Primer kombiniert. Während für die erste Paarung mindestens ein natives Allel erforderlich ist, divergieren die Produkte für WH26/WH9 bei Amplifikation des nativen und eines disruptierten Allels deutlich in der Größe. Für die dritte PCR mit dem Primern V5'-Vect, welcher zu den Kassetten homolog ist, und WH9 kann nur bei erfolgreicher Transformation ein Produkt erzielt werden. Dieses ist in der Größe abhängig von der jeweiligen Kassette (vgl. Schema 3/4).

Zur Erstellung von CWH3 wurde in der ersten Runde der Disruption eine *URA3*-Kassette mit der Lithiumacetat-Methode transformiert und auf YNB mit Arginin und Histidin, aber ohne Uridin, ausgestrichen. Es resultierten 13 Klone, welche entgegen dem Elternstamm BWP17 prototroph für Uridin sind. In den folgenden PCR's wurde für nur einen die Disruption bestätigt. Dieser Stamm diente als Ausgang für die zweite Runde der Disruption. In drei Versuchsansätzen konnten nach Transformation der *ARG4*-Kassette neun Klone erzielt werden, welche auch nach replikaplattieren auf YNB-Histidin-Platten für Arginin prototroph waren. Nach Präparation der DNA bestätigte die PCR mit den drei Primerkombinationen für zwei Klone (CWH4-2 und CWH4-8) die erfolgreiche Doppeldisruption beider Allele von *PHR3*, ein Stamm (CWH4-2) wurde in CWH4 benannt (Abb. 3/9). Die DNA von BWP17, CWH3 und CWH4 wurde mit *SspI* verdaut und nach Southern-Blot mit der Sonde WH13/WH24, einem 209bp großen Fragment 5' vom Disruptionsort, hybridisiert. Während bei BWP17 sich ein einzelnes Signal bei etwa 2,1kb findet, kann bei CWH3 eine zusätzliche Bande bei 1,8kb, dem ersten disruptierten Allel entsprechend, nachgewiesen werden. Bei beiden *PHR3* komplett disruptierten Klonen (CWH4-2 und CWH4-8) fehlt die native 2,1kb Bande zugunsten der 1,8kb und einer 2,6kb Bande. Letztere entspricht in der Größe dem verbliebenen Anteil von *PHR3* und der Arginin Knock-out-Kassette. Von den aufgeführten Stämmen und von SC5314 wurde RNA nach Induktion in YPD präpariert. Nach Hybridisierung des Northern-Blots kann auch nach langer Exposition über fünf Tage nur ein deutliches Signal bei den Stämmen BWP17 und SC5314 sowie bereits um etwa 50% reduziert bei CWH3, nicht jedoch bei CWH4-2 und CWH4-8 detektiert werden (Abb. 3/10). Ein Klon (CWH4-6) der Transformation, welcher neben der Uridin- die Arginin- Prototrophie erworben hat, für den jedoch in allen folgenden Untersuchungen ein unverändertes zweites *PHR3*-Allel belegt werden konnte, wurde für folgende Vergleichsuntersuchungen verwendet.

Schema 3/4:

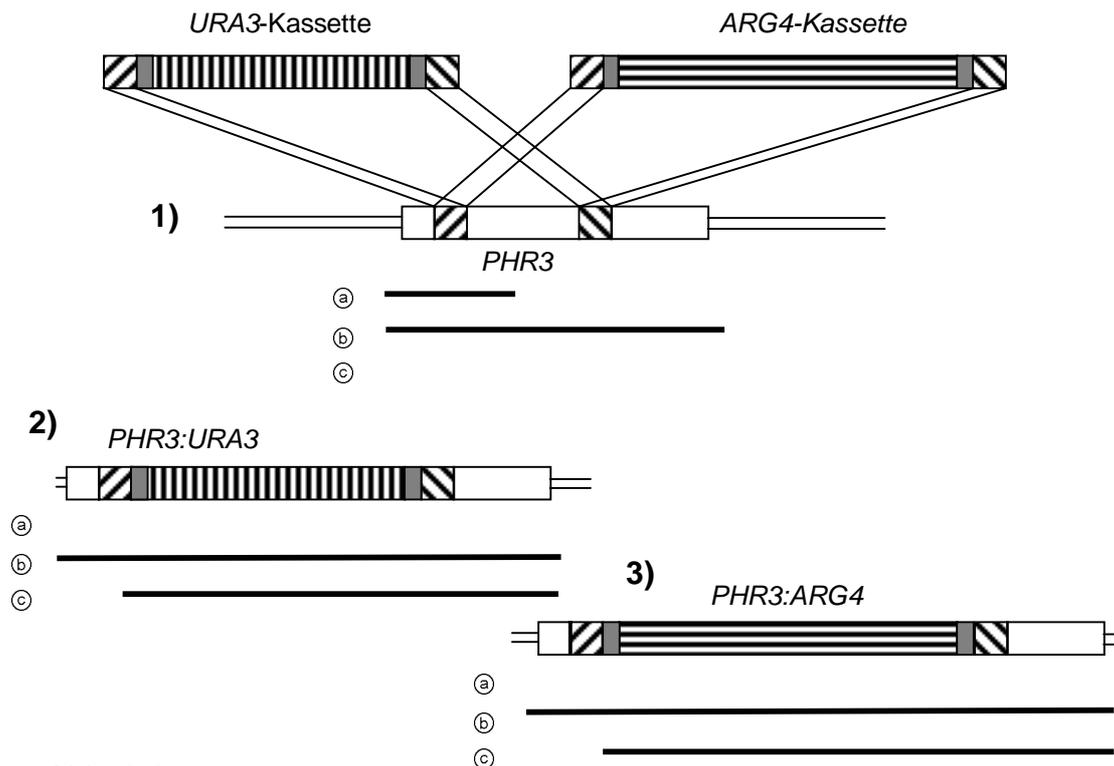
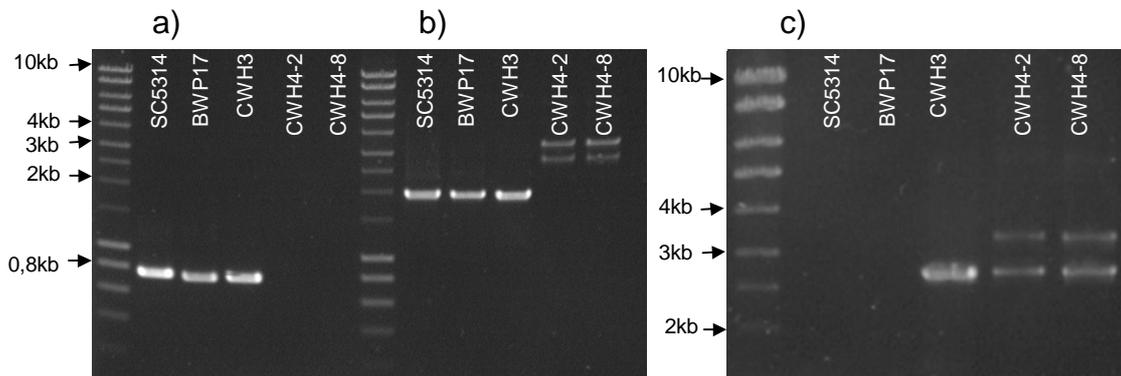


Abb. 3/9:



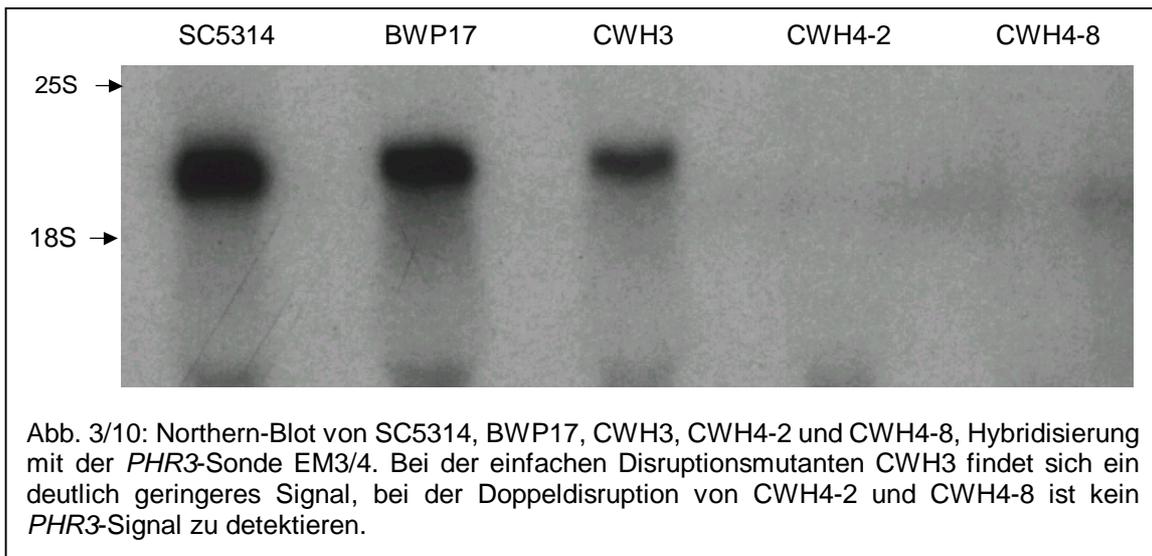
Schema 3/4: Die Disruptionskassetten *ARG4* und *URA3* werden in das Gen *PHR3* integriert und ersetzen das offene Leseraster des Gens. Die Größe der resultierenden PCR-Produkte ist in Balken aufgezeigt. (1) Das native *PHR3*-Gen in SC5314 und BWP17; (2) *PHR3:URA3*-Integration; (3) *PHR3:ARG4*-Integration in CWH4-2 und CWH4-8. *ARG4*-Kassette ist horizontal, *URA3*-Kassette vertikal, die angrenzenden zu *PHR3*-homologen Abschnitte diagonal gestreift. Der von der Klonierungsstelle des gemeinsamen Vektors beider Kassetten stammende DNA-Bereich in welchem der Primer 5'-Vect lokalisiert ist, findet sich lateral der Gene *URA3* und *ARG4* fein gepunktet. Mit den Buchstaben a, b und c sind die PCR-Produkte der nachfolgenden Abbildung zugeordnet.

