

**Identifizierung und Charakterisierung des vakuolären
ABC-Transporters Mlt1p und der Phospholipase B Plb5p**

von

Candida albicans

Dissertation

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Stephanie Theiß
aus München**

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

für meine Eltern

Danksagung

Während meiner Arbeit im Labor und beim Verfassen der Dissertation habe ich sehr viel Unterstützung, Verständnis und Hilfeleistung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte:

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. J. Hacker für die gute Betreuung und stete Unterstützung meiner Arbeit, was dazu beitrug, dass ich meine Dissertation trotz ungeplant langer Schreibphase vollenden konnte. Auch Prof. Dr. M. Frosch möchte ich danken, dass er es mir zeitlich ermöglichte die Dissertation neben meiner beruflichen Tätigkeit, die ich im Anschluß an meine Doktorarbeit aufnahm, zu verfassen. Bei Prof. Dr. J. Kreft möchte ich mich für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit bedanken, insbesondere aber für den seit meiner Diplomarbeit bestehenden sehr guten Kontakt.

Ganz besonders danke ich Dr. G. Köhler, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstanden ist. Mit steter Diskussionsbereitschaft, fachlicher Kompetenz und ausdauernder Betreuung hat er den Fortgang meiner Arbeit immer gefördert. Frau Dr. M. Kretschmar und Herrn Dr. T. Nichterlein danke ich sehr für die Durchführung der *in vivo*-Experimente meiner Arbeit sowie für die vielen fruchtbaren Fachgespräche. Prof. Dr. A. Bachhawat danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Zusammenhang mit den *ade2*-Komplementationsversuchen.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des *Candida*-Labors sowie des Zentrums für Infektionsforschung und des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie. Sie alle trugen dazu bei, dass ein sehr anregendes und angenehmes Arbeitsklima entstand. Bei Prof. Dr. J. Morschhäuser bedanke ich mich für viele fachliche Anregungen und die zur Verfügung gestellten Primer und Plasmide. Ein ganz lieber Dank geht an Hilde Merkert für zahlreiche Hilfen am Computer und Laser-Fluoreszenzmikroskop. Dass ich gerne und motiviert in den Laboralltag ging, dafür sorgten auch die vielen kleinen Besonderheiten und die freundschaftlichen Kontakte, die bis heute über die Zeit am Institut hinaus bestehen. Da sind z. B. die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Ganggespräche mit Jutta N., Katharine P., Dagmar K., Sonja H., Claudia D., Salam K., Marcella F., Anita K., Kai M., Renate F. und Anja C. In Erinnerung bleibt mir besonders die musikalische Gestaltung so mancher Weihnachtsfeier gemeinsam mit u. a. Peter S. und Julia B. Ein großer Dank auch an „meinen Diplomanden“ Stefan B. für seine hervorragende wissenschaftliche Mitarbeit und für viele bereichernde Diskussionsrunden.

Weiterhin danke ich meinem Schwager Christian für die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit. Sanni und Bernd sowie Renate und Conny danke ich für ihre Hilfe.

Schließlich möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Michael, dafür danken, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein tiefster Dank aber gilt meinen Eltern für ihre große Hilfsbereitschaft und stete Unterstützung - was für mich keine Selbstverständlichkeit ist.

INHALTSVERZEICHNIS

I	Zusammenfassung	1
II	Summary	4
III	Einleitung.....	7
	1. Pilze und ihre Bedeutung in der Humanmedizin.....	7
	2. <i>Candida albicans</i> als Krankheitserreger.....	8
	2.1 Biologie.....	9
	2.2 Epidemiologie	10
	2.3 Klinische Manifestation und Therapiemöglichkeiten	10
	2.4 Wirtsabwehrmechanismen	11
	3. Virulenzassoziierte Eigenschaften von <i>C. albicans</i>	12
	3.1 Identifikation Virulenz-assoziiierter Faktoren in <i>C. albicans</i> durch Gendeletionsmethoden.....	13
	3.2 Sekretion hydrolytischer Enzyme	16
	3.2.1 Die <i>SAP</i> -Genfamilie	16
	3.2.2 Phospholipasen.....	17
	4. Transportsysteme.....	21
	5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	25
IV	Material und Methoden	26
	1. Stämme und Genbanken.....	26
	2. Vektoren, Oligonukleotide und DNA-Sonden	28
	3. Größenmarker für DNA- und RNA-Gele.....	36
	4. Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
	5. Computeranalysen und Genbankeinträge.....	38
	6. Anzucht der Bakterien- und Hefepilzstämmen	39
	6.1 Stammhaltung	39
	6.2 Bestimmung der Zelldichte	39
	6.3 Anzucht der <i>E.-coli</i> -Stämme.....	40
	6.4 Anzucht der Pilzstämmen	40
	6.4.1 Anzucht von <i>C.-albicans</i> -Stämmen in Induktionsmedien und für phänotypische Tests	41
	6.4.2 Anzucht von <i>C.-albicans</i> -Stämmen unter Zugabe wachstumshemmender Substanzen	42
	7. Molekularbiologische Methoden.....	43
	7.1 Polymerasekettenreaktion	43
	7.2 DNA-Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden.....	45
	7.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
	7.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C.-albicans</i> -Zellen.....	45
	7.2.3 Aufreinigen, Fällern und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	46
	7.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten.....	46
	7.4 Herstellung rekombinanter Plasmide für Genexpressionsanalysen und Stammkonstruktionen	47
	7.4.1 Herstellung einer <i>MLT1::GFP</i> -Fusionskassette zur genomischen Markierung des <i>caMLT1</i> -Gens.....	47
	7.4.2 Herstellung eines <i>caMLT1</i> -Expressionsplasmids.....	48
	7.4.3 Herstellung der <i>MLT1-URA3</i> -Blaster-Kassette.....	48
	7.4.4 Konstruktion einer <i>MLT1-MPA^R</i> -Insertionskassette	49
	7.4.5 Herstellung der <i>MLT1-MPA^R</i> -Blaster-Kassette.....	49

7.4.6	Komplementation der <i>camlt1/camlt1</i> -Mutation.....	50
7.4.7	Herstellung der <i>PLB5-URA3</i> -Blaster-Kassette	50
7.4.8	Herstellung des <i>PLB5-MPA^R-Tag</i> -Flippers.....	51
7.4.9	Komplementation der <i>caplb5/caplb5</i> -Mutation im ATCC44808-Stamm.....	51
7.5	Genetische Transformationsmethoden.....	52
7.5.1	Transformation von <i>E.-coli</i> -Zellen.....	52
7.5.2	Transformation von Pilzzellen	52
7.5.3	Methoden zur Selektion positiver Transformation.....	53
7.6	Southern Hybridisierungen	55
7.6.1	Nicht-radioaktive Hybridisierung chromosomaler DNA-Fragmente.....	55
7.6.2	Radioaktive Hybridisierung einer Fosmidgenbank.....	56
7.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i>	57
7.8	Northern Hybridisierung	58
7.9	DNA-Sequenzierung	59
7.10	5' und 3' RACE	61
8.	Fluoreszenzmikroskopie.....	62
9.	Experimente im Tiermodell.....	63
V	Ergebnisse.....	65
1.	Isolierung des <i>caMLT1</i> - und <i>caPLB3</i> -tragenden genomischen Bereichs aus <i>Candida albicans</i>	66
1.1	Hybridisierung einer Fosmidgenbank mit <i>caMLT1</i> - und <i>caPLB3</i> -spezifischen Gensonden.....	66
1.2	Sequenzbestimmung der <i>caPLB3</i> - und <i>caMLT1</i> -umfassenden Region und Identifizierung weiterer offener Leseraster.....	67
2.	Charakterisierung des caMlt1p-Transportproteins	69
2.1	Analyse der Sequenzdaten	69
2.1.1	Analyse der putativen Promotorregion von <i>caMLT1</i>	70
2.1.2	Suche nach caMlt1p-Homologien.....	71
2.1.3	Identifikation ABC-Transporter typischer und konservierter Bereiche in der von <i>caMLT1</i> abgeleiteten Aminosäuresequenz	72
2.1.4	Vergleich der von <i>caMLT1</i> abgeleiteten Aminosäuresequenz mit scYcf1p.....	73
2.2	Untersuchungen der <i>caMLT1</i> mRNA-Expression <i>in vitro</i>	76
2.2.1	Wachstumskinetik in YPD	76
2.2.2	<i>caMLT1</i> -Transkription unter Hyphen-induzierenden Bedingungen	78
2.3	Subzelluläre Proteinlokalisierung von caMlt1p	79
2.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Funktionalität von caMlt1p.....	81
2.4.1	<i>CaMLT1</i> -Transkription in Anwesenheit zytotoxischer Substanzen.....	81
2.4.2	Komplementationsversuch eines <i>scycf1</i> -negativen Stammes	83
2.5	Mutagenese von <i>caMLT1</i> mittels <i>URA3</i> -Blaster im <i>ura3</i> -negativen Stamm.....	84
2.5.1	Analyse des <i>in vitro</i> Wachstumphänotyps der <i>camlt1</i> -Mutanten im Stamm CAI4.....	85
2.6	Etablierung eines MPA-resistenten <i>caIMH3</i> -Allels als dominanter Selektionsmarker zur Genmutagenese im wildtypischen Stamm	88
2.6.1	Beweggründe und Funktionsprinzip	88
2.6.2	Untersuchungen hinsichtlich der Selektionierbarkeit nach Integration des <i>MPA^R</i> -Gens als Einzelkopie ins Genom	89
2.6.3	Herstellung von <i>camlt1</i> -Deletionsmutanten mittels <i>MPA^R</i> -Blaster im wildtypischen Stamm SC5314	91

2.6.4	Phänotypische Charakterisierung der <i>camlt1</i> -Mutanten im Stamm SC5314 <i>in vitro</i>	94
2.7	<i>In vivo</i> Analyse der <i>camlt1</i> -Mutation im Mausmodell	97
2.7.1	Intravenöse Infektion.....	98
2.7.2	Intraperitoneale Infektion.....	99
2.7.3	Komplementation des caMlt1p-negativen Phänotyps des Stammes ST13-63 nach intraperitonealer Infektion	101
2.7.4	Gallensäure-Toleranztest.....	102
3.	Charakterisierung der Phospholipase caPlb5p	103
3.1	Analyse der <i>caPLB5</i> -Sequenzdaten	103
3.1.1	Identifizierung von Allel-Sequenzdifferenzen	103
3.1.2	Charakterisierung der von <i>caPLB5</i> abgeleiteten Proteinsequenz.....	104
3.1.3	caPlb5p-Homologierecherche	105
3.1.4	Analyse der caPlb5p Proteinsequenz und Vergleich mit anderen homologen Phospholipasen B Proteinen aus Pilzen.....	107
3.2	Studien zur Phospholipasen Expression <i>in vitro</i>	110
3.2.1	Wachstumskinetik in YPD	110
3.2.2	Expression der <i>caPLB5</i> -mRNA unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in den Stämmen CAI4, SC3514 und ATCC44808	111
3.2.3	Vergleich des <i>caPLB1</i> -, <i>caPLB2</i> - und <i>caPLB5</i> -Transkriptionsprofils im Hyphen-induzierenden Lee's Medium.....	114
3.3	Herstellung von <i>caplb5</i> -Mutantenstämmen	115
3.3.1	Inaktivierung des <i>caPLB5</i> -Gens mittels <i>URA3</i> -Blaster im Stamm CAI4	115
3.3.2	Inaktivierung des <i>caPLB5</i> -Gens mittels <i>MPA^R</i> -Flipper im Stamm ATCC44808	117
3.4	Charakterisierung der Mutantenstämmen	121
3.4.1	Untersuchungen des <i>in vitro</i> Wachstumsverhaltens der <i>caplb5</i> -Mutanten.....	121
3.4.2	Virulenzverhalten der <i>caplb5</i> -Mutantenstämmen im i. v. Infektionsmodell.....	122
3.4.3	Komplementation des caPlb5p-negativen Phänotyps des Stammes KH44-91 nach intravenöser Infektion.....	125
VI	Diskussion	128
1.	Etablierung eines <i>MPA</i> -resistenten <i>caIMH3</i> -Allels (<i>MPA^R</i>) als dominanter Selektionsmarker zur Genmutagenese im wildtypischen Stamm.....	128
2.	Strukturelle Charakterisierung des caMlt1p-Transporters und funktionale Analyse <i>in vitro</i> und im Infektionsmodell	132
3.	Charakterisierung eines dritten Phospholipase-B-Gens in <i>C. albicans</i> und Untersuchungen zu dessen Virulenzbeitrag im systemischen Infektionsmodell.....	142
VII	Literaturverzeichnis	154
VIII	Anhang	173
1.	Abkürzungen	173
2.	Sequenzen der Gene <i>caMLT1</i> und <i>caPLB5</i>	175
3.	Erklärungen	181
4.	Publikationen zur Dissertation.....	182
5.	Lebenslauf	183

I ZUSAMMENFASSUNG

Die opportunistische Hefe *Candida albicans* besiedelt in vielen gesunden Menschen als Kommensal vorwiegend die Schleimhäute im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt. Im immungeschwächten Patienten, z. B. bei einer bestehenden Grunderkrankung wie AIDS oder onkologischen Erkrankungen, kann *C. albicans* in Abhängigkeit des Immunstatus des Patienten oberflächliche oder tief liegende systemische Mykosen verursachen. Dabei ist *C. albicans* in der Lage durch ein koordiniertes Zusammenspiel bestimmter zellulärer Eigenschaften sich unterschiedlichen Umweltbedingungen anzupassen und unterschiedliche Nischen innerhalb des Wirts zu kolonisieren. Die Sekretion hydrolytischer Enzyme, wie Proteinasen und Phospholipasen, stellt eine wichtige Eigenschaft des Pilzes dar, die als wesentlicher Faktor für die Aufrechterhaltung der Pathogenität von *C. albicans* angesehen wird. Eine Beteiligung von Phospholipase-B-Isoenzymen an der Virulenzausbildung konnte für caPlb1p bereits eindeutig nachgewiesen werden. Ein Schwerpunkt der hier vorliegenden Studie ist die funktionale Charakterisierung eines neuen Mitglieds der Phospholipase-B-Genfamilie, des *caPLB5*-Gens.

Zudem präsentiert diese Arbeit auch die Isolierung und Charakterisierung des *ATP-Binding-Cassette*-(ABC)-Transporter-Gens *caMLT1* aus *C. albicans*. CaMlt1p zählt zur MRP/CFTR-Unterfamilie ATP-bindender Transportproteine, eine Proteinkategorie, die in diesem Pilz bislang noch nicht beschrieben wurde. Energiebetriebene Transportproteine der ABC-Superfamilie schleusen eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate aktiv durch biologische Membranen und erfüllen dabei wichtige Funktionen im zellulären Metabolismus und in der Entgiftung. Während der Kolonisation und Infektion sieht sich *C. albicans* vermutlich mit vielen verschiedenen toxischen Verbindungen konfrontiert. Eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen Verbindungen trägt zu einer besseren Überlebenschance des Mikroorganismus bei und könnte für die Prävalenz einiger Stämme mit verantwortlich sein.

Die Inaktivierung beider Gene, *caMLT1* und *caPLB5*, erfolgte auf zweierlei Weise: mittels einer klassischen Mutagenesemethode für *C. albicans* (dem *URA3*-Blaster-System im Ura⁻-auxotrophen Stamm CAI4) und durch Entwicklung eines neuen dominanten Selektionssystems. Die dominante Selektion basiert dabei auf der genomischen Insertion einer Einzelkopie eines mutierten *caIMH3*-Allels (*MPA^R*), das Transformanten Resistenz gegenüber Mycophenolsäure (MPA) verleiht. Dieses System ermöglicht die genetische Manipulation von *C. albicans* Wildtypstämmen, wodurch die mühselige Konstruktion auxotropher und oft avirulenter Stämme nicht mehr nötig ist.

Ein Teil des *caMLT1*-Gens wurde als Nebenprodukt bei der Überprüfung einer genomischen Expressionsgenbank von *C. albicans* mit Antiserum gegen Integrin-ähnliche Moleküle isoliert. Um die komplette Gensequenz zu erhalten, wurde aus einer genomischen Bibliothek von *C. albicans* ein, das *caMLT1*-Gen beinhaltender Fosmidklon isoliert und die Sequenzabfolge des *caMLT1*-Gens mit angrenzenden Bereichen bestimmt. Das CaMlt1-Protein zeigt hohe Ähnlichkeiten zu den vakuolaren Efflux-Pumpen Ycf1p (*yeast cadmium factor 1*) und Bpt1p (*bile pigment transporter 1*) von *S. cerevisiae*. Homologierecherchen im *C.-albicans*-Genom ergaben mindestens zwei weitere offene Leseraster mit sogar höheren Ähnlichkeiten zu scYcf1p und scBpt1p. Das CaMlt1-Protein besitzt die strukturelle Organisation eines sogenannten „full size“ MRP/CFTR-ähnlichen Transporters mit einer verlängerten NH₂-terminalen Transmembranregion und einer zentralregulatorischen (R) Domäne, wie es beides auch für scYcf1p beschrieben ist. Durch genomische Markierung mit dem grün fluoreszierenden GFP-Protein konnte CaMlt1p in der vakuolaren Membran lokalisiert werden. Northernblotthybridisierungen belegten die Induzierbarkeit der Gentranskripte durch die metabolischen Gifte Cadmium und CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen), beides Substrate der scYcf1-Pumpe. Obwohl diese Untersuchungen darauf hindeuten, dass CaMlt1p ein Ortholog von scYcf1p sein könnte, zeigte sich bei dem Komplementationsversuch einer *scycf1*-negativen *S.-cerevisiae*-Mutante mit einer *caMLT1*-Genkopie keine Reversion des sensitiven Phänotyps gegenüber Cadmium oder CDNB. Auch wiesen die in dieser Arbeit konstruierten, *camlt1*-negativen Mutanten in *C. albicans*, die zur Identifizierung potentieller CaMlt1p-Substrate eingesetzt wurden, keinen hypersensitiven Phänotyp gegenüber CdCl₂, CDNB oder irgendeiner anderen getesteten inhibitorischen Substanz auf. CaMlt1p ist demzufolge kein funktionales Homolog von scYcf1p. Als vakuolar lokalisiertes Protein weist *caMLT1* ein für diese Proteingruppe typisches Transkriptionsprofil auf. Die mRNA-Expression erfolgt dabei wachstumsphasenabhängig mit der höchsten Geninduktion während des *Diauxic-Shifts*, wenn ein Mangel an Glucose (und anderen Nährstoffen) im Medium entsteht. Die im wildtypischen *C.-albicans*-Stamm SC5314 mit Hilfe des dominanten Selektionsmarkers *MPA^R* generierte Nullmutante war interessanterweise in einem murinen Peritonitismodell in ihrer Fähigkeit die Leber (und Pankreas) zu invadieren drastisch reduziert. Durch Reintegration einer funktionalen *caMLT1*-Genkopie, wiederum mit Hilfe des *MPA^R*-Selektionssystems, konnte der Virulenzdefekt aufgehoben werden. CaMlt1p scheint in die Fähigkeit von *C. albicans* involviert zu sein an intestinale Organe adhären und Gewebebarrieren penetrieren zu können, möglicherweise durch Einbindung des Transporters in Stressantwort- und Detoxifikationsmechanismen.

Die Sequenzbestimmung des Fosmidklons, das das *caMLT1*-Gen trägt, offenbarte die Anwesenheit eines weiteren ORFs, das hohe Homologien zu Phospholipasen aus Pilzen zeigt. Sequenzanalysen des identifizierten Gens zeigten die Anwesenheit einer für Lysophospholipasen / Phospholipasen B typischen katalytischen Domäne. Aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den vier anderen Phospholipasen B in *C. albicans* wurde dieses Gen mit *caPLB5* bezeichnet. Demzufolge verfügt *C. albicans* über eine Phospholipase-B-Multigenfamilie mit fünf putativen Mitgliedern. Im Gegensatz zu den gut untersuchten sekretorischen PLBs *caPlb1p* und *caPlb2p* scheint das *caPlb5p*-Protein GPI-verankert und letztlich zellwandgebunden zu sein. Überdies verfügt *caPlb5p* über eine Serin-reiche NH₂-terminale Verlängerung, die in anderen beschriebenen PLBs aus Pilzen so nicht vorkommt. Mittels Northernexpressions-Studien ließen sich in verschiedenen *C.-albicans*-Stämmen und unterschiedlichen Wachstumsbedingungen *caPLB5*-spezifische Transkripte nachweisen. Während des Hefe-Hyph-Wechsels in Lee's Medium zeigte sich interessanterweise eine differentielle Regulation der Gene *caPLB5*, *caPLB1* und *caPLB2*, wobei die Expression von *caPLB5* in Keimschlauch-bildenden Zellen stark anstieg und die Expression von *caPLB1* und *caPLB2* vor allem in Pseudohyphen induziert wurde. Dabei könnte eine differentielle Regulation von Mitgliedern der Phospholipase-B-Genfamilie *in vitro* auch bedeutend für die Invasion unterschiedlicher Gewebe im Wirt sein. Durch Sequenzanalyse einzelner *caPLB5*-Allele konnte die Anwesenheit zweier unterschiedlicher Allele in *C. albicans* bei verschiedenen Stämmen nachgewiesen werden. Die gezielte Geninaktivierung beider Allele in zwei verschiedenen Stämmen – die Inaktivierung erfolgte mittels *URA3*-Blast-System im *Ura*⁻-auxotrophen Stamm CAI4 und neuem dominanten Selektionsmarker *MPA*^R in einem Wildtypisolat – resultierte in einer attenuierten Virulenz, was sich im Mausmodell für systemische Infektion anhand des Kolonisationsgrads des Wirtsgewebes messen ließ. Die Phänotypen sowohl der Nullmutanten als auch der *caPLB5*-Revertanten belegen, dass die Phospholipase B *caPlb5p* für die vollständige Virulenz des Pathogens benötigt wird und dabei eine Rolle bei der zellassoziierten Phospholipase A2 Aktivität und der *in vivo* Organbesiedlung spielt.

II SUMMARY

The opportunistic yeast *Candida albicans* is a commensal in most healthy human individuals colonizing predominantly the mucosae of the gastrointestinal and urogenital tract. In immunocompromised patients, e. g. suffering from AIDS or oncological disease, *C. albicans* is able to cause superficial mycoses and deep-seated systemic infections depending on the immune status of the infected patient. In doing so, a coordinated interplay of certain traits of the fungus enables *C. albicans* to adapt to different environmental conditions and to colonize different host niches. Secretion of hydrolyzing enzymes, like proteinases and phospholipases, is an important characteristic of *C. albicans* which is considered to be integral to pathogenesis. The involvement of phospholipase B isoenzymes in virulence development could already be proven for caPlb1p. This study focuses on the functional characterization of a new member of the phospholipase B gene family, the *caPLB5* gene.

Furthermore, it presents the isolation and characterization of the ABC-transporter gene *caMLT1* in *C. albicans* belonging to the MRP/CFTR-subfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters, a class of proteins so far not described in this fungus. Energy-driven transport proteins within the ABC-superfamily actively transport a wide variety of substances across biological membranes and fulfill important functions in cellular metabolism and detoxification. During colonization and infection, *C. albicans* is probably exposed to many different toxic compounds. Increased resistance to these compounds contribute to a better survival of the microorganism and may account for the prevalence of certain strains.