Abb. 3/9: PCR zum Nachweis der *PHR3*-Disruption. Mit den Primern WH26/WH3 (a) resultiert nur bei einem nativen Allel eine Bande von 0,77kb(SC5314, BWP17, CWH3), für WH26/WH9 (b) unterschiedliche Banden, bei nativem *PHR3* (1,9kb) und je nach Disruptionskassette bei *PHR3:URA3* 2,75kb und bei *PHR3:ARG4* von 3,2kb, für V5'-Vect/WH9 (c) nur für die disruptierten Allele in CWH3 (2,6kb) und CWH4-2, CWH4-8 zusätzlich von (3,1kb). Für CWH3 ist nur eine Bande des nativen Allels in (B) zu detektieren, da dieses PCR-Produkt deutlich kleiner ist als das disruptierte *PHR3:URA3*, wird nur dieses in ausreichender Anzahl amplifiziert.

Zur Ermittlung eines divergierenden Phänotyps nach *PHR3*-Disruption wurde makroskopisch das Wachstum der Stämme SC5314, BWP17, CWH3, CWH4-2 und CWH4-8 untersucht. Auf Sabauroud-, Bierwürz-, Columbia-Blutagar-Platten bei 30°C und Raumluft und anaerob auf Schaedler-Platten zeigten alle Stämme ein gleichmäßiges Wachstum. Auf Yeast-, Kartoffelagar-, YPD pH 4 und Columbia-Kochblut-Platten wuchs nur BWP17 spärlicher.

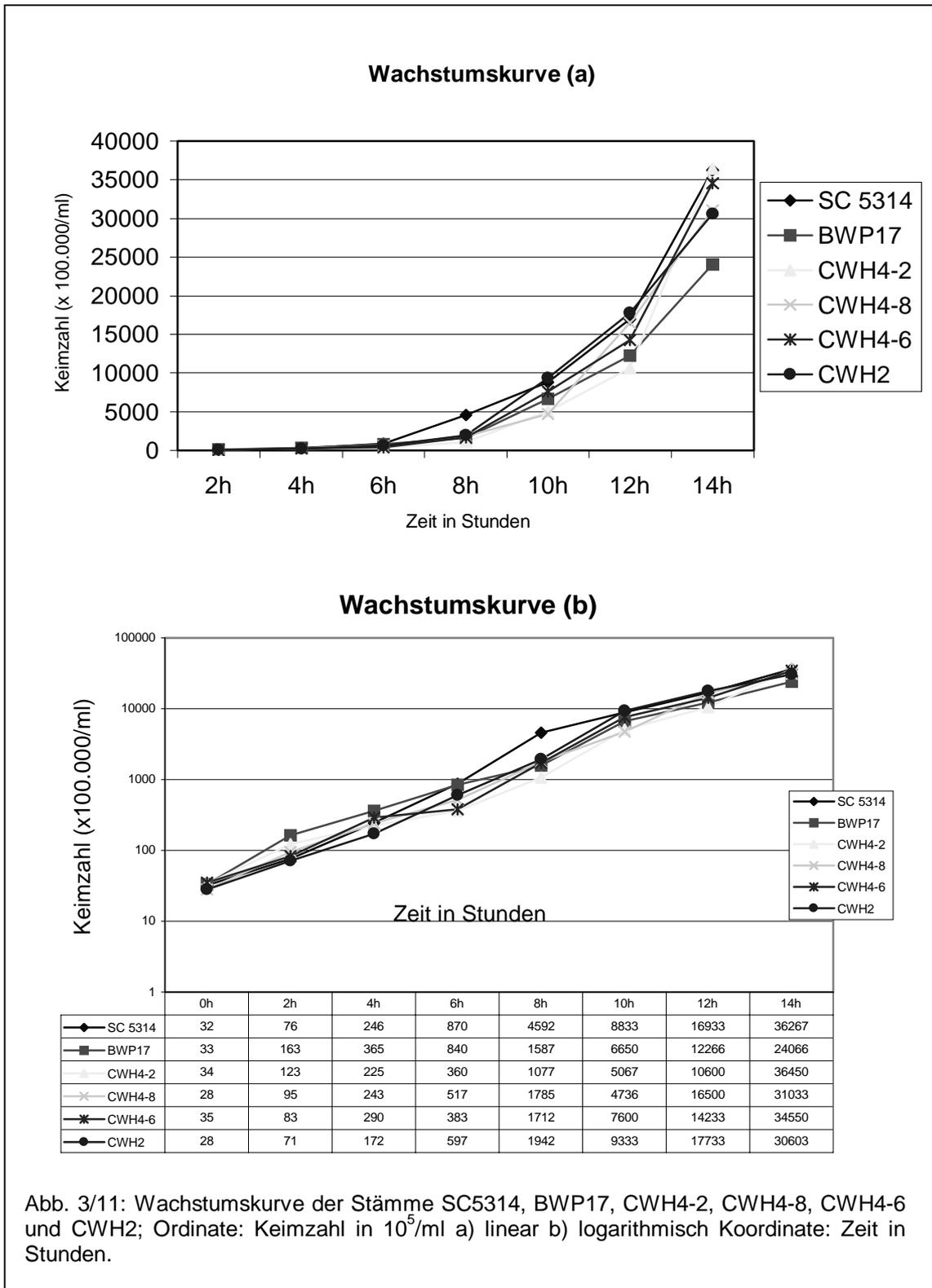
Auf Kochblut- und Yeastplatten zeigte zudem nur SC5314 filamentöses Wachstum. Ebenso konnte auf Reistweenplatten nur für diesen Stamm ein zögerliches Wachstum nachgewiesen werden. Nach Inokulation einer Übernachtskultur in Praesporulationsmedium in Spider-Medium findet sich durchgehend spätestens nach zwei Stunden filamentöses Wachstum. Nach Auftropfen (Spotten) einer Verdünnung mit etwa 10 Keimen auf M199 und Spider-Platten fand sich für BWP17 kein bzw. ein spärliches Wachstum, alle anderen Stämme zeigten keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten und in der Filamentierung.

Mikroskopisch unterscheidet sich der Ausgangsstamm der *PHR3*-Disruption, wohl aufgrund der dreifachen Auxotrophie, trotz Supplementierung von Uridin, Arginin und Histidin, vom Wildtyp von *Candida albicans* deutlich. Nach Inkubation in Vollnährmedien, wie YPD, zeigt der Stamm signifikant vermehrt ballonierete und entrundete Zellen. Dieser Phänotyp ist weitestgehend identisch zu dem der *PHR1*- oder *PHR2*-Deletionsmutanten nach Inkubation beim restriktiven pH (Mühlschlegel et Fonzi, 1997). Die Stämme CWH3 und CWH4 entsprechen trotz Komplementation von einer bzw. zwei Auxotrophien (Histidin und Arginin) dem Bild von BWP17.



3.9. Wachstumskurven

Zur Prüfung der Auswirkung der Transkriptionsrate von *PHR3* wurde vom Stamm CWH2, in welchen ein zusätzliches *PHR3*-Allel integriert wurde, und von den Knock-out-Stämmen CWH3 und beiden Klonen CWH4-2 und CWH4-8 die Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt. Zum Vergleich wurden der Wildtyp SC5314, der Ausgangsstamm der Disruption BWP17 und CWH4-6 verwendet. Letzterer weist neben einer einfachen Disruption von *PHR3*, im Gegensatz zu BWP17, das *ARG4*- und das *URA3*-Gen auf. Als Medium wurde YNB mit Supplementation von Arginin, Histidin und Uridin in doppelter Konzentration verwendet. Nach Mittelung von drei einzelnen Wachstumskurven unterscheiden sich die Kurven der Zellzahl und der optischen Dichte des Mediums nicht signifikant voneinander. Einzig für BWP17 ist entsprechend den Ergebnissen im Wachstumsvergleich auf Agarplatten eine geringe Reduktion der Verdopplungszeit festzustellen (Abb.: 3/11).



4. Diskussion

4.1. Analyse der NS- und der AS-Sequenz von *PHR3*

Die Zellwand von Hefen besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Bausteinen. Für ihre Zusammensetzung und die Adaption an den Zellzyklus und an Umweltreize existiert eine fein abgestimmte Regulation (Klis, 1994). Botenstoffe der Zelle oder von Rezeptoren wahrgenommene Reize der Umgebung, wie z. B. der Wirtsnische, werden über Kaskaden weitergeleitet und können über unterschiedliche Steuerungsmechanismen, wie eine veränderte Translation oder Transkription von Genen oder der Prozessierung von Proteinen, den Aufbau der Zelle und insbesondere der Zellwand den jeweiligen Anforderungen anpassen. Für *PHR1* und *PHR2* von *Candida albicans* und *GAS1* von *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine enzymatische Funktion zum Aufbau (Mouyna et al., 2000) und eine wesentliche Rolle für die Zusammensetzung der Zellwand (Ram et al., 1998) nachgewiesen werden. Häufig sind mehrere zum Teil nahe verwandte Gene für ein und denselben Bestandteil der Zellhülle oder ein Enzym, welches an der Biosynthese beteiligt ist, vorhanden. Am Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* kann eine solche Genvielfalt dargestellt werden. Im komplett sequenzierten Genom der Bierhefe finden sich fünf homologe *GAS*-Gene. Die vorliegenden Daten legen zumindest *in vivo* eine unterschiedliche Bedeutung für den Zellwandaufbau und die Integrität des Keimes nahe. So wurde bisher nur für den bekanntesten Vertreter *GAS1* eine Funktion für den Zellwandaufbau eindeutig belegt. Die Deletion dieses Gens führt zu einer signifikanten Alteration der Zellen mit Verlust der ellipsoiden Zellform und der Zellseparation und vermehrt ballonierten, miteinander verklumpten Zellen. Zugleich kommt es zu einer Änderung der Zusammensetzung der Zellwandbestandteile (Ram et al., 1998). Für die weiteren homologen Gene bei *Saccharomyces cerevisiae* sind derartige Funktionsverluste nach Deletion nicht beschrieben worden.

Bei *Candida albicans* sind bisher die Gene *PHR1* und *PHR2* bekannt. Weitere homologe Gene waren bei dieser Spezies nicht vorbeschrieben. Es konnte nun mit *PHR3* (Gene Bank Accession Number: AF221545) ein weiteres GAS-homologes Gen bei *Candida albicans* identifiziert und sequenziert werden (Abb. 4/1). Die Sequenzlänge der Genfamilie reicht von 1413bp für *GAS4* und *SPO1* bis 1677bp für *GAS1*. Mit 1461 Basenpaaren und resultierenden 487 Aminosäuren entspricht *PHR3* der Größe der anderen Gene.