Both genes, *caMLT1* and *caPLB5*, were inactivated by using a classical disruption method for *C. albicans* (the *URA3*-Blaster-system in Ura^- auxotrophic strain CAI4) and by developing a new dominant selection system. Dominant selection is based on genomic insertion of a single copy of a mutated *caIMH3* allele (*MPA^R*) that renders transformants resistant to mycophenolic acid (MPA). Using this system, the cumbersome generation of auxotrophic strains, which are often avirulent, is obsolete, while *C. albicans* wild-type strains become amenable to genetic manipulation.

A fragment of the *caMLT1* gene was isolated as a by-product during the screening of a genomic expression library of *C. albicans* with antisera to integrin-like molecules. To isolate the complete gene sequence, a fosmid clone harboring the entire *caMLT1* gene was isolated from a genomic library of *C. albicans* and the complete gene with flanking regions was sequenced. The protein encoded by the *caMLT1* gene shows high similarities to the vacuolar efflux-pumps yeast cadmium

factor 1 (Ycf1p) and bile pigment transporter 1 (Bpt1p) of *S. cerevisiae*. Homology searches in the *C. albicans* genome revealed at least two further open reading frames with even higher similarities to scYcf1p and scBpt1p. Nevertheless, the caMlt1-Protein possesses the structural organization of a full size MRP/CFTR-like transporter with an NH₂-terminal transmembrane extension and a central regulatory (R) domain, both described as well for scYcf1p. Genomic tagging with the green fluorescent protein (GFP) revealed vacuolar membrane localization of caMlt1p. Northern hybridisation experiments documented the inducibility of gene transcripts by the metabolic poisons cadmium and CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen), which are also substrates of the scYcf1-pump. While caMlt1p could be an orthologue of scYcf1p, complementation of a *scycf1*-negative *S. cerevisiae* mutant with a *caMLT1*-gene copy did not reverse the sensitive phenotype to these toxins. Moreover, the construction of *camlt1*-negative mutants in *C. albicans* allowed for screening of substrates putatively transported by caMlt1p. These null mutants showed no hypersensitive phenotype to neither CdCl₂ nor CDNB or any other tested inhibitory substances, hence caMlt1p is not a functional homologue of scYcf1p. The *caMLT1* mRNA expression pattern is typical for a vacuolar gene, showing an extensively growth phase dependent regulation with the highest gene induction during the diauxic transition when glucose (and other nutrients) becomes limited. Most interestingly, the *mlt1* null mutant generated in the wild-type *C. albicans* strain SC5314 with the dominant selection marker *MPA*^R showed a dramatic reduction in liver and pancreas invasion in a mouse peritonitis model. Reintegration of a functional *caMLT1* gene copy again using the *MPA*^R selection system reverted the virulence defect. CaMlt1p seems to be involved in the capability of *C. albicans* to adhere to the intestinal organs and penetrate tissue barriers putatively because of its involvement in mechanisms of stress response and detoxification.

Mapping and sequencing of the fosmid clone harboring the *caMLT1* gene revealed another ORF with high homology to fungal phospholipases. Sequence analysis of the gene, designated as *caPLB5* due to its phylogenetic relationship with the other four phospholipases B in *C. albicans*, revealed a typical catalytic domain found in lysophospholipase / phospholipase B enzymes. Therefore, the genome of *C. albicans* encodes a phospholipase B multigene family with five putative members. In contrast to the well characterized secretory PLBs caPlb1p and caPlb2p, the putative caPlb5-protein is likely to be GPI-anchored and ultimately bound to the cell wall. Furthermore, *caPLB5* encodes a serine-rich NH₂-terminal extension not found in other recently described fungal PLBs. Northern expression studies showed *caPLB5*-specific transcripts in several strains of *C. albicans* under each growth condition tested. Interestingly, differential regulation of *caPLB5*, *caPLB1* and *caPLB2* could be detected during the yeast to hyphae transition in Lee's

medium. While *caPLB5* expression strongly increased during germ tube formation, *caPLB1* and *caPLB2* expression was induced in pseudohyphal cells. Differential regulation of phospholipase B family members *in vitro* could also be crucial for invasion of different tissues in the host. Sequence analysis of single *caPLB5* alleles resulted in the identification of two different alleles in several strains of *C. albicans*. The targeted gene disruption of both alleles in two different strains - inactivation using the *URA3*-Blast-system in *Ura⁻* auxotrophic strain CAI4 and the new dominant selection *MPA^R*-marker in a wild-type isolate - resulted in attenuated virulence as measured by host tissue colonization in a mouse model of systemic infection. The phenotypes expressed by null mutants and revertant strains of *caPLB5* indicate that the phospholipase is required for complete virulence of this pathogen by playing a role for cell-associated phospholipase A2 activity and *in vivo* organ colonization.

III EINLEITUNG

1. Pilze und ihre Bedeutung in der Humanmedizin

Pilze haben als Infektionserreger des Menschen in den vergangenen Jahrzehnten gerade in den westlichen Industrieländern immer mehr an Bedeutung gewonnen (18, 86, 255). Von den geschätzten über 120.000 verschiedenen Arten wurden bisher etwa 150 als humane Krankheitserreger identifiziert, wobei diese Pilze weitgehend nur ein geringes pathogenes Vermögen aufweisen. So besteht im gesunden Organismus ein natürlicher Schutz gegen das Eindringen der Pathogene, bedingt durch die Haut und die Schleimhäute als mechanische Barrieren, durch die normale Mikroflora und nicht zuletzt durch ein aktives Immunsystem. Meist ermöglichen erst Beeinträchtigungen dieser natürlichen Barrieren die Manifestation einer Mykose (22, 76, 235).

In den vergangenen Jahrzehnten hat die Zahl abwehrgeschwächter Patienten stark zugenommen. Fortschritte in der medizinischen und chirurgischen Therapie führten zu einem veränderten Patientenbild und ließen gerade nosokomiale, also sekundär im Krankenhaus erworbene Infektionen ansteigen. So stieg nach einer Studie, die zwischen 1980 und 1990 in den USA durchgeführt wurde, der prozentuale Anteil von Pilzinfektionen an nosokomialen Infektionen von 6,0 % auf 10,4 % und die Pilzinfektionsrate von 2,0 auf 3,8 pro 1000 Entlassungen (18). Betroffen sind meist Patienten z. B. nach immunsupprimierenden Therapien bei Organtransplantationen oder onkologischen Erkrankungen. Aber auch tiefe Wunden (z. B. durch chirurgische Eingriffe oder Verbrennungen), der zunehmende Einsatz von Breitbandantibiotika und intensivmedizinischer Maßnahmen (z. B. intravenöse Katheter) begünstigen die Ausbreitung von Pilzinfektionen (18, 75, 92, 189). Zudem trug die Verbreitung des erworbenen Immun-Defekt-Syndroms AIDS zum Anstieg immunkompromittierter Patienten bei und ließ typische HIV-assoziierte Mykosen auftreten (75, 161, 253), wie z. B. die orale Candidose (verursacht durch *Candida*-Spezies, v. a. *C. albicans*) (202), die Cryptococcose (verursacht durch *Cryptococcus neoformans*) (181) und Pneumomykosen (verursacht durch z. B. *Pneumocystis carinii* u. a.) (182). Auch normalerweise endemisch begrenzte, obligat pathogene Pilzarten, wie z. B. die dimorphen Pilze *Histoplasma capsulatum* (als Erreger der Histoplasmose in den USA, Zentral- und Südamerika) (317) und *Blastomyces dermatitidis* (als Erreger der Blastomykose in den USA, Mittelamerika und Afrika) (32) oder der atypisch dimorphe Pilz *Coccidioides immitis* (als Erreger der Kokzidioidomykose in den USA) (95) können im immunsupprimierten Patienten schwere Mykosen verursachen. Gerade im Zusammenhang mit HIV-Infektionen zeigen sich oft untypische klinische Manifestationen einer

Pilzinfektion mit atypischen biologischen Parametern. Auch persistierende, klinisch asymptomatische Infektionen können bei auftretender Immunschwäche reaktiviert werden, was ein Problem bei AIDS-Patienten mit z. B. chronischer *H.-capsulatum*-Infektion darstellt (317).

Während HIV-assoziierte Pilzinfektionen aufgrund verbesserter Therapiemöglichkeiten in der Behandlung von AIDS in den letzten Jahren abnahmen (insbesondere durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren und HAART (*highly active anti-retroviral therapy*)) (97, 188), sind nosokomiale Infektionen weiterhin ein bestehendes Problem. Nosokomiale Pilzinfektionen sind meist endogen, der Erreger kommt also vom Patienten selbst und nicht exogen vom Krankenhaus (92). Bei entsprechender Disposition des Patienten können aber auch in der Natur ubiquitär vorkommende und für den Menschen wenig pathogene Pilzarten, wie z. B. Aspergillen und Zygomyceten, invasive Mykosen verursachen (z. B. Aspergillose bei Leukämie und Zygomycose (Mucormycose) bei Diabetes mellitus). Reservoirs im Krankenhaus sind hierbei z. B. Belüftungssysteme, kontaminierte Wände und kontaminierter Staub (z. B. bei Umbauarbeiten im Krankenhaus). Der weitaus größte Teil an humanen Pilzinfektionen (70 - 80 %) lässt sich jedoch auf Stämme der Gattung *Candida* zurückführen.

2. *Candida albicans* als Krankheitserreger

Zum ersten Mal wurden Hefen des Genus *Candida* 1839 durch Langenbeck mikroskopisch in der Schleimhaut eines Typhus-Patienten detektiert und dokumentiert (152). Seitdem wurde der Pilz *Candida albicans* bekannt als Erreger verschiedener, manchmal lebensbedrohlicher Krankheiten, doch wurde ihm in medizinischer oder wissenschaftlicher Hinsicht wenig Aufmerksamkeit zuteil. Erst mit fortschreitender Entwicklung medizinischer Möglichkeiten (z. B. in der Bekämpfung von Krebs und anderer tödlicher Erkrankungen) und insbesondere mit Auftritt der Retrovirusinfektion durch HIV gewannen *C. albicans* und auch andere *Candida*-Spezies immer mehr an klinischer Bedeutung.

Gegenwärtig ist die Candidämie die vierthäufigste Ursache der Septikämie, mit einer assoziierten Sterblichkeitsrate von 35 % (18, 78). Unter den *Candida*-Spezies ist wiederum *C. albicans* mit 50 - 80 % der weitaus häufigste Erreger von Candidämien, wie Studien in USA und Europa zeigten (110, 170, 209, 233, 297). Allerdings ist seit den 1980-ern eine Zunahme der Inzidenz von „nicht-*albicans*“-Spezies, wie *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* und *C. lusitaniae* zu beobachten (117, 143, 208). Als Grund für die Zunahme insbesondere der Spezies *C. glabrata* und *C. krusei* als nosokomiale Krankheitserreger wird der vermehrte Einsatz antimykotischer Therapeutika diskutiert, die die Selektion weniger empfindlicher Arten begünstigt (1, 73).

2.1 Biologie

C. albicans gehört, wie die verwandte Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, der Klasse Ascomycetes an und zählt dabei (allerdings im Gegensatz zu *S. cerevisiae*) zu den *Fungi imperfecti*. In dieser Formklasse werden Pilze zusammengefasst, denen das sexuelle Stadium fehlt bzw. in denen es noch nicht nachgewiesen wurde. So scheint sich *C. albicans* als natürlicherweise diploider Organismus asexuell zu vermehren (200). Ein sexueller Vermehrungszyklus, wie er bei *S.-cerevisiae*-Zellen durch den *mating type locus* (*MAT*) reguliert wird, galt als nicht existent. Erst 1999 zeigten Gesamtgenomsequenzierungen, dass *C. albicans* einen *mating type like locus* (*MTL*) besitzt (126). Genetische Manipulationen des *MTL*-Lokus zeigten, dass *mating* in *C. albicans* zwischen *a/-* und *α/-* Zellen generell möglich ist und dass dieser Prozess zudem mit dem *phenotypic switching* (s. u.) zwischen *white*- und *opaque*-Zellen korreliert ist. Weitere Studien machten deutlich, dass *mating* tatsächlich in *C. albicans* natürlicherweise, wenn auch selten, vorkommt, wobei der umfassende *mating*-Prozess mit Wiederherstellung der Diploidität der entstandenen tetraploiden Heterozygote (*a/a/α/α*) (20) noch nicht vollständig geklärt ist (anders als bei *S. cerevisiae* konnte Meiose bei *C. albicans* bislang nicht dokumentiert werden; für eine Übersicht zum *mating*-Prozess in *C. albicans* siehe (262)).

Das haploide Genom von *C. albicans* besteht aus ca. 16 Megabasenpaaren, die auf acht Chromosomen verteilt sind. *C. albicans* kommt als dimorpher Pilz in verschiedenen morphologischen Wachstumsformen vor: (1) als isotrop wachsende, ovalförmige Hefe, die sich durch Knospung vermehrt (Blastospore oder Blastokonidie); (2) als echte Hyphe mit apikalem Wachstum und die Zellkerne trennender Septenbildung; (3) oder als Pseudohyphe, wobei die knospenden Blastosporen an der Mutterzelle haften bleiben, eine längliche Form annehmen und Ketten bilden, die oft nur schwer von echten Hyphen zu unterscheiden sind. Von allen charakterisierten *Candida*-Spezies vermögen nur *C. albicans* und die erst kürzlich beschriebene und nah verwandte Spezies *C. dubliniensis* durch Ausbildung von Keimschläuchen als echte Hyphe zu wachsen (200, 279). Die Hyphenbildung in *C. albicans* wird durch eine Vielzahl an externen Signalen gesteuert, wie z. B. Serum, Nährstoffmangel (z. B. schwer zugängliche C- und N-Quellen), Temperatur- und pH-Anstieg. Es wird auch diskutiert, dass *in vivo* exogene Wirtssignale, wie z. B. menschliche Hormone, Einfluss auf die Morphologie von *C. albicans* nehmen könnten (33). Unabhängig von äußeren Signalen scheint der Prozess des *phenotypic switching* zu sein. Er beschreibt die teils dramatische aber reversible Änderung in Koloniemorphologie und zellulärer Eigenschaft, die spontan und mit relativ hoher Frequenz in *C.-albicans*-Stämmen auftreten kann (260).

2.2 Epidemiologie

Als kommensale Hefe ist *C. albicans* im mikrobiellen Schleimhautökosystem des Gastrointestinaltrakts des Menschen und auch im vulva-vaginal Bereich gesunder Frauen gegenwärtig (200). Der Kolonisationsgrad im gesunden Organismus ist normalerweise limitiert, wobei Keimzahlen von 10^3 - 10^4 cfu/g oder ml gefunden werden können (22). Der menschliche Organismus stellt damit selbst ein großes Reservoir für *C.-albicans*-Infektionen dar. So sind die meisten *C.-albicans*-Mykosen auch endogenen Ursprungs, denen eine Kolonisation des Mundes, des Darms, der Vagina oder der Haut vorausgeht. Molekulare Stammtypisierungen zeigten, dass infektiöse *Candida*-Stämme identisch waren zu denen, die zuvor denselben Patienten kolonisiert hatten (92, 322). Hier bleibt jedoch anzumerken, dass noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es stets die Kommensalen der Normalflora sind, die bei entsprechender Disposition des Wirts Infektionen auslösen oder ob es *C.-albicans*-Stämme gibt, die im Falle einer Infektion als Pathogene in den Vordergrund treten (248). Auch eine exogene Übertragung des opportunistischen Erregers, z. B. von Patient zu Patient oder von Pflegepersonal zu Patient, ist nicht auszuschließen, wobei gerade die Hände des Pflegepersonals in Krankenhäusern ein potentiell Reservoir für *Candida*-Spezies, besonders für *C. parapsilosis* bei Frühgeborenen, darstellen (207, 298).

2.3 Klinische Manifestation und Therapiemöglichkeiten

Die *C.-albicans*-Infektion kann in Abhängigkeit von prädisponierenden Faktoren als oberflächliche, lokale Infektion auftreten oder systemisch verlaufen durch Dissemination des Erregers über die Blutbahn mit anschließender Invasion der inneren Organe. Die oberflächliche, lokale Infektion tritt dabei gehäuft z. B. nach Antibiotika-Therapie auf oder bei Patienten mit Diabetes oder HIV-Infektion (53, 112). Hierbei kommt es zu Infektionen der Schleimhäute im Mund- und Rachenraum (Soor-Bildung), der Vagina oder zu Infektionen der Haut. Die orale Candidose ist ein typisches Frühsymptom der HIV-Infektion (84, 137), die nach wiederholten antimykotischen Therapien oft rekurrent ist. Interessanterweise ist bei AIDS eine hämatogene Streuung des Erregers und damit eine invasive *Candida*-Infektion selten. HIV-Patienten mit disseminierter Candidose weisen in der Regel noch zusätzliche Risikofaktoren auf, wie z. B. zentralvenöse Katheter oder Einnahme von Medikamenten, die Neutropenie induzieren können (86). Invasive Mykosen treten dagegen gehäuft z. B. bei Patienten mit akuter Leukämie oder Lymphomen auf, sowie nach Organtransplantationen und immunsupprimierender Medikamentengabe (92, 112). Das klinische Erscheinungsbild einer Candidämie kann stark variieren und reicht von Arthritis, Pneumonitis, Endocarditis, Peritonitis, Pyelonephritis, Leber- und Milzabszessen bis hin zu einem Multiorganbefall.

Für die Behandlung oberflächlicher und tiefer Pilzmykosen stehen heute eine begrenzte Auswahl an Fungiziden und Fungistatika zur Verfügung. Derzeit sind Antimykotika aus vier Stoffklassen im klinischen Gebrauch: Polyene (z. B. Amphotericin B und Nystatin), Azole (z. B. Fluconazol, Ketoconazol und Itraconazol), Allylamine (z. B. Terbinafin) und Fluoropyrimidine (z. B. 5-Fluorocytosin) (99, 309). Leider manifestieren sich zunehmend Resistenzen gegen die zur Zeit verfügbaren Antimykotika. Neue antimykotisch wirkende Substanzen sind in der Entwicklung (100, 192), doch wird die Behandlung von Pilzerkrankungen dadurch erschwert, dass die Pilze als Eukaryonten mit dem Wirtsorganismus zelluläre Gemeinsamkeiten aufweisen. Somit sind mögliche Ansatzpunkte für den selektiven Angriff von Medikamenten begrenzt und Substanzen, die für die Pilzzelle toxisch sind, erzeugen oft auch erhebliche Nebenwirkungen im Patienten.

2.4 Wirtsabwehrmechanismen

Sowohl die unspezifische (angeborene) als auch die erworbene humorale und zelluläre Immunabwehr sind in die Resistenz gegen Candidiasis involviert. Die vielen verschiedenen Krankheitsbilder (kutane, mukosale, mukokutane und systemische Infektionen), die *C. albicans* hervorrufen kann, können oft mit einem bestimmten Immundefekt assoziiert werden. So ist ein Defekt in der T-Zell-vermittelten Immunität prädisponierend für das Auftreten einer mukosalen Candidose, wohingegen gerade bei Granulozytopenie *C. albicans* in die inneren Organe absiedeln und systemische Infektionen verursachen kann (84). Polymorphkernige Granulozyten (Neutrophile) und mononukleäre Zellen (Monozyten und Makrophagen) sind in erster Linie Teil der unspezifischen Immunabwehr und stellen im Gewebe eine erste Barriere der Wirtsabwehr gegen *Candida*-Spezies dar. Sowohl opsonierte als auch nicht-opsonierte *C.-albicans*-Zellen werden von den Abwehrzellen gebunden und phagozytiert (174). Das *Killing* der phagozytierten Hefezellen erfolgt dann über Sauerstoff-abhängige Mechanismen, wie z. B. Wasserstoffperoxyd, Sauerstoffradikale, NO und Peroxynitrit, sowie über Sauerstoff-unabhängige Mechanismen, wie kationische und nicht-kationische lysosomale Proteine (50, 286). Auch extrazelluläre Mechanismen werden beschrieben, die anscheinend gerade in der Elimination der Hyphen eine wichtige Funktion ausüben (27). So sind Hyphen sehr groß und können nur schlecht phagozytiert werden. Zudem scheinen sie resistenter gegenüber Angriffen von Makrophagen zu sein als Blastokonidien (26, 60). Schließlich kann ein Auskeimen der Hefezellen zu Hyphen nach Aufnahme durch Phagozyten sogar zu deren Zerstörung führen (9, 200). Als Effektorzellen für das Hyphen-*Killing* scheint vor allem den Neutrophilen eine besondere Bedeutung zuzukommen (71, 72, 129).

Als Schutz vor eindringenden Pilzerregern wird auch die inhibitorische Wirkung teils extrazellulär vorliegender antimikrobieller Substanzen diskutiert, wie z. B. Lactoferrin und Lysozym, die

natürlicherweise in Körperflüssigkeiten oder auf Schleimhautoberflächen vorhanden sind (132, 197, 237, 287). Genkodierte, antibiotische Peptide sind in höheren Eukaryoten – wie Pflanzen, Insekten, Amphibien aber auch Menschen (z. B. Defensine, Histatine) – weit verbreitet und haben ein breites Aktivitätsspektrum (96). Meist handelt es sich um kationische, amphiphatische Moleküle, die weniger als 100 Aminosäuren umfassen und Mikroben zerstören können, indem sie deren Zellmembran destabilisieren und/oder in die Mikrobenezelle eindringen und intrazellulär Schaden verursachen. Für einige dieser antimikrobischen Peptide, z. B. Calprotectin (259), verschiedene Defensine und kationische Peptide (157), Histatine (204, 318) und PMP (*platelet microbicidal protein*) (320) konnte eine inhibitorische Wirkung auch auf pathogene Pilze wie *C. albicans* nachgewiesen werden. Jüngste Veröffentlichungen zeigten zudem, dass epitheliale Oral- und Vaginalzellen über eine natürliche Anti-*Candida*-Aktivität verfügen (272, 274), die unabhängig von löslichen Faktoren scheinbar auf membranassoziierten Kohlenhydraten basiert (273).

Über das Zusammenspiel einzelner Wirtsabwehrmechanismen gegen *C. albicans* ist bislang nur wenig bekannt. Die Immunität gegenüber *Candida* scheint dabei je nach Infektionsort zu varriieren: Verschiedene mukosale Gewebe weisen unterschiedliche protektive Wirtsabwehrmechanismen auf (83) und auch während fortschreitender, zirkulierender Infektion kommen *C.-albicans*-Zellen mit unterschiedlichen Subpopulationen des humanen Immunsystems (z. B. mononukleare phagozytische Zellen verschiedener Gewebe, wie z. B. peritoneale Makrophagen, Kupffer-Sternzellen, alveolare Makrophagen und Makrophagen der Milz u. a. m.) in Kontakt, die zum Teil unterschiedliche immunologische Fähigkeiten aufweisen (222, 229). Auch sind die Wachstumsbedingungen, wie Nährstoffangebot oder pH-Wert, je nach anatomischer Lokalität im Wirt verschieden. Die Pilzzellen müssen sich sozusagen für Aufrechterhaltung und Fortführung einer Infektion an verschiedene „Mikroumwelten“ anpassen und sich in ihnen behaupten können. So verfügen pathogene *Candida*-Spezies gegenüber apathogenen Arten über Faktoren, die ihnen die Besiedlung verschiedener Wirtsgewebe und die Anpassung an die dort vorherrschenden Mikromilieus ermöglichen und nicht zuletzt vor den Abwehrmechanismen des Wirts schützen (249).

3. Virulenzassoziierte Eigenschaften von *C. albicans*

Bevor bestimmte Eigenschaften der opportunistischen Hefe *C. albicans* als Pathogenitätsfaktoren dargestellt werden, ist es wichtig nochmal die Dualität von *C. albicans* hervorzuheben, sowohl als Kommensal auf Schleimhäuten als auch als Humanpathogen aufzutreten. Für einen solchen

Mikroorganismus ist es schwer Virulenz als solches zu definieren, da für das Leben als kommensale Hefe Eigenschaften wichtig sein können, die auch für ein pathogenes Auftreten notwendig sind (z. B. Nährstoffgewinnung und Adhärenz an Wirtszelloberflächen). So ist wahrscheinlich, dass dieselben Mechanismen, die die Persistenz der Hefe auf den Schleimhäuten ermöglichen, bei entsprechender Disposition des Wirts auch für die Entstehung invasiver *Candida*-Mykosen verantwortlich sind. Hierbei scheint die Pathogenität durch ein koordiniertes, Millieu bedingtes Zusammenspiel vieler Faktoren gegeben zu sein, mehr als durch einzelne dominierende Virulenzfaktoren.

In den letzten Jahren ist sehr viel dazu beigetragen worden diese virulenzassoziierten Faktoren näher zu charakterisieren (für Übersichtsartikel siehe (37, 59, 191)). So ist die Fähigkeit von *C. albicans* an verschiedene Oberflächentypen zu adhären (wie z. B. an Epithelzellen, Endothelzellen und ECM-Komponenten) Voraussetzung für die Besiedlung von Geweben und zudem positiv mit der Pathogenität korreliert (23, 36). Die Fähigkeit zwischen verschiedenen morphologischen Zell- und Kolonieförmungen zu wechseln (Dimorphismus und *phenotypic switching*) leistet ebenfalls einen wichtigen Beitrag in der Pathogenese von *C. albicans*. So treten sowohl die hefeförmige als auch die filamentöse Wachstumsform bei Infektionen im Gewebe auf (200) und Untersuchungen zeigten, dass für die volle Ausprägung der Virulenz dieses Pilzes beide Fähigkeiten als Hefe und als Hyphe wachsen zu können notwendig sind (57, 165). Vermutlich ermöglicht gerade der Wechsel zwischen verschiedenen Wachstumsformen und Zelltypen die Anpassung von *C. albicans* an verschiedene Mikronischen im Wirt. Hierbei geht mit der Gestaltänderung auch ein Wechsel zellulärer Eigenschaften einher, wie z. B. die Adhärenz, die Sekretion hydrolytischer Enzyme oder Änderungen in der Antigenität oder Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen (59, 125, 201, 261). Nicht zuletzt ist die Fähigkeit hydrolytische Enzyme wie Proteasen und Phospholipasen zu sekretieren eng mit der Virulenzausprägung in *C. albicans* korreliert (siehe Abschnitt 2.2). Da *C. albicans* im Verlauf einer Kolonisation und Infektion auch mit einer Vielzahl an inhibitorischen Substanzen (wirtseigene, aber auch therapeutische Substanzen) konfrontiert wird, sind resistenzvermittelnde Mechanismen für die Pathogenität des Opportunisten ebenfalls wichtig.

3.1 Identifikation virulenzassoziiierter Faktoren in *C. albicans* durch Gendelektionsmethoden

Der Durchbruch in der Identifizierung von Genen, die mit Virulenzeigenschaften des Hefepilzes in Zusammenhang stehen, erfolgte mit der Entwicklung verschiedener Transformationsmethoden

(Spheroplast-PEG, Lithium Acetat und Elektroporation) und Mutageneseprotokollen für *C. albicans* (61). Um auf Ebene der Molekularbiologie das allgemein gültige Koch'sche Postulat zu erfüllen (81), ist es nötig zum Beweis einer Virulenzassoziation eines bestimmten Gens, dieses zu deletieren. Die konstruierten Mutantenstämme sollten im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage sein Infektionen auslösen zu können oder zumindest in ihrer Virulenz in einem Modellsystem signifikant eingeschränkt sein. Hierbei ist anzumerken, dass der Ausgang eines solchen Experiments von der Wahl des Tier- und Infektionsmodells abhängt. Letztlich sollte die Wiedereinbringung des Gens in die Mutante den wildtypischen Virulenzphänotyp wieder herstellen.

Die genetische Manipulation ist in *C. albicans* mit einigen Schwierigkeiten verbunden, die sich zum Teil in der konstitutiv diploiden Natur des Pilzes begründen (im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist kein natürlich vorkommender haploider Zellzyklus bei *C. albicans* bekannt). So müssen für die Konstruktion von Nullmutanten mindestens zwei Allele eines Gens inaktiviert werden. Auch die Expression artfremder Gene, z. B. als Selektionsmarker zeigt sich problematisch, da *C. albicans* gemeinsam mit den meisten *Candida*-Spezies über einen untypischen Codon-Gebrauch verfügt. Durch den Einsatz einer speziellen tRNA wird nämlich „CUG“ in die Aminosäure Serin und nicht wie üblich in Leucin dekodiert (244). Letztlich zeigt sich diese humanpathogene Hefe gegenüber vielen, in anderen eukaryotischen Organismen zur Selektion verwendeten Substanzen (z.B. G418, Cyclohexamid, Hygromycin B, Methotrexat und Methioninsulfoxid) als natürlich resistent. Mangels eines dominanten Selektionsmarkers zur genetischen Manipulation von *C. albicans* wurde bislang auf auxotrophe Stämme zurückgegriffen. Hierbei etablierte sich eine von Fonzi und Irwine beschriebene Methode, der sogenannte „*URA3*-Blaster“ (87). Diese Technik beruht auf einem von zwei *Salmonella typhimurium hisG*-Wiederholungen flankiertem ca*URA3*-Selektionsmarkergen, das in einen für Uridin auxotrophen *C.-albicans*-Stamm (z. B. CAI4) transformiert wird. Die Flankierung dieser *hisG-URA3-hisG*-Kassette mit 5'- und 3'-Sequenzen des Zielgens, in dem die Insertion stattfinden soll, ermöglicht eine chromosomale Integration am Zielort durch homologe Rekombination. Nach erfolgter Transformation und Selektion prototropher Transformanten werden einzelne Klone isoliert und auf ein Medium transferiert, das 5-Fluor-Orotidylsäure (FOA) enthält, ein Antimetabolit für die Orotidin-5'-Monophosphat-(OMP)-Decarboxylase (*Ura3p*) (28). Zellen, die durch intrachromosomale homologe Rekombination der direkten *hisG*-Wiederholungen den *URA3*-Marker spontan (ca. $1/10^5$ Zellen) wieder verloren haben, können auf FOA-Medium wachsen. Diese, für ein Allel des zu deletierenden Zielgens heterozygoten, *URA3*-negativen Klone

werden zur Herstellung homozygoter Mutanten in einer weiteren Transformationsrunde mit der *URA3*-Blaster-Kassette eingesetzt.

Schon bald nach Einführung der *URA3*-Blaster-Methode wurden verschiedentlich abgewandelte und/oder verbesserte Strategien dieser Technik veröffentlicht (61). Die Anwendung einer genetisch angepassten FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae*, in der drei CTG-Codons gegen TTG ausgetauscht wurden (*caFLP* (269)), zur Herstellung von Deletionsmutanten stellte eine weitere Verbesserung der Mutagenesestrategie dar. In der sogenannten „*URA3*-Flipper“-Methode (184) flankieren Zielsequenzen der Rekombinase die *URA3*-Selektionsmarker-Kassette. Durch eine konditionale Expression des *caFLP*-Gens kann die Exzision effizient induziert werden: Die Frequenz mit der der Marker aus dem Genom von *C. albicans* durch die FLP-vermittelte Exzision entfernt werden kann ist mit ca. 10^{-1} wesentlich höher als bei homologer Rekombination direkter Sequenzwiederholungen.

Trotz dieser erfolgreichen Mutagenesetechnik basierend auf dem *caURA3*-Gen als Marker gibt es doch einige Einschränkungen, die die Entwicklung neuer Selektionsmarker wünschenswert macht (153). So können genetische Studien nur an den wenigen vorhandenen *Ura⁻*-Stämmen durchgeführt werden, was einerseits den Vergleich von Daten zwischen verschiedenen Labors einfach macht, aber andererseits die Wahl eines anderen Stammes und damit eines anderen spezifischen genetischen Hintergrunds unmöglich macht. Die genetische Manipulation von klinischen Isolaten mit wildtypischem Genotyp ist mit der *URA3*-Blaster-Technik nicht möglich. Darüberhinaus nehmen viele metabolische Gene, wie z. B. *URA3* oder *ADE2*, auch Einfluss auf die Virulenz von *C. albicans* (16). So ist auch der meistverwendete *Ura⁻*-Stamm CAI4 in seiner Virulenz stark reduziert und kann nur ungenügend als valide isogene Kontrolle *in vivo* genutzt werden (auch wenn

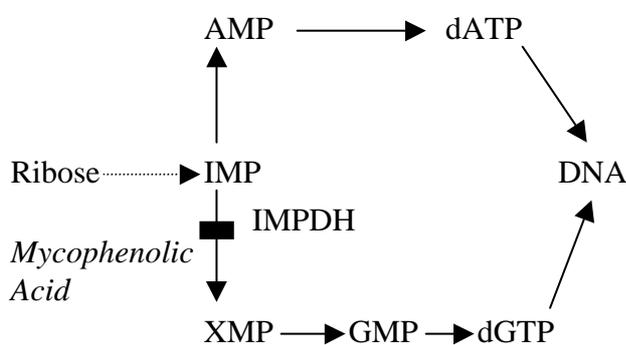


Abbildung 1: **Purinmetabolismus.** Das Schlüsselenzym des Purinbiosynthesewegs, die IMP-Dehydrogenase (IMPDH), kann spezifisch durch die Mykophenolsäure gehemmt werden.

Ura⁺-Stämme verwendet werden (153, 281)). Die Isolation eines Inosinmonophosphat-(IMP)-Dehydrogenase-Gens (*IMH3*) aus *C. albicans*, das bei Überexpression Resistenz gegenüber Mykophenolsäure (MPA) verleiht (141), eröffnete die Möglichkeit zur Entwicklung eines neuen Markersystems. Die IMP-Dehydrogenase (EC 1.1.1.205) katalysiert die NAD-abhängige Oxidation von IMP zu Xanthin-5'-Monophosphat (XMP), dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der

Guanosinbiosynthese (Abbildung 1). Das Enzym kann spezifisch durch MPA, ein von verschiedenen *Penicillium* Arten gebildetes Antibiotikum, gehemmt werden (89). Die Enzymhemmung führt zu einem Stop der DNA- und RNA-Synthese und somit zu einem Wachstumsstop sensibler Zellen. Während *S. cerevisiae* vier Gene (*scIMD1 - 4*) besitzt, die für eine IMP-Dehydrogenase kodieren, wiesen Deletionsstudien darauf hin, dass *C. albicans* nur über ein zu *scIMD3* homologes Gen verfügt (21). Das *caIMH3*-Gen codiert für 521 Aminosäuren und setzt sich aus zwei Exons (+1 bis +451 und +699 bis +1814) zusammen, die durch ein 248 bp umfassendes Intron getrennt sind (141). Wenigstens zwei Allele (2,7 kb und 2,9 kb) dieses Gens sind in *C. albicans* beschrieben worden (G. Köhler, persönliche Mitteilung; (17)). Die beiden Allele unterscheiden sich vor allem in einer ca. 200 bp großen Sequenz, die nur im nichtkodierten 3'-terminalen Bereich des 2,9 kb umfassenden Allels liegt und ein potentielles Retrotransposonelement, LTR-(*long-terminal-repeat*)-Element (106), darstellt. Die Entdeckung einer MPA-resistenten Variante des 2,7-kb-*IMH3*-Allels (*MPA^R*) (G. Köhler, persönliche Mitteilung) bildete den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines dominanten *MPA^R*-Markersystems, was Teil der vorliegenden Arbeit war und zur Herstellung zweier Gendeletionsmutanten mit ansonsten zum Wildtyp isogenen Hintergrund führte. Inzwischen konnte der *MPA^R*-Marker außer zur Herstellung von Gendeletionen auch schon erfolgreich als Reportergen eingesetzt werden (269, 312).

3.2 Sekretion hydrolytischer Enzyme

3.2.1 Die *SAP*-Genfamilie

Die wohl am besten charakterisierten Enzyme, die in Abhängigkeit der Pilzzellmorphologie und auch externer Signale in *C. albicans* differentiell exprimiert werden sind die Sekretorischen Aspartyl-Proteasen (SAPs). Diese *SAP*-Genfamilie besteht aus zehn Mitgliedern (*SAP1 - 10*), deren Funktionen vermutlich durch Hydrolyse wirtseigener Proteine bzw. Peptide in der Bereitstellung von Nährstoffen, in der Adhärenz an und Invasion von Wirtszellen sowie in der Abwehr der Attacken des Wirtsimmunsystems liegen (125).

Das Vorhandensein von zehn mehr oder weniger nahe verwandter Proteinasen in *C. albicans* lässt vermuten, dass die verschiedenen SAPs für unterschiedliche Funktionen und Zielstrukturen während des Infektionsprozesses vom Erreger eingesetzt werden könnten. Tatsächlich zeigten *in vitro* Untersuchungen einzelner SAPs leichte Unterschiede in Substratspezifität, Temperaturstabilität und pH-Optimum (140, 257). Auch werden die Isoenzyme *in vitro* differentiell exprimiert (125). Verschiedene Studien demonstrierten den Zusammenhang zwischen *SAP*-Genexpression und Virulenz bei *C. albicans* und machten die differentielle Expression der

SAP-Gene in verschiedenen Infektionstypen und während verschiedener Infektionsstadien deutlich (246, 247, 266, 269). Mehr noch, jüngste Studien mit verschiedenen murinen Candidose-Modellen zeigten, dass einige *SAP*-Gene während des gesamten Infektionsprozesses exprimiert werden, wohingegen die Expression anderer nur zeitweise nachgewiesen werden kann (145, 227). So könnten einige *SAP*s nur an bestimmten Stufen des Infektionsprozesses von Bedeutung sein, während andere je nach Infektionsmodell eine tragende Rolle in Etablierung, Aufrechterhaltung und Fortführung einer Infektion spielen. Auch synergistische Effekte einiger Proteinasen während bestimmter Infektionsprozesse (82) sowie kompensatorische Mechanismen sind beschrieben worden (245). Jüngste Untersuchungen zeigten, dass Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle in der Zellmorphogenese und Virulenzausbildung von *C. albicans* spielen auch in die Regulation einzelner *SAP*-Gene involviert sind (82, 252). Es ist vorstellbar, dass Schlüsseltranskriptionsfaktoren in Antwort auf lokale Umweltänderungen die Expression einzelner *SAP*-Gene auch mit denen anderer virulenzassoziierten Faktoren koordinieren könnten um so eine bestmögliche Adaptation zu erreichen.

3.2.2 Phospholipasen

Neben den extrazellulären Proteinasen sekretiert *C. albicans* auch verschiedene Phospholipasen, deren Beiträge zur Pathogenese dieses opportunistischen Erregers diskutiert werden (Übersicht in (102)). Die Bezeichnung „Phospholipasen“ umfasst eine weit verbreitete, heterogene Gruppe von Enzymen, deren Mitglieder Esterverbindungen in Glycerophospholipidmolekülen spalten können. Man unterscheidet verschiedene Phospholipasetypen, die je nach ihrer hydrolytischen Eigenschaft mit den Buchstaben A₁, A₂, B, C und D definiert werden und deren Aktionsstellen in Abbildung 2 a dargestellt sind. So entsteht z. B. bei der Hydrolyse eines Phospholipids durch die Phospholipase A₁ (PLA₁, EC 3.1.1.32) oder A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) freie Fettsäure und 2-Acyl-Lysophospholipid oder, bei PLA₂-Hydrolyse, 1-Acyl-Lysophospholipid. Die noch an das Lysophospholipid gekoppelte Fettsäure kann durch ein weiteres Enzym, die Lysophospholipase (EC 3.1.1.5), abgespalten werden (Abb. 2 b). Lysophospholipaseaktivität weist z. B. die Phospholipase B auf, ein Enzym, dessen Nomenklatur verwirrt und oft nicht einheitlich verwendet wird. Streng genommen steht die Bezeichnung Phospholipase B (PLB) für ein Enzym, das in Phospholipiden die Acylesterverbindung von C₁- und C₂-gekoppelten Fettsäuren hydrolysieren kann. Pilze können aber über ein PLB-Enzym verfügen, das mehrere Aktivitäten aufweist: Zum einen ermöglicht die hydrolytische Aktivität die Abspaltung der Fettsäureketten sowohl von Phospholipiden (PLB-Aktivität) als auch von Lysophospholipiden (LP-Aktivität), zum anderen führt die Lysophospholipase-Transacylaseaktivität (LPTA) zur Bildung von Phospholipiden und

zwar durch den Transfer einer freien Fettsäure an ein Lysophospholipid oder einer Acylkette eines Lysophospholipids auf ein anderes (Abb. 2 b). Die Tatsache, dass Typ B Phospholipasen alle drei Aktivitäten aufweisen, konnte z. B. für aufgereinigte Enzyme aus den Stämmen *S. cerevisiae* (313, 314), *Cryptococcus neoformans* (44) und *C. albicans* (180) gezeigt werden. Spätere Klonierungen und Mutagenesen dieser PLB-kodierender Gene bestätigten diese Beobachtungen (56, 155, 158).

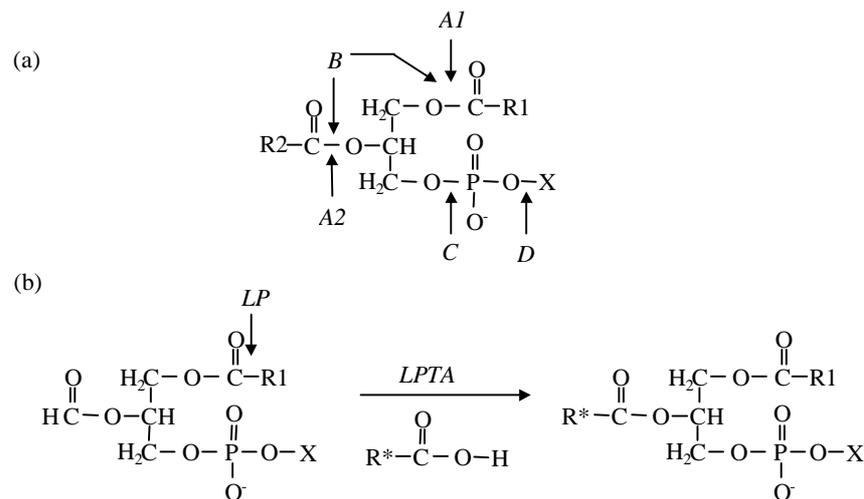


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Aktivitäten verschiedener Phospholipasen.** Die Aktionsstellen der Phospholipase A1, B, A2, C und D (a) sowie der Lysophospholipase (LP) (b) sind mit einem Pfeil angezeigt. Die Lysophospholipase-Transacylaseaktivität (LPTA) führt zur Bildung eines Diacylphospholipids (b). Die Abbildung wurde, leicht abgewandelt, entnommen aus (56).

Phospholipasen sind in den Phospholipidmetabolismus involviert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler zellulärer Prozesse in Säugetierzellen und in niederen Eukaryonten. PLA₂ zählt ebenso wie PLD (EC 3.1.4.4) und die Phosphoinositid-spezifische PLC (EC 3.1.4.3) zu den signalaktivierten Phospholipasen in Säugetierzellen, die, involviert in Lipidsignalwege (74, 104), gemeinsam mit Lipidkinasen wichtige Funktionen in der Zellregulation ausüben. Extrazelluläre Phospholipasen sind aber auch an der Virulenzausbildung vieler mikrobieller Pathogene beteiligt. Mikrobielle Phospholipasen greifen durch Phospholipidhydrolyse die Stabilität von Wirtszellmembranen an, was zu deren Lyse und zur Penetration des Mikroorganismus führen kann. Eine Beteiligung an Lyse und Penetration von Wirtszellmembranen wurde beschrieben für z. B. bakterielle Phospholipasen bei *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* (263) oder Phospholipasen der Protozoen *Toxoplasma gondii* (234) und *Entamoeba histolytica* (166, 219). Interessanterweise variiert je nach Organismus der an der Virulenzausbildung beteiligte Phospholipasetyp. Zum Beispiel sekretiert *Listeria monocytogenes* zwei PLCs, die nach Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle am Entkommen aus dem primären

Phagosom (durch die Inositol-spezifische PI-PLC, kodiert durch *plcA*) und für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (durch PC-PLC mit breiter Substratspezifität, kodiert durch *plcB*) mit verantwortlich sind (256). Dagegen scheint bei *Toxoplasma gondii* eine Calcium-abhängige Phospholipase A2 in den Prozess der Wirtszellpenetration involviert zu sein (234).

Die Sekretion extrazellulärer Phospholipasen bei *C. albicans* wurde zuerst in den 1960-ern durch Costa und Mitarbeitern (55) und Werner (305) beschrieben. Sie analysierten die Lipidspaltprodukte, die sich nach Wachstum der Hefe auf Eigelb- oder Lecithin-haltigen Agarplatten um die Kolonien in Form von Präzipitathöfen bildeten. Price und Mitarbeiter veröffentlichten 1982 eine Eigelbagar-Plattenmethode zur Detektion von Phospholipaseaktivität bei *C. albicans*, die bald als traditionelle, initiale *Screening*-Methode für Phospholipaseproduktion bei *Candida*-Spezies (115, 151, 236, 310) und anderen Pilzen, wie z. B. *Cryptococcus neoformans* (43) galt. Diese frühen Untersuchungen ergaben, dass nur *C. albicans*, nicht aber andere *Candida*-Spezies extrazelluläre Phospholipase bildeten (223, 236). Spätere Studien zeigten jedoch, dass auch Stämme von „nicht-albicans“-Spezies, wie z. B. *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* und *C. krusei*, Phospholipaseaktivität aufweisen, wenn auch in signifikant geringerem Maße als *C.-albicans*-Stämme (102). Erste Hinweise auf eine Rolle sekretierter Phospholipasen in der Pathogenese von *C. albicans* lieferten Untersuchungen, die zeigten, dass Blutisolate signifikant mehr extrazelluläre Phospholipaseaktivität aufwiesen als kommensale Stämme (Ibrahim, 1995 #287). Die Studie zweier, in ihrer Virulenz unterschiedlicher klinischer Isolate ergab hinsichtlich untersuchter Virulenzfaktoren einen signifikanten Unterschied nur in der vermehrten Phospholipaseaktivität des invasiven Stammes (127). Barrett-Bee und Mitarbeiter lieferten den ersten Hinweis darauf, dass die Bildung extrazellulärer Phospholipasen in die Adhärenz von *C. albicans* an Wirtszellen involviert sein könnte: Die *C.-albicans*-Isolate, die die höchsten Phospholipaseaktivitäten aufwiesen, adhärten am stärksten an epitheliale Zellen und waren im Mausmodell auch virulenter (15).

Obwohl diese Studien eine Korrelation zwischen Phospholipaseexpression und Virulenzverhalten von *C.-albicans*-Stämmen implizieren, gilt es doch, dies anhand isogener Stämme zu belegen, die sich ausschließlich in ihrer Phospholipaseproduktion unterscheiden. Diese idealerweise molekulargenetisch konstruierten Stämme können dann *in vitro* auf ihre Eigenschaften und *in vivo* auf ihr Verhalten im Tiermodell während der Infektion untersucht werden.