Der Homologievergleich der Nukleinsäure- und der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den bereits bekannten Genen und Proteinen ordnet dieses Gen eindeutig in die PHR/GAS-Genfamilie mit den Vertretern *GAS1* bis *GAS5* von *Saccharomyces cerevisiae*, *PHR1* und *PHR2* von *Candida albicans* (Mühlschlegel et Fonzi, 1997), *CdPHR1* und *CdPHR2* von *Candida dubliniensis* (Heinz et al., 2000), *SPO1* von *Schizosaccharomyces pombe* (Popolo et Vai, 1999), *EPD1* bei *Candida maltosa* (Nakazawa et al., 1998), *CgGAS1*, *CgGAS2* und *CgGAS3* bei *Candida glabrata* (Weig et al., 1999; Weig et al., 2001) ein. Im direkten Vergleich der Proteine kann für *PHR3* mit *PHR1*, *PHR2* und *GAS4* eine Übereinstimmung von 32% bis 51% und eine Ähnlichkeit von 51% bis maximal 68% dokumentiert werden. Nach diesem Kriterium besteht die engste Verwandtschaft von *PHR3* nicht zu den homologen Genen der selben Spezies *PHR1* oder *PHR2*, sondern zu *GAS4*, einem Vertreter der Genfamilie von *Saccharomyces cerevisiae*. So findet sich im Gruppenvergleich der AS-Sequenzen für Phr3p und Gas4p ein höherer Grad der Übereinstimmung (43,5%) als für die Paarungen von Gas4p oder Phr3p mit den Genen Phr1p, Phr2p oder Gas1p.

In ihrer Untersuchung der abgeleiteten Proteine der PHR/GAS-Genfamilie beschreiben L. Popolo und M. Vai (1999) sechs katalytische Abschnitte (C-Boxen), welche sich durch eine hohe Homologie auszeichnen und für die enzymatische Aktivität des Proteins Bedeutung haben. In diesen sechs C-Boxen finden sich insgesamt 46 Aminosäuren, welche bei allen Proteinen identisch vorliegen. Von diesen können 45 im Protein Phr3p nachgewiesen werden.

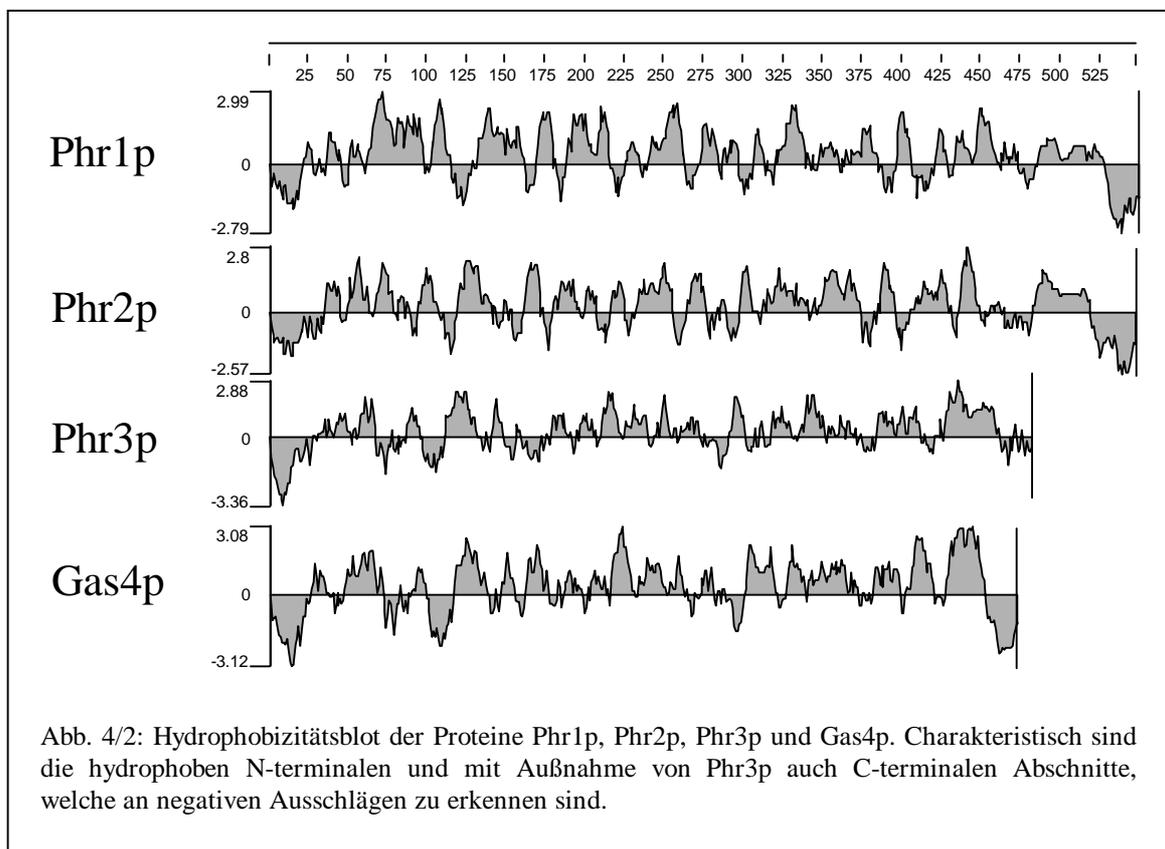
1	ATGTTACAGTGTATCTTGATTGCACTAATAACCGTATCGAATTAACCGGAAATGCCACCCCACTCATCCACGGCCACTACTTTATAGATAGTATCACAAAGAACAACAGTATGTAAACCGCCCAACACAT
1	M L Q C I L I A L I L T V S I T A N V H P I I I H G H Y F I D S I T K E P
132	TCTTGGCCAAACACTTACTAAACCAACCTTACAGTTCTACATCAAGGGAATAGACTACCAGCCAGTGGATCGTTCGAGCTCAACAGCCCAATATCGGATCCCGCAAAATGCTGTAGAGATAT
38	F Y I K G I D Y Q P G S S A V S E L N D P L S D P D K C A R D I
263	AATCCTATTTCAAGAAATGGGTATCAACACCAATTCGATTTTCAATAAATGCAACCTAAACACAGTAAATGCAATGACCACTGTTGGCCAAAGCAGGAATATACTTGTTCAGACGTAAACTCGCCAT
71	I L F Q E L G I N T I R I Y S I N A H L N H D K C M T L A K A G I Y L F L D V N S P
394	TGCCACACCAACCGGATACGAGCCGTGGAAATTCGTAACAATGTAACCTTTGAAAATGTCITTAAGGTGGTAGAACAGTTTCCCACTACAACAACACGCTAGGGTTTATTCGGGGAACGAA
114	L P H H L N R Y E P W N S Y N L Y Y F E N V F K V V E Q F S H Y N N T L G F I A G N E
525	ATTGTCAACGACCCCATCTCCGCCAGTGGCTGCCCAATATGTCAAAAGGGTGGTCCGGGAAATCAAAAAGCTATATCGAATACAATGACCAACAAGAACCAATCCCGTCCGGTTATTCAGCGCCGACCGACTT
158	I V N D P I S A S V A A P Y V K A V V R E I K S Y I E Y N A P R T I P V G Y S A A D D L
656	GAACTATCGAATGCCACTAGCACAGTACCCTCGAGTGGCGACGACAAACCCCAAGAAATCAGTCGACTTTTATGGCGTCAACTCGTACCAGTGGTGGGACCCAGACATTTCTACAGCAGCGGGGTACAAACA
212	N Y R M P L A Q Y L E C G D D N P K E S V D F Y G V N S Y Q W C G D Q T F Y S S G Y N
787	TCTTGGTCAACGATTAACAACATTTCAACCAACCAATGTTTTTTCGGAAATATGGGTGCAATGAGGTGTGCCAGAAATTCGATGAAATCCAGTATGTAACAACAACGATATGATAGATGTTTTCAGT
245	I L V N D Y K H F T K P M F F S E Y G C N E V L P R N F D E V P V L Y T N D M I D V F S
918	GGCGGATGGTATACGAGTTCCACAGGAAACCAACAACATATGGCCTAGTCAAGGTTCTCCAAATGGGACGTCAAAAGTATGGGGACTTTATTCAGTTGAAAAACAATAATTCGACACCCCTACCCGAGCT
289	G G L V Y E F T Q E P N N Y G L V K V L S N G D V K V L R D F I Q L K N K F D T L P E L
1049	AGACTATAGCTATATCAATCCAATGAAAGGAAAAACGAAAAGGATATACACCAAAAGTTGACAAATTTAAAACATCAATTCGAAAATGTAGTTGCTGTACCCCTAAATCTTTGACATTTCTAGGGCGGTTTC
333	D Y S Y I I I Q S M K E N A K D I H Q K L T T F K T S I P K C E L S Y P N L D I S R G V
1180	CCCCGACCAATCGCGCAGACATGATGAAACTGGCGTTGACCGTAAAGCGCGGAGAATATGTGACTCTATCCAACGAGGATCTAAACAACACGTAACAAATTTCTTCCAAAGAAAAGCGCGAAAAACTAGCCATC
376	P P T I A Q T L I E T G V D A K R G E Y V T L S N E D L T T T Y K F F Q E S G E K L A I
1311	GTCAAACAGAAATGAAACCAATGGTGGAAAGTTGAAAAAGCGTTTGAAAAACCGAGAAAAACCCCAAGAACCTGGGAAATCTGTGAGCCCTGCGGAAACCCACAGAACCTGCAGAGCCCCCTTCCACCACCAC
420	V N R I E T M V E V D E K A L E N R E T P Q E P A E S A E P A E P T E P A E P P P P
1442	TAGCACCCCGTTTATFCGACTTTATCCACAAAACATAAGACCCCTTCAAAAACCTTCTGTGCTAACCTGTTTAAATTA
464	S T P F I D F I H K L I D P F K T F C A N L F N

Abb. 4/1: Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *PHR3*, das Intron ist grau hinterlegt, die Spleißstellen mit geschwungenen Klammern gekennzeichnet. Die homologen Bereiche der Gendisruptionskassetten sind unterstrichen, die essentiellen Glutamine (E) in Position 157 und 261 eingerahmt.

Eine einzelne fehlende Aminosäureübereinstimmung bei Phr3p in diesem Vergleich ist nicht überraschend, da über die aufgeführten hochkonservierten Stellen hinaus auch in mehreren anderen gut konservierten Positionen ein einzelnes Protein von der gemeinsamen Sequenz differiert. So findet sich in Position 318 von Gas2p ein Valin, während alle anderen Proteine in der homologen Position ein Leucin haben und in Position 162 von Gas4p ist ein Isoleucin anstelle des sonst vorliegenden Valins kodiert. Für zwei Glutaminsäuren in Position 169 und 270 von *PHR1* konnte Fonzi (2000) eine wesentliche Bedeutung belegen. So führt der Austausch dieser Aminosäuren in *PHR1* zum Verlust der enzymatischen Funktion und entspricht phänotypisch der Gendelektion. Wie bei allen anderen Proteinen der Familie sind diese zwei essentiellen Aminosäuren auch bei Phr3p erhalten.