1998 gelang zwei Arbeitsgruppen parallel die molekulare Klonierung eines Phospholipase B kodierenden Gens (*caPLB1*) aus *C. albicans* (122, 158). Die von *caPLB1* abgeleitete

Proteinsequenz zeigte eine signifikante Homologie zu Plb1p von *S. cerevisiae*, unterschied sich von diesem Enzym aber vor allem durch die Abwesenheit einer COOH-terminalen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankersequenz. Die Mutagenese von *caPLB1* zeigte, dass die acylhydrolytische Aktivität im konzentrierten Kulturüberstand sehr stark reduziert war (158). Die dennoch vorhandene Restaktivität von 1 % PLB- und 10 % LP-Aktivität ließ die Anwesenheit von mindestens einer weiteren sekretierten Acylhydrolase in *C. albicans* vermuten. Zudem zeigte die Sequenzierung des *S.-cerevisiae*-Genoms, dass dieser, zu *C. albicans* sehr nah verwandte Organismus, über mindestens drei PLB kodierende Gene verfügt. So konnte auch ein zweites PLB-Isoenzym kodierendes Gen (*caPLB2* (278)) in *C. albicans* identifiziert und kloniert werden; sowie weitere Gene, die für Enzyme anderer Phospholipasetypen kodierten: ein PLD-kodierendes Gen (*caPLD* (124)) sowie ein PLC-kodierendes Gen (*caPLC1* (19)).

Eine Beteiligung von Phospholipase-B-Isoenzymen an der Virulenzausbildung von Pilzen konnte für caPlb1p sowie für PLB von *Cryptococcus neoformans* (cnPlb1p) nachgewiesen werden. Während die in *caPLB1* oder in *cnPLB1* mutierten *C.-albicans*- oder *C.-neoformans*-Stämme verglichen zu den Wildtypen *in vitro* deutlich verringerte extrazelluläre Phospholipaseaktivitäten aufwiesen, zeigten beide Mutanten *in vivo* attenuierte Virulenz in verschiedenen Tierexperimenten (56, 158, 186). *C.-albicans*-Stämme, in denen *caPLB1* mutiert wurde, waren im systemischen Mausmodell in ihrer Virulenz um 50 % (heterozygote Mutante) und 60 % (Nullmutante) abgeschwächt (158). Keimschlauchbildung *in vivo* sowie Adhärenz an Epithel- und Endothelzelllinien schienen durch die *caPLB1*-Mutagenese nicht beeinflusst zu werden, jedoch war die Fähigkeit Wirtszellen zu penetrieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (158, 186). Der Nachweis der *in vivo* Expression eines möglichen Virulenzfaktors im infizierten Gewebe kann einen weiteren Hinweis für seine Bedeutung in der Pathogenese des Erregers liefern. Mittels verschiedener Nachweismethoden (indirekte Immunofluoreszenz, immunoelektronische Mikroskopie (186) und RT-PCR (227)) gelang es eine Sekretion von caPlb1p im infizierten Gewebe und auch in Seren von Patienten mit systemischer Candidose (102) nachzuweisen. Dabei ließen sich in einem gastrointestinalen Infektionsmodell caPlb1p-Antigene sowohl um Blastosporen als auch um Hyphen nachweisen (186).

Zusammengefasst weisen diese Studien darauf hin, dass caPlb1p die Virulenz von *C. albicans* durch direkte Schädigung der Wirtszellmembran fördern könnte. Weitere Funktionen der Phospholipase-B-Isoenzyme (caPlb1p und caPlb2p) sind denkbar und werden diskutiert: So z. B. ihr Beitrag zur Adhärenz des Pilzes an Zelloberflächen durch Modifizierung der Membranphospholipide der Wirtszelle oder ihr Einfluss auf den Wirtszellmetabolismus durch

entstehende Phospholipidprodukte, die über Signaltransduktionswege Zellantworten auslösen könnten (102). Zudem konnte für mikrobielle Phospholipasen gezeigt werden, dass sie die Ausschüttung von Cytokinen und Entzündungsmediatoren bzw. die Akkumulation inflammatorischer Zellen und Plasmaproteine stimulieren können (34, 35, 77, 178).

Die Tatsache, dass *S. cerevisiae* drei PLB-Isoenzyme exprimiert, weist auf die mögliche Anwesenheit weiterer PLB kodierender Gene in *C. albicans* hin, die möglicherweise gemeinsam mit *caPLB1* und *caPLB2* in der Pathogenese von *C. albicans* agieren könnten. Tatsächlich beinhaltet die hier vorliegende Arbeit die Isolierung und weitere Studie eines dritten, bis dato unbekanntes Phospholipase-B-Gens aus diesem opportunistischen Erreger.

4. Transportsysteme

Die Produktion antagonistisch wirkender Stoffe, ebenso wie die Ausbildung von Resistenzen gegenüber toxischen Substanzen sind essentiell für das Überleben von Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung. So haben sich in allen Organismen aktive Transportsysteme entwickelt, die endogene und exogene toxische Substanzen über die Plasmamembran oder Membranen interner Zellkompartimente transportieren können. In Pilzen und auch allen anderen Organismen sind verschiedene Familien membranintegrierter Transportproteine an diesen biologischen Prozessen beteiligt, wobei eine wichtige Familie die ATP-abhängigen Transportproteine umfasst. Diese, sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommenden Transmembranpumpen, transportieren durch Binden und Hydrolysieren von Nukleotidtriphosphaten (v. a. ATP) eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen über biologische Membranen, wie z. B. Aminosäuren, Peptide, Zucker, Lipide, Phospholipide, Pheromone, Ionen, Schwermetalle, verschiedenste Toxine und Antibiotika (119, 148). Trotz der oft vielfältigen Substrattypen, die von ABC-(*ATP-binding-cassette*)-Transportproteinen gebunden werden können, zeichnet sich jeder Transporter doch durch eine gewisse Selektivität für bestimmte Substrate aus. Der genaue „polyspezifische“ Bindungs- und Transportmechanismus dieser Multi-Effluxpumpen ist noch weitgehend unklar. Die Substratbindung scheint auf einer Kombination hydrophober und elektrostatischer Effekte zu basieren, was strukturelle Analysen löslicher Multidrogentransporter sowie des P-Glycoproteins aus Säugetierzellen und des bakteriellen *E.-coli*-Homologs MsbA zeigten (195).

Viele humane ABC-Proteine sind von klinischer Relevanz, da Mutationen in den korrespondierenden Genen schwere genetische Krankheiten auslösen können, wie z. B. im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*) die zystische Fibrose (Mukoviszidose) (116, 225). Darüberhinaus führt die Überexpression des humanen

P-Glykoproteins, kodiert durch MDR1 (107), und des MDR-assoziierten Proteins MRP1 (*multidrug resistance related protein 1*) (52) in Tumorzellen und kultivierten Zellen zu Multiresistenz gegenüber vielen Chemotherapeutika. Die Multidrogenresistenz (MDR) in Säugetieren ist dabei analog zu der pleiotropen Drogenresistenz (PDR) in Hefen, in der bestimmte ABC-Effluxpumpen involviert sind (16).

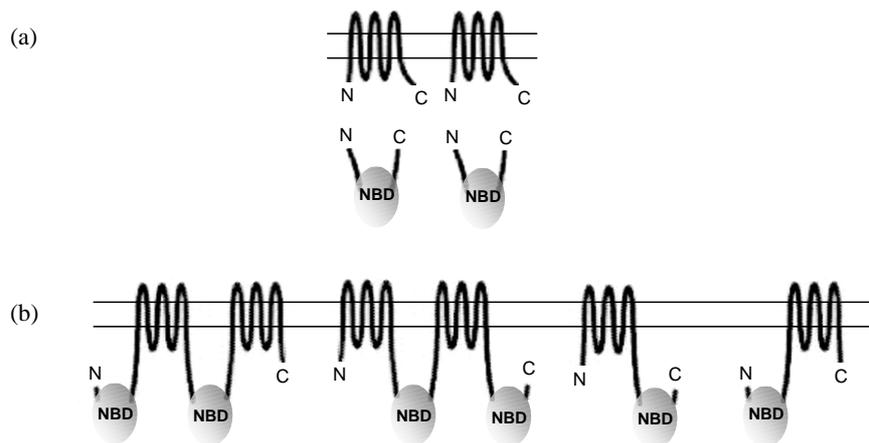


Abbildung 3: **Organisation der vier strukturellen Domänen von ABC-Transportern.** Eine komplette funktionale Transporteinheit umfasst generell ein bis vier Polypeptiduntereinheiten. Die Domänen (α -helicale Transmembrandomänen und Nukleotid bindende Domänen (NBDs)) können als separate Polypeptide exprimiert werden (a) oder auch in unterschiedlichen Konfigurationen fusioniert vorliegen (Beispiele in b) (64, 294).

Alle ABC-Transporter haben eine ähnliche molekulare Architektur mit mindestens einer Nukleotid bindenden Domäne (NBD) und α -helicalen, Membran durchspannenden Segmenten (Transmembrandomäne (TMD)) (Abb. 3 a und b). Bei Pilzen bestehen die meisten ABC-Transportproteine aus insgesamt vier Domänen, die als *Full-sized*-Transporter (mit zwei NBDs) entweder eine $(TMD-NBD)_2$ - oder eine reverse $(NBD-TMD)_2$ -Topologie einnehmen (Abb. 3 b). Aber auch *Half-sized*-Transporter mit nur einer NBD und unterschiedlichen Topologien wurden beschrieben.

Die hydrophile, zytoplasmatisch gelegene NBD-Region umfasst mehrere konservierte Motive, wie die hoch konservierten Walker A und Walker B Motive (301), die konservierte „LSGGQ“-ABC-Signatur (119) sowie eine weitere, weniger konservierte Region, die sogenannte „center region“. Weniger homolog zueinander sind die TMDs der verschiedenen ABC-Transporter. Ihre Aufgabe ist es, die Spezifität des Transporters mitzubestimmen und einen hydrophoben Tunnel zu formen, durch den die Substrate Membranen passieren können (195).

Die Genomanalyse der apathogenen Hefe *S. cerevisiae* führte zur Identifikation von über 30 verschiedenen ABC-Proteinen, von denen bislang nur wenige funktional charakterisiert sind. Basierend auf phylogenetischen Stammbaumanalysen können die Hefe-ABC-Proteine in insgesamt sechs verschiedene Subfamilien bzw. Cluster (nach Decottignies und Goffeau (64), im folgenden in Klammern gesetzt) unterteilt werden, von denen die am besten charakterisierten Mitglieder der PDR-Unterklasse (Cluster I), der MRP/CFTR-Unterklasse (Subcluster II.1) oder der MDR-Unterklasse (Subcluster II.2/3) angehören (16, 64, 283). Die Mitglieder dieser Unterklassen unterscheiden sich hinsichtlich Topologie und Aminosäuresequenz-Motiven. So ist eine (NBD-TMD)₂-Topologie typisch für ABC-Transporter der PDR-Unterklasse (Subcluster I) und eine (TMD-NBD)₁ oder ₂-Topologie typisch für Subcluster-II-Transporter. Zur MDR-Unterfamilie (Subcluster II.2) zählt z. B. der ABC-Transporter *scSte6p*, der hohe Ähnlichkeiten mit Säugetier P-Glykoproteinen, die in multiple Drogenresistenz involviert sind, aufweist. *Ste6p* ist ein *S. cerevisiae* ABC-Protein mit einer (TMD₆-NBD)₂-Topologie, das für den Export des MAT a zellspezifische Sexpheromons a verantwortlich ist (147) und interessanterweise keine MDR-Funktionen übernimmt. Mindestens fünf ABC-Proteine (*scPdr5p*, *scSnq2p*, *scPdr12p*, *scYor1p* und *scYcf1p*) verleihen bei Überexpression in *S.-cerevisiae*-Zellen einen pleiotropen Drogenresistenz-Phänotyp. *ScPdr5p*, *scSnq2p* und *scPdr12p* haben eine (NBD-TMD)₂-Topologie (14, 25) und zählen zur PDR-Subfamilie (Subcluster I.1), wohingegen *scYor1p* und *scYcf1p* eine (TMD-NBD)₂-Anordnung aufweisen und zur MRP/CFTR-Unterklasse (Subcluster II.1) zählen. Für *scPdr5p* und *scSnq2p* konnte gezeigt werden, dass diese plasmamembranständigen Transporter hunderte (!) strukturell und funktional unterschiedliche Substanzen transportieren können. Ihre eigentliche physiologische Funktion in der Zelle ist jedoch unklar: In Abwesenheit toxischer Substanzen weisen *scPDR5*- und *scSNQ2*-Nullmutanten keinen Phänotyp auf. Möglicherweise tragen sie zum Efflux von Kataboliten während des stationären Wachstums bei oder sind an der asymmetrischen Verteilung von Phospholipiden in der Plasmamembran beteiligt (65). Letzteres trifft auch für mindestens drei Cdr-Proteine (*caCdr1p*, *caCdr2p*, *caCdr3p*) der human pathogenen Hefe *C. albicans* zu (258). Diese ebenfalls zur PDR-Subfamilie gehörenden Membraneffluxpumpen gewannen im Rahmen der zunehmenden Resistenzentwicklung in der Behandlung von Candidose mit antimykotisch wirkenden Therapeutika, wie z. B. Fluconazol oder Miconazol (zwei der meist genutzten Azol-Antimykotika), an Bedeutung. Im Genom von *C. albicans* (*C. albicans* Datenbank des Stanford Genome Technology Center) existieren wenigstens 11 ABC-Transporter, die der CDR-Genfamilie zugeordnet werden können. Bislang wurden vier (*caCDR1* - 4) näher charakterisiert, die alle eine (NBD-TMD)₂-Topologie aufweisen. Bislang

konnte nur für caCdr1p und caCdr2p gezeigt werden, dass durch Überexpression eine Resistenz gegenüber Azole und andere Drogen erreicht werden kann (91, 214, 241).

Die *S. cerevisiae* Proteine Yor1p und Ycf1p weisen Homologien auf zu den humanen ABC-Transportern MRP1 und, in geringerem Maße, zu CFTR. Ursprünglich wurden sie durch ihre Eigenschaft Oligomycinresistenz (scYor1p (134)) und Cadmiumresistenz (scYcf1p (282, 303)) zu vermitteln identifiziert. Während scYor1p ein weiterer Multidrogen-ABC-Transporter der Plasmamembran ist, erwies sich scYcf1p als ein in der Vakuolenmembran lokalisiertes Transportprotein. Die Vakuole von Pilzen ist ein sehr komplexes Organell, das an vielen zellulären Funktionen beteiligt ist. Als saures Kompartiment, das eine ganze Reihe hydrolytischer Enzyme enthält, wird sie oft mit tierischen Lysosomen verglichen. Neben degradierenden Prozessen erfüllt die Pilzvakuole aber vor allem Aufgaben, die eher an die Funktion pflanzlicher Vakuolen erinnern, z. B. im Bereich der Lagerung benötigter Metabolite (z. B. basische Aminosäuren und Polyphosphate), der Osmoregulation und der homöostatischen Regulation der zytosolischen Ionenkonzentration und des pH-Werts (138). Zudem liegt eine weitere Funktion in der Entgiftung des Zellzytoplasmas. So transportiert scYcf1p neben Cadmium noch andere Metalloide (z. B. Arsenit, Arsenat und Antimon) und zytotoxische Substanzen (z. B. S-Dinitrophenyl-Glutathion (DNP-GS) und 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol (CDNB)) als Glutathion-S-(GS)-Konjugate aus dem Zytoplasma in die Vakuole (103, 159, 160, 221). ScYcf1p ist ein Hefe-Ortholog des humanen MRP (52), weist aber auch Homologien zum humanen CFTR auf, insbesondere auf Grund einer rudimentären R-Domäne, wie sie nur in CFTR vorkommt (224). So trug seine Ähnlichkeit zu CFTR in Bezug auf die Analyse strukturbedingter Funktionen zum weiteren Verständnis der zystischen Fibrose bei (303).

Jüngste Untersuchungen charakterisierten zwei weitere zu scYcf1p verwandte Transporter, die in der vakuolären Membran von *S. cerevisiae* lokalisiert sind: scBat1p, ein Transporter der die Aufnahme von Gallensäure (z. B. Taurocholat) in die Vakuole vermittelt (205) und scBpt1p, der gemeinsam mit scYcf1p in die vakuoläre Aufnahme von unkonjugiertem Bilirubin involviert ist (206). Die physiologische Funktion von scBat1p und scBpt1p ist weitgehend unklar, jedoch wäre der Transport toxischer Abbauprodukte von Häm-tragenden Proteinen (wie z. B. Zytochrome, Katalasen und Peroxidasen) denkbar. Beide Hefe-ABC-Transporter können als Modell zur Analyse für Gallensäure- bzw. Gallenpigment-Transporter in Säugetieren dienen.

Betrachtet man die Gesamtzahl an ABC-Transportern in Hefen und beachtet man deren Substratspezifitäten (soweit bekannt), dann wird deutlich, dass Mikroorganismen ein großes Netzwerk an Transportern mit teils überlappenden Spezifitäten besitzen, das in den Efflux

verschiedenster Substrate über biologische Membranen involviert ist. Dies birgt auch ein enormes Potential zur Ausschleusung verschiedenster toxischer Substanzen, inklusive antimykotischer Wirkstoffe und somit zur Ausbildung von Resistenzen. Es kann davon ausgegangen werden, dass im Genom von *C. albicans* eine ähnlich große Anzahl an ABC-Transportern wie im Genom von *S. cerevisiae* vorkommt. Bislang sind nur wenige davon in der Literatur beschrieben worden, wie die genannten *CDRs* oder *HST6*, ein funktionales Homolog zu *scSTE6* (220). Die Identifizierung und funktionale Analyse noch unbekannter ABC-Transporter könnte helfen, weitere mögliche Resistenzmechanismen in Pilzen aufzuklären. Darüberhinaus sind *Candida-albicans*-Zellen während der Kolonisation und Infektion möglicherweise einer ganzen Reihe inhibitorischer Substanzen ausgesetzt. Die Fähigkeit Resistenzen gegenüber diesen Substanzen aufbauen zu können, könnte Stämmen Vorteile für die Besiedlung bestimmter Wirtsnischen verschaffen (249) und die Identifizierung involvierter Transportsysteme könnte weitere Einblicke in die Pathogenese dieses Mikroorganismus geben.

5. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, bei der opportunistisch humanpathogenen Hefe *C. albicans* die physiologische Funktion zweier Gene, einer putativen Phospholipase B und eines neuen ABC-Transporters der MRP/CFTR-Subfamilie zu charakterisieren. Neben Expressionsanalysen auf Transkriptionsebene, die unter verschiedenen *in vitro* Wachstumsbedingungen durchgeführt wurden, sollte die funktionale Analyse auch unter Verwendung von molekulargenetisch hergestellten Deletionsmutanten beider Gene erfolgen. Hierfür war zunächst die Isolierung und Klonierung beider Gene aus dem *C.-albicans*-Genom sowie deren Sequenzbestimmung erforderlich. Die Inaktivierung beider Gene im Stamm CAI4 sollte mit Hilfe des klassischen *URA3*-Blaster-Systems durchgeführt werden. Gleichzeitig lag jedoch ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Etablierung eines neuen dominanten und selektierbaren Markersystems in *C. albicans*. Unter Verwendung des MPA-resistenten *IMH3*-Allels (*MPA^R*) aus *C. albicans* sollten genetische Manipulationen von Wildstämmen durchgeführt werden, was bis zu diesem Zeitpunkt in *C. albicans* so gut wie nicht möglich war (61).

Die mittels Ura- und MPA-Selektion konstruierten Mutantenstämme beider Gene (der Phospholipase B und des ABC-Transporters), sollten in *in vitro* Wachstumsversuchen auf phänotypische Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp getestet werden. Die Mutanten- und Revertantenstämme mit ansonsten wildtypischem genetischen Hintergrund sollten auch zum Einsatz in *in vivo* Tierversuchen kommen. Durch letzteres sollten Hinweise auf die mögliche Bedeutung beider Gene während der *C.-albicans*-Infektion erhalten werden.

IV MATERIAL UND METHODEN

1. Stämme und Genbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Pilzstämme sind in den Tabellen 1 bis 3 beschrieben. Die Stämme wurden als Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 1: *Escherichia-coli*-Stämme für Klonierungsarbeiten.

Stamm	Genotyp	Referenz / Herkunft
DH5 α	F, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^-), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(\text{argF-lac})$ U169, λ^- , $\phi 80d/lacZ\Delta M15$	(316)
XL1-Blue MRF ⁷	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>] ^c	Stratagene, Heidelberg

Tabelle 2: *Candida-albicans*-Stämme¹.

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp	Referenz / Herkunft
SS		klinisches Isolat	R. Morelli, San Francisco State University, USA
CAI4	SC5314	$\Delta\text{ura3-1::imm434}/\Delta\text{ura3-2::imm434}$	(87)
C10	CAI4	$\Delta\text{mlt1-1::hisG-URA3-hisG}/\text{MLT1}$	diese Arbeit
C10-1	C10	$\Delta\text{mlt1-1::hisG}/\text{MLT1}$	diese Arbeit
C10-11	C10-1	$\Delta\text{mlt1-1::hisG}/\Delta\text{mlt1-2::hisG-URA3-hisG}$	diese Arbeit
C4GFP	CAI4	$\text{MLT1}/\text{MLT1::GFP*}-T_{\text{ACT1}}-\text{URA3}$	diese Arbeit
SC5314		klinisches Isolat, wildtypisch	(105)
ST13	SC5314	$\Delta\text{mlt1-1::hisG-MPA}^R\text{-hisG}/\text{MLT1}$	diese Arbeit
ST13-9	ST13	$\Delta\text{mlt1-1::hisG}/\text{MLT1}$	diese Arbeit
ST13-12	ST13-9	$\Delta\text{mlt1-1::hisG}/\Delta\text{mlt1-2::hisG-MPA}^R\text{-hisG}$	diese Arbeit

ST13-63	ST13-12	$\Delta ml1-1::hisG/\Delta ml1-2::hisG$	diese Arbeit
ST13-K1	ST13-63	$MLT1- MPA^R/\Delta ml1-2::hisG$	diese Arbeit
ST13-K2	ST13-63	$\Delta ml1-1::hisG/MLT1- MPA^R$	diese Arbeit
PK3	CAI4	$\Delta plb5^{LK}::hisG-URA3-hisG/PLB5^{SN}$	diese Arbeit
PG9	CAI4	$\Delta plb5^{SN}::hisG-URA3-hisG/PLB5^{LK}$	diese Arbeit
PK3-3	PK3	$\Delta plb5^{LK}::hisG/PLB5^{SN}$	diese Arbeit
PG9-3	PG9	$\Delta plb5^{SN}::hisG/PLB5^{LK}$	diese Arbeit
PK3-11	PK3-3	$\Delta plb5^{LK}::hisG/\Delta plb5^{SN}::hisG-URA3-hisG$	diese Arbeit
PG9-31	PG9-3	$\Delta plb5^{SN}::hisG/\Delta plb5^{LK}::hisG-URA3-hisG$	diese Arbeit
ATCC44808		Patientenblutisolat, wildtypisch	(172)
KH44	ATCC44808	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-SAP2P-FLP^*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT-tag/PLB5^{SN}$	diese Arbeit
KH44-13	KH44	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-tag/PLB5^{SN}$	diese Arbeit
KH44-90	KH44-13	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-tag/\Delta plb5^{SN}::tag-FRT-SAP2P-FLP^*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT-tag$	diese Arbeit
KH44-91	KH44-90	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-tag/\Delta plb5^{SN}::tag-FRT-tag$	diese Arbeit
KH44-KI	KH44-91	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-tag/PLB5^{LK}-FRT-SAP2P-FLP^*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT-3'plb5$	diese Arbeit
KH44-KL	KH44-KI	$\Delta plb5^{LK}::tag-FRT-tag/PLB5^{LK}-FRT-3'plb5$	diese Arbeit

¹ verwendete Abkürzungen: *URA3*: Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase-Gen, *MLT1*: Gen für den *MRP-like-transporter-1* isoliert aus *C. albicans*, *hisG*: *Salmonella thyphimurium* ATP-Phosphoribosyltransferase-Gensequenz, *MPA^R*: Mycophenolsäure-resistentes *IMH3*-Allel isoliert aus *C. albicans*, *PLB5*: putatives Phospholipase-3-Gen isoliert aus *C. albicans*, *FRT* (*FLP-recognition-target*): minimale (34 bp) Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase, *FLP**: genetisch veränderte FLP-Rekombinase, bei der alle drei CTG-Codons gegen TTG ausgetauscht wurden, *SAP2P*: Promotor des *SAP2*-Protease-Gens von *C. albicans*, *T_{ACT1}*: Terminator des Aktin-Gens von *C. albicans*, *tag*: über PCR-Primer eingebrachte Marker-DNA-Sequenz (6 bp) mit individueller Nukleotidabfolge, *GFP**: genetisch verändertes *Green-Fluorescence-Protein*-Gen mit einem CTG-TTG-Austausch an Position 626-628 und veränderter Chromophorsequenz (S65A, V68L und S72A)

Tabelle 3: *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamm.