Zusätzlich zu den Homologien in den sechs katalytischen Domänen findet sich C-terminal von diesen bei Gas1p, Gas2p, Gas5p, Epd1p, Phr1p, Phr2p, und Spo1p eine cysteinreiche Box und anschließend bei Gas1p, Gas3p, Gas5p, Epd1p, Phr1p, Phr2p, und Spo1p eine serinreiche Region (Ser-Box). Cys- und Ser-Box stellen keine katalytischen Abschnitte dar und finden sich in einer Vielzahl unterschiedlichster Proteine. Die Funktion der serinreichen Region ist nicht genau bekannt, doch wird eine stabilisierende Funktion durch starke Mannosylierung, besonders bei plasmamembrangebundenen Proteinen vermutet. Weder das Entfernen noch das Einfügen einer zusätzlichen Serin-Box führen zu einer Fehlfunktion des Proteins (Gatti et al., 1994). Diese Box kann bei Phr3p nicht nachgewiesen werden. Ebenso kann nach Popolo und Vai (1999) diese Domäne bei Gas2p und Gas4p nicht belegt werden. Caro et al. (1997) finden jedoch für diese beiden Proteine ein serin-/threoninreichen Abschnitt, welcher mit 13% allerdings deutlich geringer ist als bei Gas1p (24%), Gas3p (22%) und Gas5p (23%). Ein Bereich mit sechs homologen Cysteinen, welcher die Cys-Box kennzeichnet, fehlt in Phr3p ebenso wie in Gas3p, Gas4p und Gas5p (Popolo et Vai, 1999). Neben Phr3p ist also Gas4p das einzige Protein dieser Familie in dem diese beiden C-terminalen Anhänge nicht im für *PHR1* und *PHR2* typischen Umfang vorliegen.

Im Gegensatz zu allen bisher bekannten PHR/GAS-Genen besteht *PHR3* aus zwei getrennten Exons. Das Intron ist mit 53bp ausgesprochen klein, hat jedoch mit den bei *Saccharomyces cerevisiae* bekannten 5'- und 3' Spleißstellen und der Verzweigungsstelle (Woolford, 1989) alle charakteristischen Kriterien. Posttranskriptionell erfolgt im Zellkern das Spleißen der Introns, das Verbinden der Exons und das Anhängen eines polyadenylierten Caps. Ersteres dient dem Erstellen des durchgehenden Leserasters und zweiteres ist wesentlich für Transport und Stabilität der mRNA (McCarthy, 1998). Diese korrekte Prozessierung der pre-mRNA konnte durch die reverse Transkription für *PHR3* nachgewiesen werden.



Über den Sequenzvergleich hinaus finden sich weitere signifikante Übereinstimmungen und auch interessante Unterschiede. Charakteristisch für die Gene der PHR/GAS-Familie ist ein hydrophobes aminotermiales und carboxyterminales Ende. Nur ersteres, welches als Signal-Peptid bezeichnet wird, kann jedoch bei Phr3p nachgewiesen werden, der C-terminale Abschnitt des

Proteins differiert jedoch deutlich von den anderen und ist annähernd isoelektrisch (Abb. 4/2).

4.2. Lokalisation von Phr3p

Die Lokalisation der Proteine der PHR/GAS-Familie wurde für einzelne Mitglieder nachgewiesen, insbesondere für den Modellkeim *Saccharomyces cerevisiae* und die GAS-Gene existieren eine Reihe von Untersuchungen. Dabei liegen gerade für den Hauptvertreter Gas1p zuletzt widersprüchliche Ergebnisse vor.

Durch den gemeinsamen hydrophoben N-terminalen Aminosäure-Abschnitt werden alle Proteine dieser Familie dem sekretorischen Weg zugeordnet. Dieser dient der Weiterleitung und Modifikation des translatierten Genproduktes vom Zellkern über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zum Zielort (Udenfriend et Kodukula, 1995). Für 686 von 6218 nachgewiesenen offenen Leserastern bei *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine solche Signal-Sequenz nachgewiesen werden (Caro et al, 1997). Aufgrund des vorliegenden Signal-Peptids ist auch für Phr3p von der temporären Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und dort von der Entfernung des NH₂-Endes durch die Signal-Peptidase auszugehen.

Anschließend wird für die GAS-Proteine eine Befestigung in der Zellmembran über den GPI-Anker beschrieben. Für den Hauptvertreter *GAS1* ist dieses belegt worden (Nuoffer et al., 1991).

Caro et al. (1997) konnten für 57 bekannte offene Leseraster im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* eine solche GPI-Verankerungsstelle nachweisen und ordnen 20 der Plasmamembran und 38 der Zellwand zu.

Voraussetzung für eine GPI-Befestigung in der Zellmembran ist demnach, vom carboxyterminalen Ende beginnend, neben einem hydrophoben Proteinende von mindestens elf Aminosäuren Länge, ein Zwischenstück (Spacer) von acht bis zwölf Aminosäuren, zwei basische Aminosäuren und eine Schnittstelle bzw.

Anlagerungsstelle (ω). An der Schnittstelle erfolgt die Abtrennung des aufgeführten C-terminalen Abschnitts und die Anbindung des GPI-Ankers (Nuoffer et al., 1993; Coyne et al., 1993). Nach einem Modell, welches Caro et al. (1997) und Hamada et al. (1998) etablierten, sind ein dibasisches Motiv und eine zusätzliche Aminosäure (ω -4, ω -5 und ω -2) die wesentlichen Kriterien für das Verbleiben eines Teils der Proteine in der Zellmembran. Die Entfernung dieses Motivs führt zur veränderten Lokalisation eines Proteins in der Zellwand. Durch Hinzufügen des dibasischen Motivs an das Zellwandprotein Cwp2p von *Saccharomyces cerevisiae* konnte dieses jedoch nicht in ein Plasmamembranprotein verändert werden. Bei Proteinen der Zellwand fehlt dieses dibasische Motiv direkt nach der ω -Stelle. Nach diesem Modell haben Zellwandproteine häufig sich wiederholende Abschnitte (repeats) und stets serin- oder threoninreiche Abschnitte, welche sich aber auch bei Plasmamembranproteinen finden. Nur zwei der fünf GAS-Proteine, Gas1p und Gas4p, besitzen ein solches dibasisches Motiv. Diese wurden somit als feste Plasmamembranproteine angesehen. Diese Einteilung ist nicht unumstritten. So werden Hybridproteine aus der α -Galactosidase von *Cyamopsis tetragonoloba* und dem carboxyterminalen Enden von GAS1 bzw. YAP3, welche beide das dibasische Motiv aufweisen, in die Zellwand eingebaut (Sampaio et al., 1999). Darüber hinaus gehen dieselben Autoren davon aus, dass Gas1p nur aufgrund einer Hyperglycosilierung nicht durch Antikörper in der Zellwand nachgewiesen werden konnte und detektieren sowohl Yas3p und Gas1p in diesem Kompartiment. So kommen sie zu der Schlussfolgerung, dass alle GPI-Proteine letztlich in der Zellwand gebunden werden.

Da für alle bisher bekannten Gene der GAS/PHR-Familie beide hydrophoben Abschnitte am Anfang und am Ende der abgeleiteten Aminosäuresequenz bekannt sind, wird von einer Befestigung der Proteine in der Zellhülle, also Membran oder Wand, ausgegangen. Durch das Fehlen des hydrophoben C-Terminus können auch die weiteren Kriterien der GPI-Verankerung bei Phr3p nicht nachgewiesen werden, da diese nur durch die Nachbarschaft an diesen Bereich definiert sind. Es ist davon auszugehen, dass diese Bindungsstelle für

das Protein von *PHR3* nicht existiert. Somit gibt es auch für die Abspaltung des C-terminalen Endes im Rahmen der Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum keinen Anhalt. Einige Zellwandproteine sind nicht durch einen GPI-Anker kovalent gebunden (Caro et al., 1997; Klis, 1994). Es kann daher durch Fehlen des GPI-Verankerungs-Motivs in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *PHR3* eine Lokalisation in der Zellhülle weder belegt noch ausgeschlossen werden. Eine zu den anderen Mitgliedern der Genfamilie identische oder homologe Prozessierung und Bindung ist ebenso nicht zu belegen. Gas1p ohne C-terminale Region führt zur Sekretion eines vergrößerten Proteins durch Hypermannosylierung der serinreichen Region (Popolo et Vai 1998). Auch eine Sekretion des Proteins Phr3p und eine extrazelluläre Funktion sind also möglich.

4.3. Funktionsanalyse

4.3.1. Expression von *PHR3*

Die bei *Candida albicans* beschriebenen Gene *PHR1* und *PHR2* (Mühlschlegel et Fonzi, 1997) und die homologen Gene der nahe verwandten Spezies *Candida dubliniensis* *CdPHR1* und *CdPHR2* (Heinz et al., 2000) unterscheiden sich durch ihre besondere pH-Regulation von den GAS-Genen und ermöglichen dem Erreger die Adaption an einen spezifischen Umweltparameter. Eine solche pH abhängige Expression von Genen und Virulenzfaktoren stellt einen Steuerungsmechanismus dar, welcher besonders bei prokaryonten Organismen/Bakterien verbreitet ist (Olson, 1993; Mekalanos, 1992). Einzig für *EPD1* der Genfamilie bei Hefen wird noch eine deutlich geringere pH-abhängige Expressionsvariation postuliert (Nakazawa et al., 1998). Weitere Regulationen dieser Gen-Familie in Abhängigkeit zu anderen Umweltfaktoren oder Signalen sind nicht bekannt.

Expressionsanalysen von *PHR3* zeigen nun, dass dieses Gen, anders als *PHR1* und *PHR2*, entsprechend *GAS1* unabhängig vom pH-Wert des indu-

zierenden Mediums transkribiert wird. Da *PHR1* und *PHR2* bei *Candida albicans* auf einander abgestimmt alternierend im alkalischen bzw. im sauren Milieu exprimiert werden, stellte sich die Frage, ob *PHR3* in Abhängigkeit von diesen beiden Genen reguliert wird. Bei dem Wildtypstamm findet sich unter den untersuchten Bedingungen hierfür kein Nachweis. Auch für die Deletionsmutanten ergibt sich im betroffenen Bereich, also für CAS8 bei alkalischen und für CFM4 bei sauren pH-Werten, keine Änderung der Expressionsrate von *PHR3*. Aus dem Doppel-Knock-out von *PHR1* und *PHR2*, im Stamm CAP2, resultiert keine kompensatorische Hochregulation der Transkriptionsrate von *PHR3*.