Stamm	Genotyp	Referenz / Herkunft
JWY53	MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>ycf1-Δ2::hisG</i>)	S. Moye-Rowley, University of Iowa, Iowa City / IA, USA

Zur Isolierung von *caMLT1* und *caPLB5* verwendete *C.-albicans*-Genbank:

Die Fosmid-Genbank von M. Strathmann konstruiert und uns freundlicherweise von S. Scherer (USA) zur Verfügung gestellt:

Sie besteht aus ca. 40 kb großen genomischen DNA-Fragmenten des Stamms *C. albicans* 1161, die durch einen *Sau3AI* Partialverdau generiert und in einem Fosmid-Vektor kloniert wurden (135). Sie umfasst insgesamt 3840 *E. coli*-Klone, aufgeteilt auf 40 Microtiterplatten (<http://alces.med.umn.edu/candida/fosmidinfo.html>). Für die Hybridisierungen wurden die ersten 20 Platten verwendet.

2. Vektoren, Oligonukleotide und DNA-Sonden

Im Folgenden sind alle Vektoren und rekombinanten Plasmide in Tabelle 4, Oligonukleotide in Tabelle 5 und DNA-Gensonden in Tabelle 6 aufgeführt, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet oder hergestellt wurden.

Tabelle 4: Vektoren und rekombinante Plasmide¹.

Bezeichnung	Ausgangsvektor	Charakteristika	Referenz / Herkunft
Vektoren für Subklonierungen			
pSK		pBluescript SK, Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pSKK	pSK	<i>KpnI</i> -Site inaktiviert	diese Arbeit
pKS		pBluescript KS, Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pUC18		Amp ^R	Pharmacia, Freiburg
pRS424		2 μ ori, <i>TRP1</i> , Amp ^R	(49)
pRC2312		ARS von <i>C. albicans</i> , <i>LEU2</i> , <i>URA3</i> , Amp ^R	(39)
Rekombinante Plasmide			
pGFP31	pKS	GFP-Kassette [<i>ACT1P-GFP*</i> - <i>T_{ACT1}</i> - <i>URA3-3'ACT1</i>]	(183)

pMB-7	pUC18	<i>URA3</i> -Blaster [<i>hisG-URA3-hisG</i>]	(87)
pGK352	pRC2312	MPA-Resistenzgen <i>MPA^R</i>	G. Köhler ²
pSFI1	pKS	<i>MPA^R</i> -Flipper [<i>FRT-SAP2P-FLP*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT</i>]	(312)
pl37pstI	pSK	[3' <i>PLB5-CCR4-5'MLT1</i>]-Fragment aus <i>C. albicans</i> SS (10-kb- <i>PstI</i> -Fragment des λ FixII phagemids 37)	G. Köhler ²
pSC3732	pSK	2,8-kb- <i>HindIII</i> -Fragment (<i>MLT1</i> -Sequenzen) des λ FixII phagemids 37	G. Köhler ²
pABC600	pSK	<i>XbaI/XhoI</i> -kloniertes PCR-Fragment der 3'- <i>MLT1</i> -Region mit Terminator (CAI4, Pos. +4457 bis +5122 ⁴)	diese Arbeit
pGFPABC	pABC600	<i>MLT1-GFP*-Fusionskassette</i> [3' <i>MLT1-GFP*-T_{ACT1}-URA3-T_{MLT1}</i>]	diese Arbeit
Subklonierungen für Sequenzierreaktionen			
p37st8C	pl37pstI	<i>PstI/ClaI</i> -Subklon (<i>ClaI/ClaI</i> -deletiert)	diese Arbeit
p37st5C	pSK	<i>ClaI/ClaI</i> -pl37pstI-Fragment	diese Arbeit
p37st7H	pl37pstI	<i>PstI/HindIII</i> -Subklon (<i>HindIII/HindIII</i> -deletiert)	diese Arbeit
p37st15H	pSK	<i>HindIII/HindIII</i> -pl37pstI-Fragment	diese Arbeit
p37st1H	pSK	<i>HindIII/HindIII</i> -pl37pstI-Fragment	diese Arbeit
p37(12)	pSC3732	<i>SacI/HindIII</i> -Subklon (<i>SacI/SacI</i> -deletiert)	G. Köhler ²
p37(13)	pSC3732	<i>SpeI/HindIII</i> -Subklon (<i>SpeI/SpeI</i> -deletiert)	G. Köhler ²
p37(5)	pSC3732	<i>EcoRV/HindIII</i> -Subklon (<i>EcoRV/EcoRV</i> -deletiert)	G. Köhler ²
p37(3)	pSC3732	<i>EcoRI/HindIII</i> -Subklon (<i>EcoRI/EcoRI</i> -deletiert)	G. Köhler ²
p7Hst1M	pSK	<i>PstI/MunI</i> -p37st7H-Fragment	diese Arbeit
p7Hst03M	pSK	<i>MunI/MunI</i> -p37st7H-Fragment	diese Arbeit
p7Hst12M	pSK	<i>MunI /MunI</i> - p37st7H-Fragment	diese Arbeit

p7Hst18M	pSK	<i>MunI</i> / <i>MunI</i> - p37st7H-Fragment	diese Arbeit
<i>Klonierungen zur Stamm-Mutagenese und Komplementation</i>			
p5CMPA ^R	p37st5C	[5' <i>MLT1</i> - <i>MPA</i> ^R -3' <i>MLT1</i>]-Fragment: 2,5 kb wurden in p37st5C aus der <i>MLT1</i> -Sequenz deletiert (Pos. +956 bis +3644) und durch <i>MPA</i> ^R ersetzt	diese Arbeit
pC6	pSKK	<i>XbaI</i> / <i>PstI</i> -kloniertes PCR-Fragment von <i>MLT1</i> (CAI4, bp-Position -1288 bis +4596 ³)	diese Arbeit
pC6A	pC6	[5' <i>MLT1</i> - <i>hisG</i> - <i>URA3</i> - <i>hisG</i> -3' <i>MLT1</i>], <i>MLT1</i> - <i>URA3</i> -Blasterkassette: 1850 bp wurden in <i>MLT1</i> deletiert (Pos. +193 bis +2042 ³) und durch den <i>URA3</i> - Blaster ersetzt	diese Arbeit
pIC11	pC6A	[5' <i>MLT1</i> - <i>hisG</i> - <i>MPA</i> ^R - <i>hisG</i> -3' <i>MLT1</i>], <i>MLT1</i> - <i>MPA</i> ^R -Blasterkassette: das <i>URA3</i> -Gen wurde durch das <i>MPA</i> ^R -Gen ersetzt	diese Arbeit
pABC2	pC6	[5' <i>MLT1</i> - <i>hisG</i> - <i>MPA</i> ^R - <i>hisG</i> -3' <i>MLT1</i>], zweite <i>MLT1</i> - <i>MPA</i> ^R -Blasterkassette: 2584 bp wurden in <i>MLT1</i> deletiert (Pos. +321 bis +2906 ³)	diese Arbeit
pABC111	pSKK	<i>XbaI</i> / <i>ApaI</i> -kloniertes PCR-Fragment von <i>MLT1</i> (SC5314, Pos. -1288 bis +5860 ³)	diese Arbeit
pCOMP	pABC111	[<i>MLT1</i> - <i>MPA</i> ^R - <i>T_{MLT1}</i>]-Fragment	diese Arbeit
pKP1	pSKK	<i>HindIII</i> / <i>BamHI</i> -kloniertes PCR- Fragment von <i>PLB5</i> (ATCC44808, Pos. -937 bis +2154 ³)	diese Arbeit
pPU10	pKP1	[5' <i>PLB5</i> - <i>hisG</i> - <i>URA3</i> - <i>hisG</i> -3' <i>PLB5</i>]- Fragment: 1100 bp in <i>PLB5</i> deletiert (Pos. +281 bis +1381 ³) und durch den <i>URA3</i> -Blaster ersetzt	diese Arbeit

pKPNX25	pKP1	entspricht pKP1, <i>NotI</i> - und <i>XhoI</i> -Sites zusätzlich inaktiviert	diese Arbeit
pDIS-Pool	pKPNX25	[5' <i>PLB5</i> -tag- <i>FRT</i> - <i>SAP2P</i> - <i>FLP</i> *- <i>T_{ACT1}</i> - <i>MPA^R</i> - <i>FRT</i> -tag-3' <i>PLB5</i>]-Pool: 638 bp wurden aus <i>PLB5</i> deletiert (Pos. +235 bis +872 ³) und mit dem <i>MPA^R</i> -Flipper aus pSFI1 unter Einbringung von <i>Tags</i> ersetzt	diese Arbeit
pKPNXS	pKPNX25	entspricht pKPNX25, <i>SalI</i> -Site zusätzlich inaktiviert	diese Arbeit
pP4486	pKPNXS	<i>HindIII</i> / <i>SpeI</i> -klonierte, funktionale <i>PLB5^{LK}</i> -Genkopie (ATCC44808, Pos. – 951 bis +2696 ³)	diese Arbeit
pPIKOM	pP4486	[<i>PLB5^{LK}</i> - <i>FRT</i> - <i>SAP2P</i> - <i>FLP</i> *- <i>T_{ACT1}</i> - <i>MPA^R</i> - <i>FRT</i> -tag-3' <i>PLB5</i>]-Fragment: <i>MPA^R</i> -tag-Flipper und 3'- <i>PLB5</i> -Bereich aus pDIS-Pool kloniert in die <i>SalI</i> / <i>SacII</i> -Site des Vektors	diese Arbeit
pJAW50	pRS424	enthält <i>YCF1</i> -Gen von <i>S. cerevisiae</i> (Asp718/ <i>ScaI</i> in Asp718/ <i>SmaI</i> von pRS424)	S. Moye-Rowley, USA
pMLT424	pJAW50	<i>scYCF1</i> wurde durch <i>caMLT1</i> ersetzt	diese Arbeit

¹ Abkürzungen wie in Tabelle 2, hier zusätzlich verwendete Abkürzungen: Amp^R: Ampicillin-Resistenzgen, *TRP1*: Tryptophan-Resistenzgen, *ACT1P* und 3'*ACT1*: Promotor und 3'-Bereich des Aktin-Gens, 5'*PLB5* und 3'*PLB5*: 5'- und 3'-Bereich des Phospholipase-Gens, *CCR4*: putativer Transkriptionsregulator von *C. albicans* mit Homologie zu *ScCCR4*, 5'*MLT1*, 3'*MLT1* und *T_{MLT1}*: 5'-, 3'-Bereich und Terminator des ABC-Transporters *MLT1*

² seit März 2001, Dept of Stomatology, University of California, San Francisco / CA, USA

³ siehe *MLT1*- bzw. *PLB5*-DNA-Sequenz im Anhang

Tabelle 5: **Oligonukleotide**. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG Biotech.

<i>Oligonukleotide</i> ¹	<i>Sequenz (5' – 3')</i> ²	<i>Bindungsstelle / Herkunft</i> ³
<i>Sequenzierprimer</i>		
03UP14*	AAGGTAGTTCGCCACAGC	<i>CCR4</i>
13R7REV17*	CTTGCCACTCTTGTAACGC	<i>MLT1</i>
17P*	GACCCAGAGCCTAATGATAAC	<i>MLT1</i>
18FOR16*	TACCCTGTTACCAAGTCG	ca. 840 bp vor <i>CCR4</i> -ATG-Startcodon
373*	CTTCTCACCAACAACAGTC	<i>MLT1</i>
ABC21*	TTTACACCCTTACATAACCC	<i>NTG1</i>
ABC3752	GGAGAATATTTGTTTG	<i>MLT1</i>
ABC5108	TTACCCATTGATCGAC	<i>MLT1</i>
ABC605*	AGGAAATGGTTTATTCAC	ca. 880 bp vor <i>MLT1</i> -ATG-Startcodon
ABC6103	CTTGAATAATTTGTCGG	<i>MLT1</i>
CCR4SEQ11*	TCTTGAAACAGCACACGAC	ca. 1280 bp vor dem <i>MLT1</i> -ATG-Startcodon
DOWN373F18*	ACCACTGAGAAAGTTGCAGC	<i>MLT1</i>
FOPLIP2*	TTCTTCCATTGGCAACCAC	<i>PLB5</i>
KNUT*	CGGTGTTGGTGTGTAGATG	<i>MLT1</i>
LOW13R7*	TGCCAATGCACTGACCAC	<i>MLT1</i>
LOW15HF5*	GATGATACCAAAGCCAAAG	<i>MLT1</i>
LOW15HR4*	TAATGAAATTGAGGTGGGG	ca. 420 bp vor <i>MLT1</i> -ATG-Startcodon
LOW18U1*	ATCAAGGCACTCCAACCAC	<i>CCR4</i>
LOW3FOR9*	ACCTTTGGAGTGATCTTGTC	<i>MLT1</i>
PLB1210*	CAAGCAATTTGGCCATTTGAC	<i>PLB5</i>
PMFREV*	GCGTATTTGTAGTGAGAAAACC	<i>PLB5</i>
RACE3*	GTGGATTCAAAGACGCTGC	<i>PLB5</i>
REVERSE*	GGAAACAGCTATGACCATG	pBluescript / Stratagene
RMDR1*	CAAAGAAGGTGGGACTTGATG	<i>MLT1</i>

RPLIP1*	ATTACATCAACACCACGCTC	<i>PLB5</i>
ST4DOWN12*	TAATTCGGTCTGGTAGCC	<i>PMU1</i>
STPLIP4*	CATTGTTGGGAGAAGAAGCG	bindet kurz vor <i>PLB5</i> -Start (5'Primeranfang liegt auf ATG-Codon)
UNIVERSAL*	GTAAAACGACGGCCAGT	pBluescript / Stratagene
UP18U10*	TGTGCTGGTTGGTATGGC	ca. 160 bp vor <i>CCR4</i> - ATG-Startcodon
UPPLIP3*	TCCACCACTGAATGACAACC	<i>PLB5</i>
PCR-Primer		
ABCREV	CATTGGTTGTTGGTTTTGG	<i>NTG1</i> , ca. 300 bp nach <i>MLT1</i> -TAG-Stopcodon
AMPLI1 (<i>HindIII</i>)	TAGTC AAGCTT CGCCATTACAAAGAG C	<i>PMU1</i> , ca. 960 bp vor <i>PLB5</i> -ATG-Startcodon
AMPLI3 (<i>HindIII</i>)	CTACTAAGCTT TTCCACTGGTGCATC	<i>CCR4</i> , ca. 430 bp nach <i>PLB5</i> -TAG-Stopcodon
AMPLI5	AAACACAGATTGTTGAGTTGGAAG	<i>PMU1</i> , ca. 1150 bp vor <i>PLB5</i> -ATG-Startcodon
AMPLI6 (<i>SpeI</i> , <i>SalI</i>)	CTACTACTAGTCGAC TTCCACTGGTG CATC	<i>CCR4</i> , ca. 430 bp nach <i>PLB5</i> -TAG-Stopcodon
CYCFUS (<i>MluI</i>)	GCCTAACGCGT ACCGGTATCTATGTA TCCACCTTCTTTG	3' <i>MLT1</i> (ohne TAG- Stopcodon)
ECOMUPL3 (<i>EcoRI</i>)	TAGTC GAATTC TTGCTGAGATAG	<i>PLB5</i>
FOXABC (<i>XbaI</i>)	TATTA TCTAGA CTTGAAACAGCACAC GAC	ca. 1280 bp vor <i>MLT1</i> - ATG-Startcodon
KPN4390 (<i>KpnI</i>)	AATAT GGTACC TGCCTCGTGCAAGTG TTG	<i>MLT1</i>
NHEKNUT (<i>NheI</i>)	GATTAGCTAGC GGTGTTGGTGTGTAG ATG	<i>MLT1</i>
NOTESP3Y (<i>Esp3I</i> ; <i>NotI</i> -Überhang)	TCGTCTC TGGCCGTTGTGACGTTGGG AG	<i>MLT1</i>

NOTTAG (<i>NotI</i> , <i>PstI</i> ; tag)	TAATT GCGGCCGCTGCAG N(AGCT)W (AT)N(AGCT)N(AGCT)S(GC)N(AGCT)C TCAGTAACAGATACTTG	<i>PLB5</i>
PCR8CF	GACTTTGTTATTGGCATTCC	ca. 80 bp vor dem <i>MLT1</i> - ATG-Startcodon
PLB1390 (<i>XhoI</i>)	GACTG CTCGAG TGTAGA AACTTGCTGA ATCG	<i>PLB5</i>
PLB2294 (<i>NotI</i>)	TTATA GCGGCCGC CAATGGAAGAACA CCTG	<i>PLB5</i>
PSTMUPL4 (<i>PstI</i>)	TGGTGCTGACT CTGCAG G	<i>PLB5</i>
REMUPL2 (<i>BamHI</i>)	GAAGA GGATCC AGTAGACG	<i>PLB5</i>
XBATYCT (<i>XbaI</i>)	ACATT TCTAGA TCAACTATTTAAATGC TTC	ca. 80 bp nach dem <i>MLT1</i> - TAG-Stopcodon
XHESPIY (<i>Esp3I</i> ; <i>XhoI</i> -Überhang)	ACGTCTCATC GAACGCGGTATTGGCA G	<i>MLT1</i>
XHOABC (<i>XhoI</i>)	TGACA CTCGAG CATTGGTTGTTGGTTT TGG	bindet an der selben Position wie ABCREV
XHOAPA (<i>XhoI</i> , <i>ApaI</i>)	TTAAA GGGCC ATCTGG CTCGAG TAA GAG	<i>NTG1</i> , ca. 1 kb nach <i>MLT1</i> -TAG-Stopcodon
XNTAG (<i>XhoI</i> ; tag)	CAGGGACGACTG CTCGAG (AGCT)(A G)(AGCT)(AGCT)(AG)(AGCT)TGTAGA ACTTGCTGAATCG	<i>PLB5</i> (bindet an der selben Position wie PLB1390)
<i>IMH3-spezifische Primer</i>		
IDH8R	GGGAGAAATGGGAATGGGTAGAAGG	ca. 20 bp vor <i>IMH3</i> -ATG- Startcodon / G. Köhler
IDHBXR (<i>BamHI</i> , <i>XbaI</i>)	GTATT GGATCCTCTAGA ACTCAGTAT ATC	ca. 470 bp nach <i>IMH3</i> - TAA-Stopcodon / G. Köhler
IDHXBAR (<i>XbaI</i>)	CCGC TCTAGA ACTCAGTATATC	selbe Position wie IDHBXR / G. Köhler
IMHLIG	ATGGCTTGTGGTAGACCTC	<i>IMH3</i> / G. Köhler

IMHMLU (<i>MluI</i>)	ATTAT ACGCGT CCTAGATGTTTATGA TAC	ca. 600 bp vor <i>IMH3</i> - ATG-Startcodon / G. Köhler
IMHSF (<i>SalI</i>)	GCTCC GTCGAC TAGATGTTTATGATA C	selbe Position wie IMHMLU / G. Köhler
LDHKPNE (<i>KpnI</i>)	CTGCCATT GGTACC ATTG	<i>IMH3</i> / G. Köhler
<i>URA3-spezifische Primer</i>		
3URANHE (<i>NheI</i>)	TATAA GCTAGC TTACAATCAAAGGTG GTC	<i>URA3</i>
MLU5URA (<i>MluI</i>)	TTATT ACGCGT GTTTCCGTTTATACCA TC	<i>URA3</i>
URA2 (<i>XbaI</i>)	CTGTC TCTAGA AGGACCACCTTTG	<i>URA3</i> / J. Morschhäuser
<i>sonstige Primer</i>		
DTNOT (<i>NotI</i>)	AATTC GCGGCCGC (T) ₁₆	Anker-Primer für Poly(A)
NGFPFUS (<i>MluI</i>)	AGCCG ACGCGT ACGGATCCAAGCTT AAGTAAAGGAGAAGA ACTTTTC	<i>GFP</i> , N-terminal (ohne ATG-Startcodon)
SAP21	TGATAAATGGTGATGTCTAGTGGG	<i>SAP2P::FLP</i> -Kassette, <i>MPA^R</i> -Flipper / J. Morschhäuser
PLB1F	TGCTCACAAACACAGAAGAC	<i>PLB1</i>
RPLB1	TGCTGCCCATTCATCATCC	<i>PLB1</i>
PLB2FOR	ATGCCAATCCCACCATTC	<i>PLB2</i>
PLB2REV	CATCACTGAAGTTGTCGCC	<i>PLB2</i>
ACT3 (<i>SacII</i>)	CAGCAATA CCGCGG AACATGGTAG	<i>ACT1</i> / J. Morschhäuser
ACT4 (<i>PstI</i>)	CCAAGAG CTGCAG TCCCATCTCTTG	<i>ACT1</i> / J. Morschhäuser

¹ Oligonukleotide, die in Sequenzierreaktionen zum Einsatz kamen, tragen eine Fluoreszenzfarbstoff-Markierung (IRD41, IRD800) und wurden mit einem * hinter dem Primernamen gekennzeichnet.

² Fett gedruckte Bereiche gehen keine Basenpaarung mit der Zielsequenz ein und wurden zur Konstruktion von Restriktionsschnittstellen (umrahmte Bereiche) angehängt. In Klammern gesetzte Basen wurden in der Synthese des Primers abwechselnd eingebaut, so dass ein Gemisch aus Oligonukleotiden mit einem sogenannten *tag* entstand.

³ Soweit nicht anders angegeben, wurden die Primer im Verlauf dieser Arbeit hergestellt. Die Sequenzinformationen stammen aus veröffentlichten Gensequenzen (*Accession-(Acc.)-Nummer*), Publikationen oder wurden in Sequenzierreaktionen ermittelt. *IMH3* (141), *URA3* (*Acc.* X14198), *GFP* (183), *PLB1* (*Acc.* AF045558, U59710), *PLB2* (*Acc.* AB010809), *ACT1* (*Acc.* X16377)

Tabelle 6: **DNA-Gensonden.** Die Sonden für verschiedene Southern- oder Northernblot-Hybridisierungen wurden entweder mittels PCR aus chromosomaler DNA hergestellt oder durch Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide gewonnen.

<i>Spezifität</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Position (bp)</i>	<i>Länge (bp)</i>
<i>caMLT1</i>	MLT1#1	<i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus pl37pstI	3644 – 4597	954
	MLT1#2	PCR [CYCFUS-NOTESP3Y]	3799 – 4822	1024
	MLT1#3	<i>Cla</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment aus p37st15H	-45 – 961	1007
<i>caACT1</i>	ACT1#1	PCR [ACT3-ACT4]	1763 – 2615	853
<i>caIMH3</i>	IMH3#1	<i>Xba</i> I/ <i>Xba</i> I-Fragment aus pGK352	-600 – 2103	2704
	IMH3#2	PCR [LDHKPNE-IDHXBAR]	999 – 2103	1105
<i>caPLB1</i>	PLB1#1	PCR [PLB1F-RPLB1]	979 – 1925	947
<i>caPLB2</i>	PLB2#1	PCR [PLB2FOR-PLB2REV]	1108 – 1852	745
<i>caPLB5</i>	PLB5#1	<i>Pst</i> I/ <i>Mun</i> I-Fragment des Plasmids pl37pstI	1382 – 2397	1016
	PLB5#2	PCR [PSTMUPL4- REMUPL2]	1371 – 2159	789
	PLB5#3	PCR [PLB2294- REMUPL2]	1021 – 2159	1139
	PLB5#4	PCR [AMPLI1-PLB1390]	-937 – 235	1172

3. Größenmarker für DNA- und RNA-Gele

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde eine 1 kb Leiter von Gibco (Katalognummer 15615-016) oder von MBI Fermentas (Nr. SM0313) eingesetzt. Sollte die Menge des Fragments anhand der Bandenstärke im Gel abgeschätzt werden, so wurde der *MassRulerTM-DNA-Ladder-Mix* (MBI Fermentas, Nr. SM0403S) aufgetragen. Als RNA-Molekulargewichts-Standard diente die 0,24 - 9,5 kb RNA-Leiter von Gibco (Nr. 15620-016).

4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, sind mit Hersteller bzw. Vertrieb in Tabelle 7 aufgeführt. Tabelle 8 zeigt einen Überblick über die Herkunft der Verbrauchsmaterialien, die gegebenenfalls an geeigneter Stelle im Text näher benannt werden.

Tabelle 7: **Geräte.**

<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller / Vertrieb</i>
Elektroporationsgerät (Easyject prima)	EQUIBIO
ELISA Reader	BioRad
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100M, LSM 510 confocal laser scanning technique)	Zeiss
Geldokumentationsgerät	BioRad
Horizontale Gelkammer	Bio-Rad, Pharmacia
Hybridisierungssofen (Mini 10)	MWG Biotech
Inkubatoren Brutschrank Typ B6200, 37°C (<i>E. coli</i>) Brutschrank Typ 400, 30°C (Pilzzellen) Schüttler Innova 4300, 37°C (<i>E. coli</i>) Schüttler Innova 4230, 30°C (Pilzzellen)	Heraeus Mettler New Brunswick Scientific
Kamera Digitalkamera (Typ F-601) Farbvideokamera (Seascan) für mikroskopische Aufnahmen	Nikon Intas
PCR-Thermocycler (Progene)	Techne Incorporated
Phosphorimager (Cyclon)	Packard Bio Science
Photometer (Unicam, Ultrospec 3000)	Pharmacia
Sequenziergerät (LI-COR 4000)	Lincoln
Sterilbank	Heraeus
UV-Crosslinker (GS Gene Linker)	Bio-Rad
Vakuumblotter	Pharmacia
Zentrifugen J2-21 (JA10- und JA20-Festwinkelrotoren) Megafuge 2.OR Tischzentrifuge	Beckmann Heraeus Heraeus, Eppendorf

Tabelle 8: **Verbrauchsmaterialien.**

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller / Vertrieb</i>
Chemikalien	Bio-Rad, Biozym, Dianova, Difco, Merck, Oxoid, Roth, Sigma-Aldrich
Enzyme und Kits für die Molekularbiologie	Pharmacia, Gibco, MBI Fermentas, Promega, Qiagen, Roche, Stratagene Europe, New England Biotech
α - ³² P-ATP	Pharmacia
steriles Einwegmaterial	Greiner, Nunc
Nylonmembrane und Filme	Pharmacia, PALL

5. Computeranalysen und Genbankeinträge

DNA-Sequenzdaten wurden mit folgenden Programmen analysiert:

BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Homologierecherche)

BoxShade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html, Bearbeitung und Gestaltung multipler Sequenzvergleiche)

ClustalW, X (<http://www.ebi.ac.uk>, multiple und paarweise Sequenzvergleiche)

DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>, Hydrophobizitätsplot)

DGPI (http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html, Detektion GPI-verankerter Proteine)

FramePlot 2.3.2 (<http://nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>, ORF-Finder)

MatInspector V2.2 (<http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch.pl>, Promotoranalyse)

PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>, Proteinsequenzanalyse, Vorhersage von Transmembranregionen)

PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>, Vorhersage von Transmembranregionen)

iPSORT (<http://hypothesiscreator.net/iPSORT>, Vorhersage N-terminaler Signalsequenzen und möglicher zellulärer Proteinlokalisierung)

PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite>, Motifsuche)

PEPSTATS (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/pepstats.html>, Proteinchemie)

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, Vorhersage N-terminaler Signalsequenzen)

Wisconsin Package Version 10.2 – UNIX / Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc. (Analyse der Sequenzdaten aus Sequenzierreaktionen, Motifsuche, Sequenzvergleiche)

Northern-Intensitätsmessungen wurden mit der „OptiQuantTM Image Analysis Software“ (Packard Instrument Company, CT, USA) durchgeführt.

Für Sequenzvergleiche und Homologiesuche in *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurde auf die Genomsequenzierungsdaten des *Stanford-Genome-Technology-Center* zurückgegriffen (<http://www-sequence.stanford.edu>). Das *C.-albicans*-Genom war während der Promotionsarbeitszeit noch nicht vollständig sequenziert worden, so dass sich die Genomdatenbank noch im Aufbau befand und neue Sequenzierungsdaten nach und nach veröffentlicht wurden. Eine Suche in der *C.-albicans*-Datenbank nach Gensequenzen war dennoch jederzeit möglich, ebenso wie eine Homologierecherche. Die im Rahmen dieser Arbeit in Sequenzierreaktionen ermittelten DNA-Sequenzen der Gene *caMLT1* und *caPLB5* vom Stamm *C. albicans* SS wurden in der Datenbank *GenBank* unter der *Accession*-Nummer AF110027 und AF038128 veröffentlicht.

Candida-Informationsseiten: <http://alces.med.umn.edu/Candida.html>, <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/index.html>, http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/

6. Anzucht der Bakterien- und Hefepilzstämmen

6.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien- sowie Pilzstämmen in den entsprechenden Medien angezogen, 1,6 ml der Kultur mit 400 µl 86 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wurde über eine Reinstwasseranlage (Millipore) entsalztes und filtriertes Wasser verwendet.

Routinemäßig wurden für den täglichen Gebrauch die Bakterien- und Pilzstämmen auf LB- bzw. YPD- oder SD-Platten (gegebenenfalls mit entsprechenden Zugaben) ausgestrichen, bei 37°C bzw. 30°C inkubiert und für 2 - 4 Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

6.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Kultur kann spektrophotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt werden. Die Messwerte sollten hierbei immer im Bereich von OD₆₀₀ 0,05 - 0,7 liegen. Nur in diesem Bereich kann eine glaubwürdige Messung erfolgen. Für Hefezellen gilt eine OD₆₀₀ von 0,1 als gleichbedeutend mit einer Zellzahl von ca. 3×10^6 Hefezellen/ml bzw. eine OD₆₀₀ von 1 gleichbedeutend mit $\sim 3 \times 10^7$ Hefezellen/ml.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Zellzahl ist die direkte Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Hier werden zur Bestimmung der Zellzahl/ml vier Großquadrate ausgezählt und die so ermittelte durchschnittliche Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert.

Zum Bestimmen der Lebendzellzahl wurde eine Verdünnungsreihe in PBS (*phosphate buffered saline*: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCL, 0,18 % Na₂HPO₄, 0,024 % KH₂PO₄, pH 7,4) angelegt und pro

Verdünnungsstufe auf drei Platten je 100 µl/Platte ausplattiert. Die Lebendzellzahl/ml ergibt sich aus der durchschnittlichen Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor x 10.

6.3 Anzucht der *E.-coli*-Stämme

Die *E.-coli*-Stämme dienen als Wirt für die Vermehrung von Plasmiden für Subklonierungen und Sequenzierungen. Die Anzucht der *E.-coli*-Stämme erfolgte bei 37°C entweder unter Schütteln (250 rpm) in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 2 % Pepton aus Casein, 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Glucose) oder im Inkubator auf LB-Agarplatten (+ 2 % Agar). Gegebenenfalls wurden dem Medium nach dem Autoklavieren (20 min, 121°C) Indikatoren oder Antibiotika als Selektionsmittel zugegeben (Stocklösungen wurden bei -20°C aufbewahrt):

Xgal: 20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (40 µg/ml Endkonz. im Medium)

IPTG: 100 mM in Wasser (100 µM Endkonz. im Medium)

Ampicillin: 100 mg/ml in Wasser (100 µg/ml Endkonz. im Medium)

Chloramphenicol: 20 mg/ml in 50 % Ethanol (20 µg/ml Endkonz. im Medium)

Tetracyclin: 12,5 mg/ml in 50 % Ethanol (12,5 µg/ml Endkonz. im Medium)

6.4 Anzucht der Pilzstämme

Die Anzucht der *C.-albicans*- und *S.-cerevisiae*-Stämme erfolgte im Vollmedium YPD (*Yeast-Pepton-Dextrose*-Medium: 1 % Hefe-Extrakt, 2 % Pepton aus Casein, 2 % Glucose) oder im synthetischen Medium SD (*Synthetic-Complete-(SC)*-Medium mit Dextrose: 10,7 % YNB [*yeast nitrogen base*; BIO 101, CA, USA], 2 % Glucose, 0,08 % *complete supplement medium* ohne Uracil [1 x CSM-URA; BIO 101], pH 5,8). Die Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium unter Schütteln (250 rpm) oder auf Agarplatten (+ 2 % Agar) über Nacht bei 30°C inkubiert.

Die Glucose wurde als 20 %ige Stammlösung hergestellt und den autoklavierten Medien (15 – 20 min, 121°C) nachträglich zugegeben. Das CSM-URA wurde als 10 x Stocklösung nach Angabe des Herstellers angesetzt und dem SD-Medium ebenfalls nach dem Autoklavieren zugesetzt. Weiterhin konnten diesem Medium folgende Substanzen als Selektionsmittel beigemischt werden:

5-Fluor-Orotidyl-Säure (ICN, Meckenheim): frisch gelöst in Wasser (1 mg/ml Endkonz. im Medium)

Mykophenolsäure: 20 mg/ml in 100 % Ethanol (1, 10 und 20 µg/ml Endkonz. im Medium)

Uridin: 100 mg/ml in Wasser (100 µg/ml Endkonz. im Medium)

Tryptophan: 100 mM in 0,5 M HCl (40 µg/ml Endkonz. im Medium)

6.4.1 Anzucht von *C.-albicans*-Stämmen in Induktionsmedien und für phänotypische Tests

Wachstum unter Hyphen-induzierenden Bedingungen

Zur Induktion von Hyphen wurde eine Vorkultur bei 25°C in YPD hergestellt. Die *Candida*-Blastosporen wurden nach einmaligem Waschen in 0,9 M NaCl aus der Stationären Phase heraus in dem gewünschten, Hyphen-induzierenden Medium im Verhältnis 1:100 (wenn anderweitig, dann im Text erwähnt) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln für die jeweils angegebene Zeit inkubiert. Die morphologische Veränderung der Hefezellen wurde mikroskopisch verfolgt und gegebenenfalls die durchschnittliche Keimschlauchlänge (von 10 - 20 Zellen) mittels Zeiss LSM Image Browser ermittelt. Folgende Medien wurden zur Induktion von Hyphen bei *C.-albicans*-Zellen verwendet:

Lee's Medium, modifiziert nach (154), für 500 ml: 2,5 g (NH₄)₂SO₄, 1,25 g K₂HPO₄, 2,5 g NaCl, 0,5 g Biotin werden in 300 ml Wasser leicht erhitzt. Es erfolgt die Zugabe von 0,1 ml 1 mM ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,5 ml 1 mM FeCl₃ x 6 H₂O, 0,125 ml 1 mM CuCO₄ x 5 H₂O, 0,5 ml 1 M MgCl₂ x 6 H₂O, 0,5 ml 1 M CaCl₂ x 2 H₂O. Für Hefenwachstum wird ein pH von 4,5 eingestellt oder für Hyphenwachstum pH 6,8. Nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von 31,25 ml 20 %ige Glucose, 5 ml [20 g/l]-Mg SO₄ x 7 H₂O und 50 ml Aminosäuremix (4,5 g L-Alanin, 0,63 g L-Arginin, 11,7 g L-Leucin, 9 g L-Lysin, 0,9 g L-Methionin, 0,63 g L-Ornithin, 4,5 g L-Phenylalanin, 4,5 g L-Prolin, 4,5 g L-Threonin; ad 1l, pH 6,8).

Spider-Medium (162): 1 % nutrient broth, 1 % Mannitol, 0,2 % Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄), pH 7,2 nach dem Autoklavieren

RPMI 1640-Zellkulturmedium (mit L-Glutamine, ohne Zugabe von Glucose)

10 % FCS (*fetal calf serum*)

Für Plattenausstriche wurde den Medien 2% Agar zugegeben und die zu testenden Stämme aus einer ÜN-Kultur (25°C in YPD- oder SD-Medium) auf die gleichen Zellzahlen eingestellt. Nach Unterteilung der Platte in Sektoren wurden pro Sektor ca. 20 Zellen einer Zellkultur ausgestrichen und die Platte bei 30°C oder für mehrere Tage inkubiert.

Induktion des SAP2-Proteasepromotors zur kontrollierten Exzision des MPA^R-Flippers

Bei der Konstruktion der *caplb5*-negativen *C.-albicans*-Stämme wurde zur SAP2-Promotor-kontrollierten Expression der FLP-Rekombinase ein SAP2-Induktionsmedium verwendet, das neben einem saurem pH-Wert als alleinige Stickstoffquelle Rinderserumalbumin (BSA) beinhaltet (YCB-BSA-Medium: 2,34 % YCB (Yeast Carbon Base; BIO 101), 2 % Hefe-Extrakt, 0,4 % BSA (Bovine Serum Albumin), pH 5,0).

Nachweis von Phospholipaseaktivität auf Eigelb-Agarplatten

Eigelb als Zusatz zu Nährböden eignet sich zum Nachweis der Phospholipase-, Lipase- und/oder Proteaseaktivität von Mikroorganismen. Price und Mitarbeiter (215) beschrieben 1982 eine Methode für den Nachweis von Phospholipaseaktivität in *C. albicans*, die auf Eigelb als Quelle für Phospholipide (v. a. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin) beruht, inkorporiert in einen Sabouraud-Dextrose haltigen Plattenagar. Wachsen Phospholipase-positive *Candida*-Zellen auf diesem Medium, so bilden sich nach ein paar Tagen Präzipitate um die Kolonien herum, die als definierte, undurchsichtige weiße Höfe erkennbar sind. Dieses weiße Präzipitat entsteht vermutlich durch die Bildung von Kalzium-Komplexen mit frei werdenden Fettsäuren, die wiederum durch die Aktivität der Phospholipasen aus den im Eigelb vorhandenen Phospholipiden gespalten werden (169). In dieser Methode wird die Phospholipase-Aktivität eines *Candida*-Stamms definiert durch die Bestimmung des Verhältnisses von Kolonie-Durchmesser zu Koloniehof-Durchmesser (ausgedrückt als P_z -Wert).

Die Zusammensetzung der hier verwendeten Eigelb-SDA-Platten beruht auf einer Veröffentlichung von Rezusta et al., 1991 (223): Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) (4 g Pepton, 8 g Agar, 100 mM Glucose), 0,005 M Kalzium-Chlorid, Kaliumphosphatpuffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 4,3) und 10 Vol-% steriles Eigelb. Das Eigelb wurde steril aus frischen Eiern gewonnen, bei 500 g für 15 min abzentrifugiert und der Überstand dem Medium nach dem Autoklavieren zugegeben.

Um die Phospholipase-Aktivität von *C.-albicans*-Stämmen zu untersuchen, wurden diese in Sabouraud-Dextrose-Medium über Nacht angezogen und mit frischem Medium auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden wenige Mikroliter dieser Zellsuspension auf die Testplatten aufgetropft und bei 30°C und 37°C für 3 - 5 Tage inkubiert.

6.4.2 Anzucht von *C.-albicans*-Stämmen unter Zugabe wachstumshemmender Substanzen

Sowohl zur Untersuchung der *caMLT1*-Expression *in vitro* als auch zur funktionalen *in vitro* Analyse der *caMLT1*-Deletionsmutanten wurden Wachstumstests in Anwesenheit cytotoxischer Substanzen durchgeführt. Hierfür wurden dem entsprechenden Wachstumsmedium (YPD oder SD +/- 100 µg/ml Uridin) subinhibitorische bis inhibitorische Konzentrationen der wachstumshemmenden Substanz zugegeben. Das Wachstum der *caMLT1*-Deletionsmutanten wurde verglichen mit dem der Elternstämme CAI4 und SC5314 auf Agarplatten, in Flüssigkulturmedien (Messung der OD_{600}) oder in Mikrotiterplatten in MHK-(minimale Hemmkonzentration)-Tests. Die getesteten Konzentrationsbereiche lagen für $CdCl_2$ bei 0,062 bis 2 mM, für Amorolfen bei 0,005 bis 0,16 µg/ml, für Terbinafin bei 1 bis 32 µg/ml, für Fluconazol bei

0,5 bis 16 µg/ml, für Ketoconazol bei 0,03 bis 0,96 µg/ml, für Gallensalze bei 0,625 bis 20 % (unter Zugabe von 0,5 M NaCl), für die Gallensäure Deoxycholat bei 0.0073 bis 7,5 % und für CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen) bei 10 bis 160 µM.

Für die MHK-Tests wurden U-förmige Polystyrol-Mikrotiterplatten für 96 Proben (Greiner) verwendet, in die 100 µl Medium in Spalte 2 - 12 vorgelegt wurden. In die erste Spalte wurden 200 µl der in Medium gelösten, wachstumshemmenden Substanz (höchste Konzentration) gegeben und immer 1:2 in die anderen Spalten weiterverdünnt (niedrigste Konzentration in Spalte 11). Spalte 12 blieb leer (nur Medium). Die Stämme wurden über Nacht bei 30°C in YPD-Medium angezogen, dann in dem Testmedium auf 1×10^3 Zellen/ml mittels Zählkammer eingestellt und jeweils 100 µl den Spalten 1 - 12 zugegeben, so dass in jeder Spalte 200 µl Endvolumen vorlag. Jeder Stamm wurde im Duplikat getestet. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm abgedeckt und bei 30°C für 48 h inkubiert. Das Wachstumsverhalten wurde optisch ermittelt. Die MHK ist dabei die Konzentration, bei der per Auge kein Wachstum mehr zu erkennen ist.

Für Toleranztests wurden die zu testenden Stämme sternförmig (von innen nach außen) auf einer Agarplatte (YPD- oder SD-Medium mit Uridin, auf pH 6,0 gepuffert) ausgestrichen und anschließend mittig ein Filterplättchen platziert, das zuvor mit einer inhibitorischen Konzentration einer Testsubstanz getränkt worden war. Hierfür wurden Stocklösungen der Testsubstanzen in Wasser (1 M oder bis zur Sättigung: NiCl₂, CoCl₂, CrCl₂, PbCl₂, Na₃AsO₃, Diamid; 20 % AgNO₃; 2,5 mg/ml Kristallviolett, 20 mg/ml Fluphenazin, 5 mg/ml Brefeldin A, 0,5 mg/ml Amorolfin, 5 mg/ml Fluconazol), in DMSO (2 mg/ml Ketoconazol und Nocodazol) und in Ethanol (2 mg/ml Terbinafin) angesetzt. Die Platten wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstumsverhalten der Stammasstriche in Richtung aufgelegtes Filterplättchen analysiert. Keine Hemmung zeigte sich nach Auftropfen der Lösungsmittel H₂O, DMSO und Ethanol.

7. Molekularbiologische Methoden

7.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels zweier spezifischer Oligonukleotidprimer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (187). Als Template diente hierbei Zellextrakt, isolierte chromosomale oder Plasmid-DNA. Die amplifizierten Fragmente wurden als Hybridisierungs-Sonden verwendet oder fanden ihren Einsatz in Direktsequenzierungs-Reaktionen und Klonierungen. In letzterem Fall wurden durch die Wahl geeigneter Primer Restriktionsschnittstellen in die Fragmentenden eingebracht.

Der PCR-Mix wurde für Fragmente bis zu einer Größe von 4 kb mit der Taq-DNA-Polymerase von Qiagen nach Herstellerangaben angesetzt. Für die Amplifikation größerer DNA-Bereiche oder

Fragmente, die für Klonierungen bestimmt waren, wurde entweder die Elongase (Gibco, bis zu 12 kb) oder die Pfu-Turbo (Stratagene, bis zu 15 kb) verwendet. Beide DNA-Polymerasen besitzen eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrektur falsch inkorporierter Nukleotide erlaubt. Die PC-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Schema:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Denaturierung der DNA	95°C	2 min	1 x
2	Denaturierung der DNA	95°C	0,5-1 min	30 x (2 - 4)
3	Anlagerung des Primes	A_{Temp}	0,5-1 min	
4	Elongation der DNA	72°C oder 68°C*	1 min/kb	
5	Elongation der DNA	72°C oder 68°C*	10 min	1 x

(T_m = Schmelztemperatur des Primers, * = Temperatur für die Elongase)

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer/DNA-Komplexe, lassen sich aus der Länge und dem GC-Gehalt des Oligonukleotids berechnen ($T_m = 69,3 + 0,4 (\% \text{-GC-Gehalt}) - 650 / \text{Primerlänge in bp}$). Im Allgemeinen wurde die Schmelztemperatur nach der Näherungsformel $T_m = (\text{AT-Paare}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{GC-Paare}) \times 4^\circ\text{C}$ berechnet und für die optimale Anlagerungstemperatur (A_{Temp}) des Primers 2 bis 5°C abgezogen. Bei unterschiedlichen A_{Temp} der Primer wurde die niedrigere Temperatur für die Hybridisierung gewählt.

Amplifikation aus Zellextrakt

DNA-Amplifikationen aus Gesamtzellextrakten diente der Überprüfung von Transformanten und wurde unter Verwendung des *Whole-Cell-Yeast-PCR-Kits* (Bio 101) nach folgender Anleitung durchgeführt: Die Zellmenge einer 10-ml-Übernachtskultur (im 15 ml Greiner-Röhrchen) wurden in 100 bis 200 µl Wasser aufgenommen. Von dieser dickflüssigen Suspension wurde 1 µl abgenommen und zu 5 µl *Whole-Cell-Lysis-Lösung*, die zuvor in einem 0,5-ml-Eppendorfgefäß vorgelegt worden war, hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 h (je länger desto besser) bei 37°C sind die Zellen deutlich analysiert. Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden 2,5 µl der zähflüssigen Zell-Lösung mit 38,5 µl Wasser vermischt und für 10 min im Thermocycler bei 95°C erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe des Primer-Prämixes (2,5 µl), der dNTPs (1 µl einer 10 mM Lösung) sowie der Taq-DNA-Polymerase (Qiagen; 5 U / µl; 0,25 µl) inklusive Taq-Reaktionspuffer (5 µl). Die weiteren PCR-Schritte entsprechen dem oben angegebenen Schema, wobei die Schritte 2 - 4 insgesamt 40 x wiederholt wurden.