Neben dem pH-Wert sind Temperatur und Medien zwei relevante Faktoren, welche bei der Induktion der Hefen/Hyphen-Transition eine wesentliche Rolle spielen. Die Änderung dieser Faktoren bleibt ohne Einfluss auf die nachweisbare Menge von *PHR3*-RNA.

Es zeigt sich bei allen gewählten Untersuchungsbedingungen eine schwache konstitutive Genexpression von *PHR3*. Dieses kann eine differenzierte Transkriptionsregulation nicht ausschließen, da keineswegs alle relevanten Umweltsignale auch nur bekannt sind und nur ein Bruchteil untersucht werden konnte. So finden sich im Rahmen einer systemischen Infektion eine Vielzahl unterschiedlicher Milieubedingungen und Interaktionen (z.B. mit Wirtszellen, wie immunmodulatorische Zellen), welche eine Keimreaktion mit resultierender Signaltransduktion und Genexpression hervorrufen.

Nicht für alle GAS-Gene von *Saccharomyces cerevisiae* findet sich in der Literatur der Nachweis einer Transkription. So können hier Non-sense-Gene, also Gene deren Transkription im Rahmen der Evolution wegen fehlender Funktion verloren ging, nicht ausgeschlossen werden. Durch die Detektion von *PHR3*-spezifischer RNA mit einer Sonde, für welche eine Kreuzhybridisierung mit den homologen Genen der gleichen Spezies ausgeschlossen werden konnte, ist die Expression des Gens belegt und von einer Funktion des resultierenden Proteins auszugehen.

4.3.2. Expressions- und Komplementationsmodelle

Neben der Sequenzhomologie konnte für die Proteine der Gene *PHR1*, *PHR2* und *GAS1* eine homologe Funktion belegt werden. Die Deletion eines der Gene führt, für die ersten beiden nur unter den regressiven pH-Bedingungen, zu einem charakteristischen Phänotyp mit ballonierten, abgerundeten Zellen, welche in verklumpten Zellhaufen vorliegen. Zusätzlich zeigt sich ein deutlich verzögertes Wachstum. Durch Expression von *PHR1* bei allen pH-Werten unter dem konstitutiven Promotor EF1 α kann das Gen ein nach Deletion fehlendes *PHR2*-Gen ersetzen. Ebenso komplementiert *PHR2* unter dem identischen Promotor das deletierte *PHR1*-Gen (Mühlschlegel et Fonzi, 1997). Darüber hinaus konnte für *PHR1* gezeigt werden, dass dieses den nativen Phänotyp von *Saccharomyces cerevisiae* nach Transformation in den aberanten *GAS1*-Deletionsstamm rekonstituieren kann (Vai et al., 1996).

Um die Frage zu untersuchen, ob *PHR3* eine zu den aufgeführten Genen identische Funktion hat, erfolgte in einer analogen Versuchsanordnung die Transformation des Gens unter dem Promotor EF1 α in der *PHR2*-Deletionsmutanten CFM4. Den nur im sauren Milieu vorliegenden aberranten Phänotyp konnte *PHR3* unter diesen Expressionsbedingungen nicht in den wildtypischen zurückführen. Um promotorspezifische Interaktionen ausschließen zu können, wurde das Gen zusätzlich unter dem Promotor von *PHR2* und mit mehreren Kopien von einem größeren Genfragment mit dem eigenen 5'-terminal angrenzenden Promotorbereich überexprimiert. Keines dieser Konstrukte war in der Lage, den durch das fehlende Protein Phr2p resultierenden Wachstumsdefekt und die gestörte Zellform wiederherzustellen.

Eine zu *PHR1/PHR2* identische Funktion kann somit nicht nachgewiesen werden, vielmehr ist eine zumindest partiell differierende Aufgabe des Proteins zu vermuten. Doch es ergeben sich darüber hinaus weitere Fragen und Möglichkeiten. Bei den Transformanten CWH1, CWH2 und CWH5 findet sich in der RNA ein *PHR3*-spezifisches, zusätzliches Signal, welches geringfügig kleiner ist als das native. Für eine fehlerhafte Prozessierung ohne Spleißen des

Introns ergibt sich aus der rTPCR kein Anhalt, zumal hierbei ein um das Intron größeres Produkt resultieren sollte. Die Transkription beginnt nicht unmittelbar am Startkodon der Translation sondern oberhalb hiervon. Durch einen in den Konstrukten fehlender 5' gelegener nicht kodierender Bereich kann es zu einer Änderung der Pre-mRNA ohne Auswirkungen auf das Protein kommen. Eine solche Transkriptionsdifferenz kann eine Divergenz der hybridisierenden Banden verursachen. Alle zur Überexpression von *PHR3* erstellten Plasmide wurden am Genort von *URA3* eingefügt. Dieses Vorgehen hatte für die analogen ektopten Expressionsversuche von *PHR1* oder *PHR2* am selben Ort keine Konsequenzen. Es können aber lokusspezifische Transkriptionsfaktoren für *PHR3* nicht ausgeschlossen werden. Dann würde nur bei Steigerung der Transkriptionsrate am genspezifischen Locus, also z.B. unter einem stärkeren Promotor, eine Überexpression des nativen *PHR3*-Gens resultieren.

Entsprechend den Versuchen mit der *PHR2* defizienten Mutante CFM4 konnte *PHR3* auch in der Komplementation des *GAS1*-Knock-out-Stammes Wb2d den nativen Phänotyp nicht wieder herstellen. Neben Unterschieden in der Expressionstärke und der potentiellen Funktion ist hier jedoch auch eine divergierende Translation als Ursache denkbar. Das Basentriplet CUG in Position 365 von *PHR3* wird aufgrund der unterschiedlichen genetischen Codes beider Spezies bei *Candida albicans* in Serin und bei *Saccharomyces cerevisiae* in Leucin übersetzt.

4.3.3. *PHR3*-Knock-out

Die Bedeutung eines Gens für den Organismus kann durch Entfernen desselben studiert werden. Dieses ist für essentielle Gene bei *Candida albicans* unmöglich. Die Deletionsmutanten von *PHR1*, *PHR2* und *GAS1* zeigen den bereits beschriebenen charakteristischen Phänotyp. Für den Knock-out von *PHR3* wurde anstelle der Deletion des gesamten kodierenden offenen Leserahmens die Disruption eines großen und potentiell relevanten Anteils durchgeführt. Hierfür wurde anstelle der URA-Blast Methode nach Fonzi und Irwin

(1993) eine für *Candida albicans* neu beschriebene Strategie (Wilson et al., 1999) durchgeführt. Der Ausgangsstamm ist auxotroph für drei unterschiedliche Aminosäuren. Nachdem in beide Allele von *PHR3* eines der fehlenden Gene, für Arginin und Uridin Prototrophie, eingesetzt wurde, verbleibt bei der *PHR3*-Disruptionsmutanten ein zusätzliches Gendefizit für *HIS1*. Ein genetischer Unterschied, welcher vor allem bei dem Vergleich, z. B. der Wachstumsgeschwindigkeit, der K.o.-Mutanten mit einem wildtypischen Keim nachteilig ist. Im Vergleich zur Erstbeschreibung zeigte sich eine geringere Effektivität der Disruptionsstrategie, dieses ist möglicherweise durch unterschiedlich große Kassetten zu erklären. Insbesondere das zweite Allel konnte erst nach mehreren Versuchen ausgeschaltet werden. Eine höhere Assoziation der zweiten K.o.-Kassette mit dem bereits disruptierten Allel kann die Ursache sein. Zum einen wären hierfür die zum homologen Genbereich hinzukommenden identischen Abschnitte beider Kassetten verantwortlich zu machen. Diese ergeben sich aus dem einrahmenden Bereich des den Plasmiden zugrunde liegenden Vektors, durch welchen alle Gene mit denselben Primern amplifiziert werden können. Zum zweiten beschreiben Yesland und Fonzi (2000) eine Allel-Spezifität bei gezielten Gentransformationen, welche auf einzelnen Nukleinsäuredivergenzen heterologer Allele beruht.

Bei der Disruption von *PHR3* wurden wesentliche Teile des Gens entfernt. So befinden sich von den bei Popolo und Vai (1999) beschriebenen katalytischen Boxen die Vierte bis Sechste vollständig und die Dritte zu 83% (69 von 83 AS) im betroffenen Bereich. Auch die Homologen zu den nachweislich essentiellen Glutaminsäuren (Fonzi, 1999) wurden ersetzt. Der Erfolg konnte sowohl auf DNA-Ebene mit Hilfe von PCR und Southern-Blot wie auf RNA-Ebene über Northern-Blot bestätigt werden.

Die resultierenden *PHR3*-K.o.-Mutanten zeigen unter den untersuchten Bedingungen weder einen vom Wildtyp divergierenden Phänotyp noch ein signifikant verändertes Wachstumsverhalten. Sie unterscheiden sich somit deutlich von den *PHR1* und *PHR2* defizienten Mutanten. Sollte entgegen den bisherigen Untersuchungen alle drei Gene homologe Funktionen haben, so könnte die

deutlich stärkere Expression von *PHR1* oder *PHR2* den *PHR3*-Defekt überspielen und eine Verzögerung des Wachstums verhindern. Dabei könnte Phr3p aufgrund der niedrigeren Translationsrate eine basale Enzymfunktion beim Fehlen der anderen Proteine erfüllen. Dieses wäre dann nur bei der Dreifach-Knock-out Mutanten aller bisher bei *Candida albicans* bekannten PHR-Gene, z.B. durch Deletion von *PHR3* im Stamm CAP2, zu bestimmen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Funktion von *PHR3* sich von den bekannten Funktionen von *PHR1*, *PHR2* und *GAS1* unterscheidet, oder dass dieses Gen Faktoren benötigt oder unter Bedingungen relevant wird, welche in den durchgeführten Versuchen nicht erfasst werden konnten.