7.2 DNA-Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden

7.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die schnelle Präparation von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (24) in leicht abgewandelter Form durchgeführt.

1,5 ml einer 5-ml-ÜN-Kultur wurden kurz abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl GTE Lösung (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl / pH8,0, 10 mM EDTA) gut resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden 200 µl einer frisch hergestellten NaOH/SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1 % SDS (*sodium dodecyl sulfat*)) zugegeben, der Ansatz durch Invertieren des Caps gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Neutralisation und Fällung chromosomaler DNA sowie bakterieller Proteine durch Zugabe von 150 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung (29,5 ml Eisessig, KOH-Pellets zugeben bis pH 4,8, mit H₂O auf 100 ml auffüllen, nicht autoklavieren). Der Ansatz wird für 2 sec gevortext und für 5 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand mit Phenol/Chloroform (oder „Neue Rechtschreibung“/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1) einmal ausgeschüttelt, zur Phasentrennung kurz abzentrifugiert und in ein neues Cap überführt. Durch Zugabe von 0,8 ml 95 % Ethanol wurde die Plasmid-DNA gefällt (2 min, RT), für 1 min abzentrifugiert und einmal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Plasmid-Pellet wurde anschließend kurz an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Zum Abbau noch vorhandener RNA-Fragmente wurden 0,5 µl DNase-freie RNase-Lösung (Gibco) zugesetzt. Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Für die Gewinnung reiner bzw. größerer Mengen Plasmid- oder Cosmid-DNA wurde eine Isolierung durch Anionen-Austausch-Chromatographie mittels Qiagen-Kit (QIAGEN-Tip 100 bzw. 500) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

7.2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C.-albicans*-Zellen

Genomische DNA aus *C. albicans* wurde wie folgt isoliert (179): Eine Kolonie des zu verwendenden *C.-albicans*-Stamms wurde in 10 ml Medium (YPD- oder SC-Medium) in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Zellen in ein 15-ml-Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4.000 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml 1 M Sorbitol resuspendiert, in ein 2-ml-Eppendorfcap überführt und mittels einer Tischzentrifuge erneut pelletiert (2 min, 4.000 rpm). Zum Aufbrechen der Pilzzellen wurde das Pellet in 1 ml Lyse-Puffer (1 M Sorbitol, 100 mM Natriumcitrat / pH 5,8, 50 mM EDTA / pH 8,0, 2 % β-Mercaptoethanol, 500 Units/ml Lyticase (Sigma)) aufgenommen und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 10.000 rpm), wurde das Zellpellet in 0,8 ml Proteinase-Puffer (10 ml Tris-Cl / pH 7,5, 50 mM EDTA / pH 7,5,

0,5 % SDS, 1 mg/ml Proteinase K (Sigma)) gut resuspendiert und für mindestens 30 min bei 60°C inkubiert. Die DNA wurde zweimal mit 800 µl und einmal mit 700 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie einmal mit 600 µl Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die obere wässrige Phase wurde mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, die chromosomale DNA durch Invertieren des Caps ausgefällt und mittels eines Glasstabes (gebogene Spitze einer Pasteurpipette) aufgewickelt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurden die DNA-Fäden in 200 µl 1 x TE-Puffer (10 mM Tris-CL / pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst, mit 2 µl DNase-freier RNase (Gibco) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der chromosomalen DNA erfolgte anschließend durch zweimaliges Extrahieren mit je 200 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol und einmaliges Extrahieren mit 200 µl Chlorophorm/Isoamylalkohol. Aus dem wässrigen Überstand wurde die chromosomale DNA durch Zugabe von 200 µl 100 % Ethanol (unvergällt) gefällt, abzentrifugiert oder mittels Glasstab aufgewickelt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 bis 200 µl TE-Puffer gelöst.

7.2.3 Aufreinigen, Fällen und Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch das Phenolisieren wurden Protein-Verunreinigungen aus einer wässrigen, DNA-haltigen Lösung entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol Phenol-Gemisch (Tris-gesättigtes Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol 25:24:1) vermischt und die obere, wässrige Phase anschließend nochmals mit Chlorophorm/Isoamylalkohol 24:1 von Phenolresten gereinigt.

DNA konnte durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M Na-Acetat (pH 4,8) und 2 Vol 100 % Ethanol (unvergällt) aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Nach Fällung über Nacht bei -20°C oder für 15 min bei -80°C wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und vor der Aufnahme in Wasser kurz bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Konzentration der DNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers photometrisch bestimmt (eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht 50 µg/ml). Eine Aussage über die Reinheit der DNA gibt das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten (E) an, wobei $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ nicht kleiner als 1,8 und $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$ nicht kleiner als 2,2 sein sollte (238).

7.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Alle Schritte, die für die Spaltung von DNA-Fragmenten oder für die Aufbereitung von Vektoren und zu klonierender DNA-Fragmente notwendig waren, erfolgten nach Standardvorschriften (238) oder nach den Anleitungen der Hersteller verwendeter Enzyme oder Kits.

DNA-Fragmente oder Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Gibco BRL-Life Technologies, MBI Fermentas oder New England Biolab verdaut. Die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den Enden linearisierter Vektor-DNA erfolgte mit der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (Roche), das Auffüllen überhängender Enden mit dem Klenow-Enzym (Amersham).

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in einem 0,8 - 1,2 % Agarosegel, wobei als Laufpuffer 1 x TAE (Stock 50 x TAE: 242 g Tris-Base + 100 ml 0,5M EDTA, pH 8 + 57,1 ml Eisessig, ad 1 l H₂O) verwendet wurde. Der Ladungspuffer stammte von MBI Fermentas oder wurde selbst hergestellt (15 % Ficoll 400, 0,25 % Orange G, 1 % SDS). Die anschließende Reinigung der Fragmente aus dem Gel erfolgte mit GENE CLEAN (Bio 101) oder dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen).

Zur Ligation der linearisierten und gereinigten DNA und Vektor-DNA wurde ein Ligationsansatz (nach Anleitung der Gibco-T₄-Ligase) hergestellt und für 2 – 4 h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

7.4 Herstellung rekombinanter Plasmide für Genexpressionsanalysen und Stammkonstruktionen

7.4.1 Herstellung einer *MLT1::GFP*-Fusionskassette zur genomischen Markierung des *caMLT1*-Gens

Zur subzellulären Lokalisation von caMlt1p wurde nach einer abgeänderten Version der Methode von Wach und Mitarbeitern (299) das gentechnisch veränderte *GFP**-Gen aus dem Vektor pGFP31 (183) C-terminal mit *caMLT1* fusioniert. Der Vektor pGFP31 enthält die kodierende Region dieses *GFP**-Gens, fusioniert mit dem Terminator (*T_{ACT1}*) des *C. albicans* Actingens (*ACT1*), sowie im Anschluss ein *URA3*-Gen als Selektionsmarker. Mit dem Primerpaar NGFPFUS und URA2 wurde in einer PCR aus dem Vektor pGFP31 ein 2,5-kb-Fragment amplifiziert, das die kodierende *GFP**-Region (ohne das ATG-Startcodon), *T_{ACT1}* und den *URA3*-Selektionsmarker umfasst. Aus isolierter chromosomaler DNA von *C. albicans* CAI4 wurden mit den Oligonukleotiden RMDR1 und XHOABC der *caMLT1*-C-Terminus mit flankierenden Sequenzen amplifiziert (Pos. +4457 bis +5122, Sequenz im Anhang). Nach Verdau mit *SpeI* und *XhoI* (XHOABC-abstammend) erfolgte die Ligation in einen *XbaI/XhoI* verdauten pSK-Vektor (Plasmid pABC600). In einer inversen PCR des Vektors pABC600 mit den Primern CYCFFUS und XBATYCF wurde über den Primer CYCFFUS an das 3'-Ende der *caMLT1*-kodierenden Sequenz eine *MluI*-Site angehängt. Die Position des Primers wurde dabei so gewählt, dass das TAG-Stopcodon gerade nicht mehr

mitamplifiziert wurde. XBATYCF bindet hingegen nach dem Stopcodon in der *caMLT1* flankierenden Region (T_{MLT1}), so dass dort eine *XbaI*-Seite eingebracht werden konnte. Das so amplifizierte Plasmid pABC600 wurde mit dem ebenfalls *MluI/XbaI*-verdauten *GFP*-URA3*-Amplikon (die Erkennungssequenzen wurden über die verwendeten PCR-Primer eingebracht) ligiert und positive Klone nach Transformation in *E. coli* durch Sequenzierung überprüft. Das resultierende Plasmid pGFPABC wurde mit *PstI* und *XhoI* doppelverdaut und die *MLT1::GFP**-Kassette als lineares Fragment in der Transformation eingesetzt. Die *MLT1::GFP**-Kassette ist Abbildung 12 (Kapitel V 2.3) schematisch dargestellt. Sie besteht aus C-terminalen *caMLT1*-Sequenzen, die unter Einbringung eines 27 bp umfassenden Einschubs (*spacer*, eingebracht über NGFPFUS und CYCFFUS) mit dem *GFP**-Gen *inframe* fusioniert sind. Der dahinter geschaltete *caACT1*-Terminator dient als Transkriptionsstop für das fusionierte Gen und *caURA3* als Selektionsmarker.

7.4.2 Herstellung eines *caMLT1*-Expressionsplasmids

Zur Komplementation des Cadmium-hypersensitiven Phänotyps des *ycf1*-negativen *S. cerevisiae*-Stamms JWY53 wurde das *caMLT1*-Gen in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert. Hierfür wurde pJAW50 mit *KpnI* geschnitten, die überhängenden Enden aufgefüllt und dann mit *SpeI* *scYCF1* entfernt. *CaMLT1* [FOXABC-XHOABC] wurde phosphoryliert und später mit *XbaI* geschnitten (bei FOXABC) und das Fragment auf der einen Seite über [*SpeI-XbaI*] und auf der anderen *blunt* in den pJAW50-Rest (= pRS424) ligiert (pMLT424 trägt *caMLT1*-Gen). Die Untersuchung der Expression von *caMLT1* in *S. cerevisiae* in Form von Northernblots zeigte ein starkes *caMLT1*-spezifisches Transkript in JWY53-Zellen, die mit dem Plasmid pMLT424 transformiert worden waren.

7.4.3 Herstellung der *MLT1-URA3*-Blaster-Kassette

Für die Konstruktion einer Mutagenesekassette zur Inaktivierung des *caMLT1*-Gens im *C. albicans*-Stamm CAI4 wurde mit den PCR-Primern FOXABC und ABCREV aus chromosomaler DNA die *caMLT1*-Sequenzen mit umliegenden Bereichen amplifiziert (Pos. -1288 bis +5122, insgesamt 5,9 kb) und nach Verdau mit *XbaI* (Vektor-generiert) und *PstI* in die *Multiple-Cloning-Site* (MCS) des Vektors pSKK kloniert. Da dieser Vektor keine *KpnI*-Erkennungssequenz mehr enthält, konnte nun mittels *NsiI/KpnI*-Doppelverdau des entstandenen Plasmids pC6 ein 1850 bp großes Fragment (Pos. +193 bis +2042, siehe *caMLT1*-Sequenz im Anhang) aus der kodierenden Region des klonierten *caMLT1*-Gens deletiert und durch die *hisG-URA3-hisG*-Markerkassette aus dem Plasmid pMB-7 (87) ersetzt werden. Der so konstruierte Vektor pC6A wurde mit *NotI* und

PstI verdaut und die [5'*MLT1-hisG-URA3-hisG-3'MLT1*]-Kassette als lineares Fragment zur Inaktivierung beider *caMLT1*-Allele im Stamm CAI4 verwendet.

7.4.4 Konstruktion einer *MLT1-MPA^R*-Insertionskassette

Zur Konstruktion der Insertionskassette wurde aus dem Plasmid p37st5C durch *HindIII*-Verdau 2,5 kb der enthaltenen *caMLT1*-Gensequenz deletiert. Aus dem Vektor pGK352 wurde durch *XbaI*-Verdau ein 2,7 kb umfassendes Fragment ausgeschnitten, das die *MPA^R*-kodierenden Gensequenzen sowie 5'-(Pos. -601 bis -1)-stromaufwärts und 3'-(Pos. +1815 bis +2102)-stromabwärts angrenzende Sequenzen enthält. Die Schnittenden der Fragmente wurden mit Klenow partial aufgefüllt und ligiert. Das so entstandene rekombinante Plasmid p5CMPA^R wurde mit *SaII* (Vektor generiert) und *PstI* doppelverdaut und die *MLT1-MPA^R*-Insertionskassette als lineares Fragment in den wildtypischen *C. albicans*-Stamm SS transformiert.

7.4.5 Herstellung der *MLT1-MPA^R*-Blaster-Kassette

Zur Konstruktion *camlt1*-negativer Mutanten im prototrophen Wildtypstamm *C. albicans* SC5314 wurde im Vektor pC6A das *URA3*-Gen durch das *MPA^R*-Gen ersetzt, der *MPA*-resistenten Form des *C. albicans* *IMH3*-Gens. Das pC6A-Plasmid wurde hierfür mit dem *URA3*-spezifischen Primerpaar MLU5URA und 3URANHE in einer divergenten PCR amplifiziert und das Amplikon mit *MluI/NheI* doppelverdaut. Es folgte eine Ligation mit einem *MluI/XbaI*-doppelverdauten, das *MPA^R*-Gen umfassenden Fragment (*MPA^R*-kodierende Gensequenzen mit 5'-(Pos. -601 bis -1)-stromaufwärts und 3'-(Pos. +1815 bis +2102)-stromabwärts angrenzenden Sequenzen), das durch PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar IMHMLU und IDHBXR aus dem Vektor pGK352 erhalten wurde. Der entstandene Vektor pIC11 trägt die *hisG-MPA^R-hisG*-Blaster-Kassette flankiert von *caMLT1*-spezifischen 5'-(Pos. -1288 bis +193)- und 3'-(Pos. +2042 bis +4597)-Bereichen.

Eine zweite *MPA^R*-Markerkassette wurde hergestellt durch divergente PCR-Amplifikation des pC6-Plasmids mit den *caMLT1*-spezifischen Primern NHEKNUT und KPN4390, wodurch 2584 bp in pC6 aus *caMLT1* deletiert wurden (Pos. +321 bis +2906). Das amplifizierte Vektorfragment wurde *NheI/KpnI* (beide Vektor-generiert) doppelverdaut und mit dem aus pIC11 durch *XbaI*-Verdau und *KpnI*-Partialverdau (*MPA^R* beinhaltet eine *KpnI*-Schnittstelle) gewonnenen *MPA^R*-Blaster-Fragment ligiert. Das erhaltene rekombinante Plasmid wurde als pABC2 bezeichnet.

Beide Mutagenesekassetten wurden mittels *NotI* und *PstI* aus pIC11 bzw. pABC2 geschnitten, gelelektrophoretisch aufgereinigt und als lineares Fragment in Transformationen eingesetzt.

7.4.6 Komplementation der *camlt1/camlt1*-Mutation

Die Komplementation der *camlt1/camlt1*-Mutation erfolgte durch Reintegration eines funktionalen *caMLT1*-Gens an die Position eines *camlt1*-Allels unter Verwendung des *MPA^R*-Markers zur Selektion der Transformanten. Für die Konstruktion der Transformationskassette wurden zunächst zwei DNA-Fragmente des *caMLT1*-Gens mit den Primerpaaren FOXABC und XHOABC (Fragment 1, Pos. -1288 bis +5122) sowie RMDR1 und XHOAPA (Fragment 2, Pos. +4457 bis +5869) aus genomischer SC5314-DNA amplifiziert. Nach Doppelverdau von Fragment 1 mit den Restriktionsenzymen *XbaI* (Primer-generiert) und *PstI* sowie von Fragment 2 mit *PstI* und *ApaI* (Primer-generiert) wurden beide in den mit *XbaI/ApaI* geschnittenen Vektor pSKK ligiert. Das entstandene Plasmid pABC111 beinhaltet so die *caMLT1*-Gensequenz zusätzlich 1290 Basenpaaren des 5'-angrenzenden Bereichs sowie 1030 Basenpaaren des 3'-angrenzenden Bereichs. Der *MPA^R*-Selektionsmarker wurde mit dem Primerpaar IMHSF und IDHBXR aus dem Vektor pGK352 amplifiziert und nach Doppelverdau mit *SalI* (Primer generiert) und *XbaI* gemeinsam mit dem *SpeI/ApaI*-Fragment von pABC111 (umfasst 260 bp der *caMLT1* C-terminalen Region zusätzlich Terminator) zwischen die *XhoI*- und *ApaI*-Schnittstellen des Plasmids pABC111 kloniert. Aus dem so entstandenen Vektor pCOMP wurde die *MLT1-MPA^R*-Komplementationskassette mittels *NotI* und *ApaI* ausgeschnitten und nach Gelreinigung zur Transformation verwendet.

7.4.7 Herstellung der *PLB5-URA3*-Blaster-Kassette

Mit dem Primerpaar AMPLI1 und AMPLI3 wurde aus isolierter chromosomaler *C.-albicans*-DNA ein 3091 bp umfassendes Fragment amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (durch AMPLI1 eingebracht an Pos. -937 der *caPLB5*-Sequenz im Anhang) und *BamHI* (liegt innerhalb der *caPLB5*-Sequenz an Position +2154) verdaut und in den pSKK-Vektor (pBluescript SK ohne *KpnI*-Schnittstelle) ligiert um das rekombinante Plasmid pKP1 zu erhalten. Mittels *KpnI/PstI*-Doppelverdau konnte nun ein 1100 bp großes Fragment (Pos. +281 bis +1381) aus der kodierenden *caPLB5*-Region deletiert werden und durch die *hisG-URA3-hisG*-Markerkassette des Plasmids pMB-7 (87) ersetzt werden. Aus dem so konstruierten Vektor pPU10 wurde nun durch *HindIII*- und *NotI*-Verdau die [5'*PLB5-hisG-URA3-hisG*-3'*PLB5*]-Kassette als lineares Fragment gewonnen und zur Inaktivierung beider *caPLB5*-Allele im Stamm CAI4 verwendet.

7.4.8 Herstellung des *PLB5-MPA^R-Tag-Flippers*

Zur Herstellung von *caplb5*-Nullmutanten im wildtypischen Stamm *C. albicans* ATCC44808 wurden Sequenz-(*Tag*)-markierte Disruptionskassetten konstruiert, die den dominanten Selektionsmarker *MPA^R*, die induzierbare Sequenz-spezifische Rekombinase *FLP** (269, 312) sowie *caPLB5*-spezifische flankierende Regionen enthalten. Hierfür wurden zunächst die *NotI*- und *XhoI*-Schnittstellen im rekombinanten, *caPLB5*-Fragment (Pos. -937 bis +2154) tragenden Plasmid pKP1 inaktiviert. Das resultierende Plasmid pKPNX25 wurde dann in einer divergenten PCR mit den Primern XNTAG und NOTTAG eingesetzt. Das amplifizierte Produkt dieser divergenten PCR wurde anschließend mittels *XhoI* und *NotI* doppelverdaut und mit dem *MPA^R*-Flipper (*FRT-SAP2P-FLP*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT*) ligiert, welcher zuvor mittels *XhoI/NotI*-Doppelverdau aus pSF11 (312) gewonnen wurde. Die Ligation wurde in *E. coli* transformiert und positive Transformanten, die das Plasmid enthielten, wurden gepoolt. Der aus dem Transformantengemisch isolierte Plasmid-Pool (pDIS-Pool) wurde mit *ApaI* und *SacI* doppelverdaut. Nach anschließender Gelelektion der [*PLB5-MPA^R-Tag-Flipper*]-Disruptionskassette erfolgte die Transformation des linearen Fragments in *C. albicans* ATCC44808 zur Inaktivierung beider *caPLB5*-Allele.

7.4.9 Komplementation der *caplb5/caplb5*-Mutation im ATCC44808-Stamm

Mit Hilfe des dominanten Selektionsmarkers *MPA^R* konnte die *caplb5*-Nullmutation durch chromosomale Reintegration einer intakten *caPLB5^{LK}*-Genkopie (Allel L₅₇K₂₀₈) komplementiert werden. Zu diesem Zweck wurde mittels AMPLI1 und AMPLI6 in einer PCR das *caPLB5^{LK}*-Gen und dessen Promotor/Terminator-Region aus isolierter chromosomaler *C. albicans* ATCC44808-DNA isoliert. Nach Verdau mit *HindIII* und *SpeI* (beide Spaltstellen sind Primer-generiert) wurde das Amplikon in den ebenfalls *HindIII/SpeI*-verdauten Vektor pKPNXS kloniert, wodurch es zur Substitution der Plasmidinsertion mit dem funktionalen *caPLB5^{LK}*-Gen (Pos. -951 bis +2696) kam. Der pKPNXS-Vektor entstand zuvor aus dem pKPNX25-Plasmid durch Inaktivierung der *SalI*-Schnittstelle. Das aus der Ligation resultierende Plasmid p4486 wurde anschließend mit *SalI* (eingebracht durch den Primer AMPLI6) und *SacII* (Vektor-generiert) doppelverdaut. Aus einem Disruptionsplasmid des pDIS-Pools wurde mittels *XhoI/SacII*-Doppelverdau der *MPA^R-Tag-Flipper* zusammen mit einem 3'-Fragment des *caPLB5*-Gens isoliert und in den vorverdauten p4486-Vektor ligiert. Der entstandene Vektor pPIKOM enthält somit die Komplementationskassette (*PLB5^{LK}-FRT-SAP2P-FLP*-T_{ACT1}-MPA^R-FRT-tag-3'PLB5*), die nach Verdau mit *ApaI* und *SacI* und anschließender Gelreinigung als lineares Fragment in die Transformation eingesetzt wurde.

7.5 Genetische Transformationsmethoden

7.5.1 Transformation von *E.-coli*-Zellen

Vektoren und Ligationsansätze wurden in *E. coli* K12 mittels Elektrottransformation nach Standardprotokoll (11) eingebracht. 50 ml Zellkultur (LB-Medium, OD₆₀₀ 0,7) wurden hierfür viermal mit eiskaltem, sterilem Wasser vorsichtig gewaschen und abzentrifugiert (4°C, 3000 rpm, 5 min). Die Zellen wurden dabei stets auf Eis gehalten. Nach den Zentrifugationsschritten wurden die Zellen in 50 - 100 µl Wasser aufgenommen, so dass die gewonnene Zellmenge für 3 - 4 Transformationen ausreicht. Die kompetenten *E.-coli*-Zellen wurden stets frisch hergestellt.

Für die Transformation wurden zu 50 µl kompetenter *E.-coli*-Zellen entweder 0,1 - 0,5 µg Plasmid-DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes zugegeben, gut vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm, EQUIBIO) überführt (auch hier erfolgten alle Schritte auf Eis). Das Elektroporationsgerät wurde auf 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm eingestellt. Die elektrotransformierten Zellen wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium (2 % Bacto-Tryptone, 0,5 % Hefe-Extrakt, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,5 mM KCl) aufgenommen und für 30 - 60 min bei 37°C inkubiert. 100 µl, 300 µl und 700 µl der Kultur wurden jeweils auf eine Selektionsplatte (LB mit entsprechendem Antibiotikum und gegebenenfalls Indikator) ausplattiert.