5. Zusammenfassung

Es konnte mit *PHR3* bei *Candida albicans* ein drittes GAS-homologes Gen nachgewiesen werden. Dieses weist überzeugende Übereinstimmungen der Nuklein- und Aminosäuresequenz und mit der fehlenden GPI-Verankerungsstelle und der pH-konstitutiven Expression auch interessante Unterschiede zu den bisher bekannten Genen der PHR-Familie auf. Eine funktionelle Homologie zu den weiteren PHR-Genen bei *Candida albicans* konnte nicht belegt werden. Es sind bisher in verschiedenen Spezies mehrere homologe Gene dieser Familie nachgewiesen worden. So sind auch bei *Candida albicans* weitere möglich und die endgültige Zahl der PHR-Gene wird erst nach Abschluß des *Candida albicans*-Genomprojektes bestimmt werden können. Der Zweck mehrerer homologer Gene ist insbesondere für die bei unterschiedlichen pH-Werten vorliegenden Proteine Phr1p und Phr2p noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung ist, dass ihre Translation auf unterschiedliche Weise die Expression anderer Gene oder die Prozessierung und Funktion von Proteinen beeinflusst. Eine solche feine Regulation von Wachstums- und Virulenzfaktoren und somit eine Anpassung an Umweltbedingungen und Infektionswege ist für die Pathogenität von *Candida albicans* von Bedeutung. Die spezifischen Faktoren für die Induktion von *PHR3* sind, sollte eine differenzierte Regulation vorliegen, dagegen ebenso wenig wie für *GAS4*, als nächstes verwandtes Gen, und für die weiteren GAS-Gene bekannt. Zum Nachweis einer solchen signalspezifischen Transkription sind Experimente mit anderen Versuchsanordnungen, mit welchen sich komplexere Milieus und Infektionswege untersuchen lassen, wie DNA-Chips oder induktionsabhängige Signalkassetten (Morschhäuser et al., 1999; Staib et al., 1999) hilfreich.

Da eine fehlende C-terminale Region bei *GAS1* zur Sekretion eines vergrößerten Proteins mit Hypermannosylierung der serinreichen Region führt (Popolo et Vai, 1998), erscheint auch eine extrazelluläre Funktion von Phr3p, welches dieses hydrophobe 3' Ende nativ nicht besitzt, möglich. Dabei ist eine zu Phr1p und Phr2p ähnliche oder gleiche enzymatische Funktion, welche in

unterschiedlichen Kompartimenten oder von unterschiedlicher Lokalisation aus den Aufbau der Zellwand beeinflusst, denkbar.

6. Perspektiven

Die fehlende GPI-Verankerungsstelle ist der auffälligste Unterschied von *PHR3* zu den anderen Mitgliedern der PHR/GAS-Genfamilie. Da diese für die Bindung des Proteins in der Zellhülle verantwortlich ist, sind besonders Experimente, welche die exakte Lokalisation des zugehörigen Proteins Phr3p bestimmen können, im Weiteren von besonderem Interesse. Mit Hilfe eines Phr3p-spezifischen Antikörpers kann das Protein nach Fraktionierung des Erregers einem Zellkompartiment zugeordnet werden. Der einzige bisher bekannte PHR-Antikörper (Mouyna et al., 2000) bindet sowohl an PHR1p als auch an PHR2p. Aufgrund der vielen identischen Aminosäuren vor allem im katalytischen Bereich ist eine Kreuzreaktivität kaum zu vermeiden.

Durch Ersetzen des carboxyterminalen Endes durch Anhängen eines hydrophoben Proteinendes, z. B. von *PHR2* mit GPI-Bindungsstelle, sollte die Zuordnung des Proteins in der Zelle verändert werden können. Hierbei kann die Frage beantwortet werden, ob ein solches Hybridprotein mit dem katalytischen Anteil von *PHR3* und dem lokusdeterminierenden Anteil von *PHR2* sich in der enzymatischen Funktion von Phr1p oder Phr2p unterscheidet.

Für *PHR1* und *PHR2* konnten mit dem zu *PacC* von *Aspergillus nidulans* homologen Gen *RIM101* (*PRR2*) und den Genen *RIM20* und *RIM8* Teile der induzierenden Signalkaskade identifiziert werden (Davis et al., 2000; Porta et al., 1999; Ramon et al., 1999; El Barkani et al., 2000). Die Bedeutung dieser Kaskade für die Funktion von *PHR3* sowie homologer Regulationswege bei *Saccharomyces cerevisiae* für die Gene *GAS2*, *GAS3*, *GAS4* und *GAS5* ist noch ungeklärt. Interaktionen oder ein unabhängiger Signal- und Expressionsweg können zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden und erfordern weitergehende Studien

Literaturverzeichnis

- Banerjee, S. N.;** Emori, T. G.; Culver D. H.; Gaynes, R. P.; Jarvis, W. R.; Horan, T.; Edwards, J. R.; Tolson, J.; Henderson, T.; Martone W. J. 1991. Secular trends in nosokomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. *American Journal of Medicine* 91 (Suppl): 86-89.
- Banuet, F.** 1998. Signalling in the Yeasts: An Informational Cascade with Links to the Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 249-274.
- Beggs, J. D.** 1978. Transformation of yeast by replicating hybrid plasmid. *Nature* 275: 104-109.
- Bellí, G.;** Garí, E.; Piedrafita, L.; Aldea, M. and Herrero, E. 1998. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 26: 942-947.
- Bernardis, F. De;** Mühlischlegel, F. A.; Cassone, A.; and Fonzi, W. A. 1998. The pH of the Host Niche Controls Gene Expression in and Virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 66: 3317-3325.
- Bodey, G. P.;** Rodriguez, V.; Chang, HY.; and Narboni, G. 1978. Fever and Infection in Leukemic Patients. *Cancer* 41: 1610-1622
- Borg-von Zepelin, M.;** Beggah, S.; Boggian, K.; Sanglard, D. and Monod, M. 1998: The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Molecular Microbiology* 28: 543-554.
- Brown, A. J. P. and** Gow, N. A. R. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends in Microbiology* 7: 333-338.
- Buffo, J.;** Herman, M. A. and Soll, D. R. 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85: 21-30.

- Caro**, L. H. P.; Tettelin, H.; Vossen, J. H.; Ram, A. F. J.; Van Den Ende, H. and Klis, F. M. 1997. *In silico* Identification of Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Plasma-Membrane and Cell Wall Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477-1489.
- Chaffin**, W. L.J.; López-Ribot, J. L.; Casanova, M.; Gozalbo, D.; and Martínez, J. P. 1998. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 130-180.
- Chiani**, P.; Bromuro, C.; and Torosantucci, A. 2000. Defective Induction of Interleukin-12 in Human Monocytes by Germ-Tube Forms of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 68: 5628-5634.
- Coyne**, K. E.; Crisci, A.; and Lublin, D. M. 1993. Construction of Synthetic Signals for Glycosyl-phosphatidylinositol Anchor Attachment. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 6689-6693.
- Davis**, D.; Wilson, R. B.; and Mitchell, A. P. 2000. *RIM101*-Dependent and – Independent Pathways Govern pH Responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology* 20: 971-978.
- Douglas**, C. M.; D'Ippolito, J. A.; Shei, G. J.; Meinz, M.; Onishi, J.; Marrian, J. A.; Li, W.; Abruzzo, G. K.; Flattery, A.; Bartizal, K.; Mitchell, A.; and Kurtz, M. B. 1997. Identification of the *FKS1* Gene of *Candida albicans* as the Essential Target of 1,3- β -D-Glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2471-2479.
- ECMM**. 1997. Rules for Epidemiological Working Groups. *Mycology newsletter*. March: 5.
- 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*. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4635-4647.

- Filler, S. G.;** Swerdloff, J. N.; Hobbs, C.; and Luckett, P. M. 1995. Penetration and Damage of Endothelial Cells by *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 63: 976-983.
- Fonzi, W. A.** 1999. *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* Encode Putative Glycosidases Required for Proper Cross-Linking of β -1,3 and β -1,6-Glucans. *Journal of Bacteriology* 181: 7070-7079.
- Fonzi, W. A.** and Irwin, Y. M. 1993. Isogenic Strain Construction and Gene Mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
- Fridkin, S. K.** and Jarvis, W. R. 1996. Epidemiology of nosokomial Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 499-511.
- Frohman, M. A.;** Dush, M. K.; and Martin, G. R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85: 8998-9002.
- Gale, C. A.;** Bendel, C. M.; McClellan, M.; Hauser, M.; Becker, J. M.; Berman, J.; Hostetter, M. K. 1998. Linkage of Adhesion, Filamentous Growth, and Virulence in *Candida albicans* to a Single Gene, *INT1*. *Science* 279: 1355-1358.
- Gatti, E.;** Popolo, L.; Vai, M.; Rota, N.; and Alberghina, L. 1994. O-Linked Oligosaccharides in Yeast Glycosyl Phosphatidylinositol-anchored Protein gp115 Are Clustered in a Serine-rich Region Not Essential for Its Function. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 19695-19700.
- Georgopapadakou, N. H.;** Tkacz, J. S. 1995. The fungal cell wall as a drug target. *Trends in Microbiology* 3: 98-104.
- Gietz, R. D.;** Schiestl, R. H.; Willems, A. R.; Woods, R. A. 1995. Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast* 11: 355-360.

- Goffeau, A.;** Alert, R.; Agostini-Carbone, ML.; Ahmed, A.; Aigle, M.; Alberghina, L.; Allen, E.; Alt-Mörbe, J.; André, B.; Andrews, S. et al. 1997. The Yeast Genome Directory. *Nature* 387 (suppl): 5-105.
- Guarro, J.;** Gené, J.; and Stchigel, A. M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 454-500.
- Gustin, M. C.;** Albertyn, J.; Alexander, M.; and Davenport, K. 1998. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1264-1300.
- Hamada, K.;** Terashima, H.; Arisawa, M.; and Kitada, K. 1998. Amino Acid Sequence Requirement for Efficient Incorporation of Glycosylphosphatidylinositol-associated Proteins into the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 26946-26953.
- Hamburger, D.;** Egerton, M.; and Riezman, H. 1995. Yeast Gaa1p Is Required for Attachment of a Completed GPI Anchor onto Proteins. *The Journal of Cell Biology* 129: 629-639.
- Hazen, K. C.** 1995. New and Emerging Yeast Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 462-478.
- Heinz, W. J.;** Kurzai, O.; Brakhage, A. A.; Fonzi, W. A.; Korting, HC.; Frosch, M.; and Mühlschlegel, F. A. 2000. Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* 290: 231-238.
- Heinz, W. J.;** Mühlschlegel, F. A. 2000. Systemische Candidosen. *mta Spektrum* 2000: 330-333.
- Hostetter, M. K.** 1994. Adhesins and Ligands Involved in the Interaction of *Candida* spp. with Epithelial and Endothelial Surfaces. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 29-42.

- Hube, B.;** Sanglard, D.; Odds, F.C.; Hess, D.; Monod, M.; Schäfer, W.; Brown, A. J. P.; and Gow, N. A. R. 1997. Disruption of Each of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes *SAP1*, *SAP2* and *SAP3* of *Candida albicans* Attenuates Virulence. *Infection and Immunity* 65: 3529-3538.
- Hube, B.;** Monod, M.; Schofield, D. A.; Brown, A. J. P. and Gow, N. A. R. 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 14: 87-99.
- Ibrahim, A. S.;** Filler, S. G.; Sanglard, D.; Edwards, J. E. JR.; and Hube, B. 1998: Secreted Aspartyl Proteinases and Interactions of *Candida albicans* with Human Endothelial Cells. *Infection and Immunity* 66: 3003-3005.
- Jandrić, M.;** Kalenić, S.; Labar, B.; Nemet, D.; Jakić-Razumović, J.; Mrsić, M.; Plecko, V.; Bogdanić, V. 1995. An Autopsy Study of Systemic Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14: 768-774.
- Kang, M. S. and Cabib, E.** 1986. Regulation of fungal cell wall growth: A guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1→3)-β-D-glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83: 5808-5812.
- Kapteyn, J. C.;** Van Den Ende, H.; Klis, F. M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 373-383.
- Kapteyn, J. C.;** Van Egmond, P.; Sievi, E.; Van Den Ende, H.; Makarow, M. and Klis, F. M. 1999b. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type and β1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology* 31: 1835-18544.
- Klis, F. M.** 1994. Review: Cell Wall Assembly in Yeast. *Yeast* 10: 851-869.
- Ko, C. H. and Gaber, R. F.** 1991: *TRK1* and *TRK2* Encode Structurally Related K⁺ Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 11: 4266-4273.

- Kurzai, O.;** Heinz, W. J. and Mühlischlegel, F. 1999. ASM-Coference 'Candida and Candidiasis'. March 1-4, 1999. Charlston SC, USA. Mycoses 42: 427-430.
- Liu, H.;** Köhler, J.; Fink, G. R. 1994. Suppression of Hyphal Formation in *Candida albicans* by Mutation of a *STE12* Homolog. Science 266: 1723-1725.
- 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.
- Lussier, M.;** White, AM.; Sheraton, J., Paolo, T. di; Treadwell, J.; Southard, S. B.; Horenstein, C. I.; Chen-Weiner, J.; Ram A. F. J.; Kapteyn, J. C.; Roemer, T. W.; Vo, D. H.; Bondoc, D. C.; Hall, J.; Zhong, W. W.; Sdicu, AM.; Davies, J.; Klis, F. M.; Robbins, P. W. and Bussey, H. 1997. Large Scale Identification of Genes Involved in Cell Surface Biosynthesis and Architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 147: 435-450.
- Manners, D. J.;** Masson, A. J. and Patterson J. C. 1973a. The Structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucan from Yeast Cell Walls. Biochemical Journal 135: 19-30.
- Manners, D. J.;** Masson, A. J. and Patterson J. C. and Björndal, H. and Lindberg, B. 1973b. The Structure of a β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan from Yeast Cell Walls. Biochemical Journal 135: 31-36.
- Marks, M. I.;** Marks, S.; and Brazeau, M. 1975. Yeast colonization in hospitalized and nonhospitalized children. The Journal of Pediatrics 87: 524-527.
- McCarthy, J. E. G.** 1998. Posttranscriptional Control of Gene Expression in Yeast. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 1492-1553.
- Mekalanos, J. J.** 1992. Minireview – Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. Journal of Bacteriology 174: 1-7.

- Mitchell**, A. P. 1998. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 1: 687-692.
- Montijn**, R.C.; Vink, E.; Müller, W. H.; Verkleij, A. J.; Van Den Ende, H.; Henrissat, B.; and Klis, F. M. 1999. Localization of Synthesis of β 1,6-Glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 181: 7414-7420.
- Morschhäuser**, J.; Michel, S. and Staib, P. 1999. Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Molecular Microbiology* 32: 547-556.
- Mouyna**, I., Fontaine, T.; Vai, M.; Monod, M.; Fonzi, W. A.; Diaquin, M.; Popolo, L.; Hartland, R. P.; and Latgé, JP. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glucanoyltransferases Play an Active Role in the Biosynthesis of the Fungal Cell Wall. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 14882-14889.
- Mrsa**, V.; Seidl, T.; Gentsch, M. and Tanner, W.; 1997. Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1145-1154.
- Mühlschlegel**, F. A. and Fonzi, W. A. 1997. *PHR2* of *Candida albicans* Encodes a Functional Homolog of the pH-Regulated Gene *PHR1* with an Inverted Pattern of pH-Dependent Expression. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5960-5967.
- Nakazawa**, T.; Horiuchi, H.; Ohta, A.; and Takagi, M. 1998. Isolation and Characterization of *EPD1*, an Essential Gene for Pseudohyphal Growth of a Dimorphic Yeast, *Candida maltosa*. *Journal of Bacteriology* 180: 2079-2086.
- Nuoffer**, C.; Horvath, A.; and Riezman, H. 1993. Analysis of the Sequence Requirements for Glycosylphosphatidylinositol Anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 10558-10563.

- Nuoffer, C.;** Jenö, P.; Conzelmann, A.; and Riezman, H. 1991. Determinants for Glycophospholipid Anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 Protein to the Plasma Membrane. *Molecular and Cellular Biology* 11: 27-37.
- Obi, K.;** Uda, J.; Iwase, K.; Sugimoto, O.; Ebisu, H. and Matsuda, A. 2000. Novel Nikkomycin Analogues: Inhibitors of the Fungal Cell Wall Biosynthesis Enzyme Chitin Synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10: 1451-1454.
- Odds, F.C.** 1988. *Candida and Candidosis*. Bailliere Tindall, Philadelphia, Pa.
- Olson, E. R.** 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiology* 8: 5-14.
- Orejas, M.;** Espeso, E. A.; Tilburn, J.; Sarkar, S.; Arst Jr., H. N.; and Penalva, M. A. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes and Development* 9: 1622-1632.
- Pérez-Martin, J.;** Uria, J. A. and Johnson, A. D. 1999. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene. *The EMBO Journal* 18: 2580-2592.
- Pfaffenbach, B.;** Donhuijsen, K.; Pahnke, J.; Bug, R.; Adamek, R. J.; Wegener, M.; Ricken, D. 1994. Systemische Pilzinfektionen bei hämatologischen Neoplasien. *Medizinische Klinik* 89: 299-304.
- Pfaller, M. A.;** Jones, R. N.; Messer, S. A.; Edmond, M. B. and Wenzel, R. P. 1998. National Surveillance of Nosocomial Blood Stream Infection Due to *Candida albicans*: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibility in the SCOPE Program. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 31: 327-331.
- Pfaller, M.;** Wenzel, R. 1992. Impact of the Changing Epidemiology of Fungal Infections in the 1990s. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 11: 287-291.

- Phan, Q. T.;** Belanger, P. H.; and Filler, S. G. 2000. Role of Hyphal Formation in Interactions of *Candida albicans* with Endothelial Cells. *Infection and Immunity* 68: 3485-3490.
- Popolo, L. and Vai, M.** 1998. Defects in Assembly of the Extracellular Matrix Are Responsible for Altered Morphogenesis of a *Candida albicans phr1* Mutant. *Journal of Bacteriology* 180: 163-166.
- Popolo, L.;** Vai, M. 1999. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426: 385-400.
- Popolo, L.;** Vai, M.; Gatti, E.; Porello, S.; Bonfante, P.; Balestrini, R.; and Alberghina, L. 1993. Physiological Analysis of Mutants Indicates Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-Anchored Protein gp115 in Morphogenesis and Cell Separation. *Journal of Bacteriology* 175: 1879-1885.
- Porta, A.;** Ramon, A. M.; and Fonzi, W. A. 1999. *PRR1*, a Homolog of *Aspergillus nidulans palF*, Controls pH-Dependent Gene Expression and Filamentation in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 181: 7516-7523.
- Ram, A. F. J.;** Brekelmans, S. S. C.; Oehlen, L. J. W. M.; Klis, F. M. 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 358: 165-170.
- Ram, A. F. J.;** Kapteyn, J. C.; Montijn, R. C.; Caro, L. H. P.; Douwes, J. E.; Baginsky, W.; Mazur, P.; Van Den Ende, H.; and Klis, F. M. 1998. Loss of the Plasma Membrane-Bound Protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* Results in the Release of β 1,3-Glucan into the Medium and Induces a Compensation Mechanism To Ensure Cell Wall Integrity. *Journal of Bacteriology* 180: 1418-1424.
- Ramon, A. M.;** Porta A.; 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*. Journal of Bacteriology 181: 7524-7530.

- Repentigny**, L. De; Aumont, F.; Bernard, K.; and Belhumeur, P. 2000. Characterization of Binding of *Candida albicans* to Small Intestinal Mucin and Its Role in Adherence to Mucosal Epithelial Cells. Infection and Immunity 68: 3172-3179.
- Rose**, M. D.; Winston, F.; Hieter, P. 1990 Methods in Yeast Genetics - A Laboratory Course Manual. New York.
- Saiki**, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- Sampaio**, G. de; Bourdineaud, J-P. and Lauquin, G. J-M. 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. Molecular Microbiology 34: 247-256.
- Sanger**, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science USA 74: 5463-5467.
- Sanger**, F. 1981. Determination of Nucleotide Sequences in DNA. Science 214: 1205-1210.
- Santos**, M. A. S.; Ueda, T.; Watanabe, K. and Tuite, M. F. 1997. The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? Molecular Microbiology 26: 423-431.
- Saporito-Irwin**, S. M.; Birse, C. E.; Sypherd, P. S.; and Fonzi, W. A. 1995. *PHR1*, a pH-Regulated Gene of *Candida albicans*, Is Required for Morphogenesis. Molecular and Cellular Biology 15: 601-613
- Schaller**, M.; Schäfer, W.; Korting, H. C. and Hube, B. 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral

- candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Molecular Microbiology* 29: 605-615.
- Schaller, M.**; Korting, H. C.; Schäfer, W.; Bastert, J.; Chen, W-Ch.; and Hube, B. 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Molecular Microbiology* 34: 169-180.
- Segal, E.**; Gottlieb, S.; Altboum, Z.; Gov, Y.; Berdicevsky, I. 1997. Adhesion of *Candida albicans* to Epithelial Cells – Effect of Nikkomycin. *Mycoses* 40: 33-39.
- Seoighe, C.** and Wolfe, K. H. 1999. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opinion in Microbiology* 2: 548-554.
- Shepherd, M. G.** and Gopal, P. K. 1993. Nature and Control of Cell Wall Biosynthesis. In Bossche H. V.; Odds, F.; Kerridge, D. *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. Plenum Press. London.
- Sherwood, J.**; Gow, N. A. R.; Gooday, G. W.; Gregory, D. W. and Marshall, D. 1992. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 30: 461-469.
- Silver, J.**; 1992. Inverse Polymerase Chain Reaction. In *PCR: A practical approach* (M. J. McPherson, P. Quirke, G. R. Taylor, eds.) pp. 137-146. Oxford University Press, Oxford.
- Smits, B. J.**; Prior, A. P.; Arblaster, P. G. 1966. Incidence of *Candida* in Hospital In-patients and the Effects of Antibiotic Therapy. *British Medical Journal* 1: 208-210.
- Sobel, J. D.** 1997. Vaginitis. *The New England Journal of Medicine* 337: 1896-1903
- Southern, E. M.** 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.

- Staib, P.;** Kretschmar, M.; Nichterlein, Th.; Köhler, G.; Michel, S.; Hof, H.; Hacker, J. and Morschhäuser, J. 1999. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Molecular Microbiology* 32: 533-546.
- Sullivan, D. J.;** Westerneng, T. J.; Haynes, K. A.; Bennet, D. E.; and Coleman, D. C. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic Characterization of a Novel Species Associated with Oral Candidosis in HIV-Infected Individuals. *Microbiology* 141: 1507-1521.
- Sullivan, D. and Coleman, D.** 1998. Minireview - *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 329-334.
- Sundstrom, P.** 1999. Adhesins in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 2: 353-357.
- Udenfriend, S.;** Kodukula, K. 1995. How Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins are Made. *Annual Review of Biochemistry* 64: 563-591.
- Vai, M.;** Orlandi, I.; Cavadini, P.; Alberghina, L. and Popolo, L. 1996. *Candida albicans* Homologue of *GGP1/GAS1* Gene is Functional in *Saccharomyces cerevisiae* and Contains the Determinants for Glycosylphosphatidylinositol Attachment. *Yeast* 12: 361-368.
- Weig, M.;** Frosch, M.; Haynes, K. and Mühlischlegel, F. 1999. The cell wall of *Candida glabrata*: *CGG1*, *CGG* and *CGG3* constitute a family of cell surface proteins. Abstr. in Human Fungal Pathogens – Fungal Dimorphism and Disease. European Research Conference 4-8 September 1999, Granada, Spain: 80.
- Weig, M.;** Karch H.; Mühlischlegel, F. 1999b. Pilze im Darm - Fakten, Fragen, Forschungsbedarf. In Kirchner, T. et al. (Hrsg.) Ökosystem Darm VIII, Berlin 1999.

- Weig, M.;** Haynes, K.; Rogers, Th. R.; Kurzai, O.; Frosch, M.; and Mühlischlegel, F. A. 2001. A GAS like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. Microbiology, submitted.
- Wenzel, R. P.** 1995. Nosocomial Candidemia: Risk Factors and Attributable Mortality. *Clinical Infectious Diseases* 20: 1531-1534.
- White, T. C. and Agabian, N.** 1995. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases: Isoenzyme Pattern Is Determined by Cell Type, and Levels Are Determined by Environmental Factors. *Journal of Bacteriology* 177: 5215-5221.
- Wilson, R. B.;** Davis, D.; and Mitchel, A. P. 1999. Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions. *Journal of Bacteriology* 181: 1868-1874.
- Woolford, J. L. Jr.** 1989. Nuklear Pre-mRNA Splicing in Yeast. *Yeast* 5: 439-457.
- Yesland, K. and Fonzi, W. A.** 2000. Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology* 146: 2097-2104.

Abkürzungen

Allgemeine

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	carboxyterminal
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Stunde
kb	Kilobasen
Lsg.	Lösung
min	Minute
N-terminal	aminoterminal
sec	Sekunden
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
v.a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

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

Verzeichnis der Publikationen und Präsentationen

In den folgenden Beiträgen wurden auch Teile der Arbeit präsentiert.

Publikationen des Autors

1. **Heinz**, W. J.; EL Barkani, A.; Theiß, St.; Kurzai, O. Klinik und Pathogenese der Candidose. *Hygiene und Mikrobiologie*, 2/1998, 23-25.
2. **Heinz**, W. J.; Kurzai, O.; Brakhage, A. A.; Fonzi, W. A.; Korting, HC.; Frosch, M. and Mühlischlegel, F. A. 2000. Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* 290: 231-238.
3. **Heinz**, W. J.; Mühlischlegel, F. 2000. Systemische Candidosen. *mta Spektrum* 2000: 330-333.
4. **Kurzai**, O.; Heinz, W. J.; Sullivan, D. J.; Coleman, D. C.; Frosch M. and Mühlischlegel, F. 1999: Rapid PCR Test for Diskrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Isolates Using Primers Derived from the pH-Regulated *PHR1* and *PHR2* Genes of *C. albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, 1587-1590.
5. **Kurzai**, O.; Heinz, W. J.; and Mühlischlegel, F. ASM-Conference“Candida and Candidiasis“ March 1-4, 1999.Charlston SC, USA. *Mycosis*, 1999, 42, 427-430.

Kongreßbeiträge

1. **Heinz, W. J.;** El Barkani, A.; Frosch, M.; Mühlischlegel, F. A. Ein dem *PHR1* und *PHR2* homologes Gen bei *Candida albicans*. 3. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ der DGHM, Burg Rothenfels, 1998.
2. **Heinz, W. J.;** Frosch, M.; Mühlischlegel, F. Ein zu *PHR1* und *PHR2* Homologes Gen bei *Candida albicans*. 32. Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, September 1998.
3. **Heinz, W. J.;** Frosch, M.; Mühlischlegel, F. *PHR3* - Ein *PHR/GAS* Homologes Gen bei *Candida albicans*. 50. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Berlin, Oktober 1998.
4. **Heinz, W. J.;** El Barkani, A.; Choi, G.; Calderone, R.; Fonzi, W.; Frosch, M. and Mühlischlegel, F. A. Identifikation and Characterization of *PHR3* from *Candida albicans*. ASM Conference on Candida and Candidiasis, Charlston, SC, USA, März 1999.
5. **Heinz, W. J.;** Kurzai, O.; Sullivan, D. J.; Coleman, D. C.; Frosch, M. and Mühlischlegel, F. A. System of pH-Regulated Genes Similar to *PHR1/PHR2* of *Candida albicans* in *Candida dubliniensis* Can Be Used for Differentiation Between Both Species. 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, März 1999.
6. **Heinz, W. J.;** El Barkani; A. Müksch, S.; Frosch, M. und Mühlischlegel, F. Kontrollierte Genexpression in *Candida albicans* durch einen pH-regulierten Promotor. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Regensburg, Oktober 1999.
7. **Heinz, W. J.;** El Barkani, A.; Choi, G.; Fonzi, W.; Frosch, M. and Mühlischlegel, F. A. *PHR3* of *Candida albicans*. Research Conference on Human Fungal Pathogens: Fungal Dimorphism and Disease in Granada, Spain, September 1999.
8. **Heinz, W. J.;** Kurzai, O.; Fonzi, W. A.; Frosch, M. und Mühlischlegel, F. Expression und Funktion der PHR-homologen Gene bei *Candida dubliniensis*. 4. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ der DGHM, Burg Rothenfels, Juni 1999.

-
9. **Günther**, B.; Heinz, W. J.; Frosch, M. und Mühlischlegel, F. A. Definieren neuer Angriffsziele der Antimykotischen Therapie. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Regensburg, Oktober 1999.
 10. **Kurzai**, O.; Heinz, W. J.; Sullivan, D. J.; Coleman, D. C.; Frosch, M. and Mühlischlegel, F. Characterization of pH-regulated genes in *Candida dubliniensis* and their use as means of differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. 5th Congress of the European Confederation of Mycology and 33. Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft, Dresden, Juni 1999.

Danksagung:

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Frosch für die Überlassung des Themas und für die Schaffung jener Rahmenbedingungen, welche die Erstellung einer solchen Arbeit erst möglich machen.

Herrn Dr. med. Fritz Mühschlegel als Leiter der Arbeitsgruppe danke ich für die dauerhafte Unterstützung bei der Erstellung der Promotion und die Hilfe beim Einarbeiten in das neue Aufgabenfeld. Bei beiden möchte ich mich für die Förderung zur Präsentation der gewonnenen Daten auf nationalen und internationalen Kongressen bedanken.

Herrn Abdelmalic El Barkani danke ich für die Hilfe beim Erlernen der Arbeitstechniken. Ihm und Herrn Oliver Kurzai bin ich für viele fachliche Diskussionen und die Zusammenarbeit dankbar.

Der MTA Stefanie Müsch danke ich für die stets freundliche und hilfreiche Bereitschaft bei kleinen und großen Aufgaben unterstützend zur Hand zu gehen.

Frau Meike Stolz und Herrn Johannes Schellakowsky danke ich für das Korrekturlesen des Skripts.

Curriculum vitae

Name: Werner Johannes H e i n z
Geboren: 25. Oktober 1967 in Würzburg
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: ledig

Eltern: Anton Paul Heinz, Facharzt für Radiologie, verstorben 1979.
Hinriette Heinz, geb. Noosten, Gewerbeoberlehrerin

Wohnort: 97082 Würzburg
Steinbachtal 74

Schulbesuch: 1974 - 1978 Steinbachtal-Grundschule in Würzburg
1978 - 1987 Deutschhaus-Gymnasium in Würzburg
naturwissenschaftlicher Zweig

Wehrdienst: 1987 – 1988 Grundwehrdienst
im Sanitäts- und Lazarettendienst der Bundeswehr

Studium: November 1988 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
September 1990: Physikum
August 1991: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 1994: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1994 bis Oktober 1995 Praktisches Jahres mit
Tertialen in der Inneren und der Chirurgischen Abteilung
der Missionsärztlichen Klinik und der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten d. Universität Würzburg
16. November 1995: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Gesamtnote: 2,33 (gut)

Oktober 1991 - Juli 1993 Anglikum:
Integrierter Englischkurs an der Universität Würzburg.

Approbation: 18. November 1997

Beruf: 1. Mai 1996 – 31. Oktober 1997 Arzt im Praktikum in der
kardiologischen Abteilung des Juliusspitals, Würzburg,
unter Leitung von Prof. Dr. J. Walter.

15. Dez. 1997 – 28. Feb. 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Institut f. Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg
unter Leitung von Prof. Dr. M. Frosch.

Seit 1. März 2001 Assistenzarzt in der
Medizinischen Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg
unter Leitung von Prof. Dr. K. Wilms.

Würzburg, den 19. Juni 2001