7.5.2 Transformation von Pilzzellen

Zur Herstellung elektroporationskompetenter *C.-albicans*- bzw. *S.-cerevisiae*-Zellen wurde eine Methode herangezogen, die aus einem *S.-cerevisiae*-Protokoll (11) hervorging und von Köhler und Mitarbeitern für *C. albicans* etabliert wurde (141). Hierfür wurden 10 ml YPD-Medium (bei Transformation eines *ura3*-negativen *C.-albicans*-Stammes mit Zugabe von 100 µg/ml Uridin) mit einer Kolonie des zu transformierenden Stamms beimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler angezogen. Von dieser Vorkultur wurden am nächsten Abend 5 µl abgenommen, in 100 ml frischem YPD-Medium (gegebenenfalls mit 100 µg/ml Uridin, s. o.) verdünnt und bei 30°C unter Schütteln weiterkultiviert bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 - 2,0 (optimal 1,5). Die Kultur wurde in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Nach Aufnahme der Pellets in 8 ml sterilem Wasser und Zugabe von je 1 ml 10 x TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5) und 1 M Lithiumacetat pH 7,5 (mit Essigsäure eingestellt) wurden die Zellsuspensionen für 45 min bei 30°C unter leichtem Schütteln (150-180 rpm) inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 1 M DTT wurden die Zellen für weitere 30 min weiterinkubiert. Anschließend wurden 50 ml steriles kaltes Wasser pro Greiner-Röhrchen zugegeben, durch Invertieren der Röhrchen die Suspension gemischt und abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C). Im zweiten

Waschschritt mit 50 ml sterilem, kaltem Wasser wurden die beiden Zellpellets vereint, wieder abzentrifugiert und nochmal mit 5 ml sterilem, kaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Das vereinte Zellpellet wurde schließlich in ca. 100 µl sterilem, kaltem 1 M Sorbitol aufgenommen (reicht für 4 - 5 Transformationen).

Für die Transformation der kompetenten *C.-albicans*-Zellen durch Elektroporation wurden 50 µl der Zellsuspension mit 5 µl (1 - 5 µg) eines linearisierten, Selektionsmarker-tragenden DNA-Fragments vermischt und in eine vorgekühlte 0,2-cm-Elektroporationsküvette überführt. Für die Transformation kompetenter *S.-cerevisiae*-Zellen wurden 50 µl Zellsuspension mit 0,1 - 0,5 µg Plasmid-DNA gemischt. Die Elektroporation wurde mit dem Elektroporationsgerät bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ohm durchgeführt. Zur Kontrolle wurde eine Transformation nur mit Wasser und ohne DNA durchgeführt. Nach erfolgter Elektrotransformation wurden die Zellen mit 1 ml 1 M Sorbitol versetzt und sofort à 100 µl auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

7.5.3 Methoden zur Selektion positiver Transformation

Selektion Plasmid-tragender S.-cerevisiae-Klone

Zellen des *trp1*-negativen Stamms *S. cerevisiae* JWY53, die mit einem *TRP1*-Gen-tragenden Plasmid transformiert wurden, ließen sich auf SD-Agarplatten ohne Tryptophan selektionieren. Nach Wachstum bei 30°C für ca. zwei Tage ließen sich prototrophe Transformanten isolieren. Tryptophan-positive Klone wurden auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids untersucht (Plasmidisolation aus Hefezellen nach (11)).

Selektionsmethoden zur Geninaktivierung mittels URA3-Blaster im Stamm CAI4

Nach Transformation auxotropher, *ura3*-negativer *C.-albicans*-Stämme mit einem DNA-Fragment, das als Selektionsmarker ein intaktes *C. albicans URA3*-Gen enthielt, konnten *URA3*-prototrophe Klone nach 3 - 5 Tagen Inkubation bei 30°C auf SD-Platten ohne Uridin gepickt und nochmals auf Selektionsplatten überstrichen werden. Gewachsene und somit *URA3*⁺-Klone wurden mittels Southernblot auf die korrekte Integration der [*hisG-URA3-hisG*]-Markerkassette in ein Allel des Zielgens überprüft. Nach erfolgreicher Inaktivierung des ersten Allels musste zur Konstruktion einer homozygoten Mutante der Marker wieder aus dem Genom entfernt werden, so dass die Deletionskassette in einer weiteren Transformationsrunde in das zweite Allel inseriert werden konnte. Zellen der *URA3*-positiven Transformanten, die das *URA3*-Gen durch intrachromosomale homologe Rekombination zwischen den beiden *hisG*-Repeats spontan verloren hatten und somit wieder *ura3*-negativ waren, konnten durch Wachstum auf 5-Fluor-Orotidylsäure-(FOA)-haltigen Platten selektioniert werden (28). Für Zellen mit intaktem *URA3*-Gen ist FOA toxisch, da das

URA3-Genprodukt (OMP-Decarboxylase) neben dem natürlichen Substrat OMP auch FOA verwenden kann, das in das toxische 5-Fluor-UMP umgewandelt wird und zum Zelltod führt. Die für das Zielgen heterozygoten und *URA3*-positiven Stämme wurden über Nacht bei 30°C in YPD-Medium zuzüglich 50 µg/ml Uridin gezüchtet und zu je 100 µl auf FOA/Uridin-haltigen Platten ausplattiert. FOA-resistente Klone wurden nach vier Tagen Wachstum bei 30°C gepickt und nochmals auf FOA-Platten überstrichen. Zur Herstellung von Nullmutanten wurde ein weiterer Transformationsschritt mit der Deletionskassette angeschlossen, wobei der *URA3*-Marker in das zweite, bislang noch wildtypische Allel des Zielgens durch homologe Rekombination integriert wurde.

Selektionsmethoden zur caMLT1-Geninaktivierung mittels MAP^R-Blaster im Stamm SC5314

Bei Transformationen von wildtypischen *C.-albicans*-Stämmen mit einem DNA-Fragment, das als Selektionsmarker das *MPA^R*-Gen enthielt, wurden Mykophenoläure resistente Klone auf 10 µg/ml *MPA*-haltigen SD-Agarplatten von nichttransformierten Zellen des Ausgangsstamms selektioniert. Nach 5 - 7 Tagen konnten gewachsene Kolonien gepickt und auf 10 µg/ml *MPA*-haltige SD-Agarplatten überstrichen werden. Zur Kontrolle und Gewinnung von Reinkulturen wurden diese Klone nochmals auf Platten ausgestrichen, die 1 µg/ml und 10 µg/ml Mykophenolsäure enthielten. Selektionierte Transformanten wurden mittels Southernhybridisierung isolierter genomischer DNA auf die korrekte Insertion der Blasterkassette in ein Allel des Zielgens untersucht.

Vor Inaktivierung des zweiten *caMLT1*-Allels bzw. vor Reintegration des wildtypischen Gens in Nullmutanten zur Herstellung von Komplementanten mussten Klone isoliert werden, die den *MPA^R*-Marker wieder verloren hatten. Bei Verwendung des *MPA^R*-Blasters zur Herstellung von Mutantenstämmen erfolgte der Verlust des Markers spontan durch intrachromosomale homologe Rekombination zwischen den beiden *hisG*-Repeats. Da es bei Verwendung des *MPA^R*-Gens als Selektionsmarker keine positive Selektionsmethode für den Verlust des Markers gibt, wie es z. B. bei der *URA3*-Blastermethode möglich ist, wurden zur Detektion möglicher *MPA*-sensitiver Rekombinanten die entsprechenden *MPA^R*-positiven Mutanten über Nacht in SD-Medium angezogen und auf große, 1 µg/ml *MPA*-haltige SD-Agarplatten ausplattiert. Die Zellen wurden nur so dicht ausplattiert, dass eine Unterscheidung zwischen großen, *MPA*-resistenten Kolonien und kleinen, *MPA*-sensitiven Kolonien möglich war. Als Kontrolle wurde auf eine Platte ein Gemisch aus *MPA*-resistenten und -sensitiven *C.-albicans*-Stämmen ausplattiert. Putative Rekombinanten wurden gepickt und auf 1 und 10 µg/ml *MPA*-Platten überstrichen. Nur Klone, die ein Wachstum in Gegenwart der geringen *MPA*-Konzentration zeigten, nicht aber bei 10 µg/ml *MPA*, wurden für weitere Analysen verwendet.

Selektionsmethoden zur caPLB5-Geninaktivierung mittels MPA^R-Flipper im Stamm ATCC44808

Die Selektion von *C.-albicans*-Klonen, die mit dem *PLB5-MPA^R-Tag*-Flipper transformiert wurden, erfolgte, wie schon im vorgehenden Kapitel beschrieben, auf MPA-haltigem SD-Agarplatten. Positive Klone wurden mittels Southernhybridisierungen auf die korrekte Insertion der Disruptionskassette hin untersucht.

Nach erfolgreicher Insertion des *PLB5-MPA^R-Tag*-Flippers in ein Allel des zu deletierenden Zielgens musste der *MPA^R*-Marker wieder aus dem Genom entfernt werden. Bei Verwendung des *MPA^R*-Flippers ist die Deletion des Markers aus dem Genom der Zelle durch die FLP-vermittelte Rekombination der den Flipper flankierenden FRT-Sequenzen möglich (312). Hierfür wurden die entsprechenden *MPA^R*-positiven Mutanten über Nacht bei 30°C in YCB-BSA-Medium angezogen und anschließend auf MPA-haltigen SD-Agarplatten in den Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ ausplattiert. Bei der verwendeten MPA-Konzentration in den Platten von 1 bis 2,5 µg/ml ließen sich kleine, MPA-sensitive Klone, die den *MPA^R*-Marker wieder verloren haben, von großen, MPA-resistenten Klonen gut unterscheiden. Putative Rekombinanten wurden gepickt und auf 1 und 10 µg/ml MPA-Platten überstrichen. Nur Klone, die ein Wachstum in Gegenwart der geringen MPA-Konzentration zeigten, nicht aber bei 10 µg/ml MPA, wurden für weitere Konstruktionen *caplb5*-negativer Mutanten (oder *caPLB5*-positiver Komplementanten) verwendet.

Mittels PCR und direkter Sequenzierung der *Tag*-markierten Integrationsstellen konnte in den MPA-sensitiven hetero- und homozygoten *caplb5*-Mutanten die Sequenz der nach Marker-Exzision im Zielgen verbliebenen *Tags* bestimmt werden.

7.6 Southern Hybridisierungen

7.6.1 Nicht-radioaktive Hybridisierung chromosomaler DNA-Fragmente

Das nach E. M. Southern benannte Southernblot-Verfahren (264) diente der Identifizierung von DNA-Fragmenten. Hierbei wurden 10 µg isolierte chromosomale DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und zusammen mit einem DNA-Größenmarker auf einem 0,8 % TAE-Agarosegel bei 40 Volt für ca. 16 h aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, so dass später die Größe hybridisierender Fragmente ungefähr bestimmt werden konnte. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mittels Vakuum-Blotter (Pharmacia) aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B, PALL) wie folgt transferiert: Depurinierung der DNA für 15 min mit Lösung A (0,25 M HCL-Lösung; Vakuum wurde auf „50“ eingestellt), Denaturierung der DNA für 15 min mit Lösung B (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und Transfer der DNA für 90 min mit 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Citrat, pH 7). Mittels eines UV-

Crosslinkers wurde die DNA auf der Membran fixiert und anschließend für 1 h bei 42°C im Hybridisierungssofen vorhybridisiert. Das Ansetzen der Hybridisierungslösung und die Markierung der Sonde (200 ng eines ca. 1 kb großen DNA-Fragments) mit Peroxidase erfolgte nach Angaben des ECL-Labeling-and-Detection-Kits (Amersham). Nach der Hybridisierung ÜN bei 42°C wurde die Membran wie folgt gewaschen: 1 x 5 min bei 42°C im Hybridisierungssofen mit 50 ml 5 x SSC-Lösung, 1 x 20 min und 2 x 10 min bei 42°C im Hybridisierungssofen mit 50 ml vorgewärmten Waschpuffer 1 (0,5 x SSC, 0,4 % SDS, 6 M Harnstoff), 2 x 5 min bei RT in einer Schale mit 200 ml 2 x SSC. Die Detektion der hybridisierten DNA-Fragmente erfolgte nach Inkubation für 1 min in ECL-Detektionslösung und Auflegen eines ECL-Films in einer Exponierkassette für 5 min. Je nach Stärke der Signale erfolgte eine weitere, kürzere oder längere Exponierung mit einem neuen ECL-Film. Für eine mögliche Wiederverwendung der Membran wurde diese zusammen mit der ECL-Detektionslösung in eine Folie eingeschweißt und bei RT für mindestens einen Tag aufbewahrt, um die restlichen Signale zu eliminieren. Ein sofortiges Strippen der Nylonmembran war möglich durch Behandlung mit einer kochenden 0,5 % SDS-Lösung, die bis zur Abkühlung auf RT auf der Membran verblieb und dann mit 2 x SSC abgewaschen wurde. Die Hybridisierung konnte dann mit der Vorhybridisierung erneut beginnen.

7.6.2 Radioaktive Hybridisierung einer Fosmidgenbank

Ein abgewandeltes Verfahren ermöglicht die Untersuchung einer großen Anzahl von Klonen auf das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Abschnitts. Hierbei wird die genomische DNA bakterieller Kolonien direkt auf einer Nylonmembran fixiert, ohne vorher elektrophoretisch auf einem Gel aufgetrennt zu werden.

Für die Hybridisierung der *C.-albicans*-Fosmidgenbank mit einer *caMLT1*- und *caPLB5*-spezifischen DNA-Sonde lagen bereits Membranen mit geblotteten Kolonien vor. Diese Filter wurden in 6 x SSC getränkt und zur Vorhybridisierung im Rotationsofen mit 30 ml Hybridisierungslösung (50 % deionisiertes Formamid, 6 x SSC, 0,05 x Block-Reagent (*1 x Stock: 5 % Trockenmilchpulver, 0,02 % Na-Azid*)) für mindestens 2 h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde (50 - 100 ng) zugegeben und ÜN bei 42°C hybridisiert.

Die Sonde wurde wie folgt markiert (Random-Primers-DNA-Labeling-System, Gibco): Ein ca. 1 kb großes DNA-Fragment wurde in 23 µl Wasser für 10 min bei 100°C aufgekocht und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 6 µl dNTP-Mix (je 2 µl dCTP, dGTP und dTTP), 15 µl Random-Primer-Puffer, 5 µl [α -³²P]dATP (3.000 Ci/mmol, 10 µl Ci/µl) und 1 µl Klenow erfolgte eine zwei

stündige Inkubation bei 25°C, die mit der Zugabe von 5 µl Stoppuffer gestoppt wurde. Vor Zugabe der markierten Sonde muss diese nochmals bei 100°C für 5 min aufgeköcht werden.

Nach der ÜN-Hybridisierung wurden die Membranen wie folgt gewaschen: einmal 15 min und einmal 25 min bei 42°C mit Lösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS), einmal 50 min bei 56°C mit Lösung 2 (1 x SSC, 0,1 % SDS) und einmal 30 min bei 56°C mit Lösung 3 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS). Es folgte die Detektion mittels auflegen eines Röntgenfilms für 12 h bei -20°C. Je nach Signalstärke konnte nochmals ein Film aufgelegt werden für kürzere oder auch längere Zeit (bis zu mehreren Wochen).

Zur Wiederverwendung der Genbank-tragenden Membranen wurden diese nach erfolgter Hybridisierung und Signaldetektion wieder gestrippt. Hierfür wurden die Filter für 2 h im Hybridisierungssofen bei 80°C mit 1 x SSC und 0,1 % SDS inkubiert und zur Aufbewahrung in der selben Lösung in eine Folie eingeschweißt.

7.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C.-albicans*-Stämmen erfolgte nach einer Methode mit heißem, saurem Phenol (11). Alle zur RNA-Gewinnung und -Analyse verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

100 µl einer 30°C YPD-ÜN-Kultur von *C. albicans* wurden in 10 ml eines entsprechenden Mediums verdünnt und bis zur gewünschten Wachstumsphase angezogen. Die Kultur wurde in ein 50 ml fassendes Greinerröhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 4.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml H₂O resuspendiert, in ein 2-ml-Eppendorfcap überführt und erneut abzentrifugiert. Bei Bedarf konnte das Zellpellet auf Ethanol/Trockeneis schnell eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt werden. Für die Lyse des Zellpellets wurde dieses in 600 µl TES-Puffer (10 mM Tris-Cl / pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS), 1 µl RNase Inhibitor (Roche) und 10 mM DTT gut gelöst und bis zur Weiterbehandlung auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 600 µl vorgewärmtem, saurem (mit H₂O ausgeschütteltes) Phenol wurde die Suspension 10 sec gevortext und für 60 min bei 65°C inkubiert. Hierbei war es wichtig weiterhin alle 10 - 15 min zu vortexen, um einen guten Zellaufschluss zu erhalten. Anschließend wurde der Ansatz für 10 sec in Ethanol/Trockeneis eingetaucht und für 5 min abzentrifugiert. Etwa 600 µl der wässrigen Phase wurden in ein neues Cap mit vorgelegten 600µl saurem Phenol überführt, 10 sec gevortext, 10 sec in Ethanol/Trockeneis getaucht und 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die RNA einmal mit neutralem (mit Tris-Cl pH 7,5 ausgeschütteltem) Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol und einmal mit Chlorophorm/Isoamylalkohol extrahiert. Das Ausfällen der RNA aus der wässrigen Lösung erfolgte in 1 ml 100 % unvergälltem Ethanol und 40 µl 3 M Na-Acetat / pH 5,2 durch

Eintauchen in Ethanol/Trockeneis für 5 min. Nach dem Pelletieren der RNA (5 min Zentrifugation) und einem Waschschrift in 70 % Ethanol wurde die RNA an Luft kurz getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt (OD₂₆₀ 1,0 entspricht 40 µg/ml), wobei das Verhältnis von E_{260nm}/E_{280nm} 2,0 sein sollte. Mit dieser Isolierungsmethode erhielt man 200 - 300 µg RNA. Die RNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

7.8 Northern Hybridisierung

Je 10 - 30 µg RNA wurden in einem 1,2 % Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch bei 150 Volt für 3 h aufgetrennt. Hierfür wurden 4,2 g Agarose in 304,5 ml H₂O aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt und vermischt mit 10,5 ml 37 % Formaldehyd sowie 35 ml 10 x MOPS-Puffer (41,8 g MOPS in 800 ml H₂O lösen, auf pH 7 mit 5 N NaOH einstellen, 16 ml 3 M Na-Acetat / pH 5,2 und 20 ml 0,5 M EDTA zugeben, auf 1 l mit H₂O auffüllen). Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Vor dem Beladen des Gels wurden die RNA-Proben in 11,25 µl H₂O aufgenommen und mit 5 µl 10 x MOPS-Puffer, 8,75 µl 37 % Formaldehyd und 25 µl deionisiertes Formamid vermischt. Nach 15 min Inkubation bei 55°C wurden noch 10 µl Formaldehyd-Auftragepuffer (11) zugegeben. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel kurz mit H₂O gespült und für 45 min in 500 ml 10 x SSC geschwenkt. Mittels Kapillarblot-Methode (11) wurde anschließend die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) transferiert und durch UV-Licht fixiert. Durch Färben der membrangebundenen RNA mit Methylenblau (0,03 % in 0,3 M Na-Acetat / pH 5,2) wurde die Transfereffizienz und die gleichmäßige Beladung des Gels (ersichtlich anhand der 18S- und 26S-rRNA-Banden) kontrolliert. Anschließend wurde die Membran wieder entfärbt durch Waschen mit 1 x SSC und 0,1 % SDS bei 65°C für 30 min.

Die Membran wurde für 4 h bei 65°C mit 1 ml / 10 cm² Hybridisierungslösung (3 x SSC, 5 x Denhardt's (*Stocklösung 50 x Denhardt's: 1 % Ficoll, 1 % BSA, 1 % Polyvinyl-Pyrrolodone*), 0,1 % SDS, 50 µg/ml Lachssperma-DNA von Sigma, 10 mM Tris-Cl / pH 8) im Rotationsofen vorhybridisiert und ÜN mit frischer Hybridisierungslösung und radioaktiv markierter DNA-Sonde (Random-Primers-DNA-Labeling-System von Gibco) bei 65°C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde der RNA-Blot mit 3 x SSC und 0,1 % SDS zuerst dreimal für 30 min bei 65°C im Röhrchen gewaschen und anschließend zweimal für 30 min in einer Schale geschwenkt. Es folgte die Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms (-80°C für mindestens 16 h) oder Einsatz eines Cyclone Phosphorimagers (Packard Bio-Science).

Zur Messung relativer Intensitäten (RI) detektierter Transkriptbanden wurde die „OptiQuant™ Image Analysis Software“ (Packard Instrument Company, CT, USA) zu Hilfe genommen. Je Signal wurde nach Abzug des Hintergrunds die Summe der Intensitätseinheiten aller Pixel

innerhalb einer Region ermittelt und pro mm^2 angegeben (Net DLU (*digital light units*)/ mm^2). Diese wurden zur semiquantitativen Bestimmung der RI mit dem entsprechenden, durch Rehybridisierung des Blots ermittelten, Aktinsignals standardisiert. Anschließend erhielt ein ausgewählter Messwert den RI-Wert 1. Alle weiteren Messwerte wurden darauf abgeglichen.

7.9 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung sowie Überprüfung von Nukleotidsequenzen erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger und Mitarbeitern (239) unter Verwendung des Thermo-Sequenase-fluorescent-labelled-7deAza-dCTP-Kit (Amersham). Der Reaktionsmix für die Cycle-Sequenzierung wurde nach den Angaben des Herstellers angesetzt: 100 ng pro 1 kb Doppelstrang(ds)-DNA werden mit 1 pmol fluoreszenzmarkierten Primer (IRD800, MWG Biotech) in einem Gesamtvolumen von 13 μl Wasser aufgenommen. Anschließend werden 3 μl dieses Prämixes zu je 1 μl Terminationsmix (je für die Basen A, C, G und T) gegeben und mit Paraffinöl überschichtet. Die vier Ansätze werden zur DNA-Amplifikation in einen Thermocycler gegeben:

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Denaturierung der DNA	95°C	2 min	1 x
2	Denaturierung der DNA	95°C	15 sec	30 x (2 - 4)
3	Anlagerung des Primers	T _m + 3°C	15 sec	
4	Elongation der DNA	70°C	15 sec	

(T_m = Schmelztemperatur des Primers)

Die anschließende Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (1,5 μl der PCR-Reaktion + 3 μl Gel-Ladungspuffer). Die Daten wurden mit dem automatischen Sequenziergerät LiCor 4000 der Firma MWG Biotech analysiert.

Als Template diente in den Sequenzierreaktionen entweder aufgereinigte Plasmid-DNA oder im Fall der Direktsequenzierung über den QIAquick-PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigte PCR-Produkte. Zur Sequenzanalyse und -überprüfung von klonierten DNA-Fragmenten wurden diese von beiden Richtungen mit den fluoreszenzmarkierten Primern UNIVERSAL und REVERSE sequenziert. Die Bestimmung der DNA-Sequenzabfolge des pl37pstI-Inserts (*caPLB5*- und *caMLT1*-tragender genomischer Bereich aus *C. albicans*) erfolgte unter Zuhilfenahme des Plasmids pSC3732 sowie hergestellter Subklone beider Plasmide (siehe auch Tabelle 4):

Subklonierung des Plasmids *pl37pstI*

Der Lambda FixII Phagen-Subklon *pl37pstI* wurde zum einen mit der Restriktionsendonuklease *ClaI* und zum anderen mit *HindIII* verdaut. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden auf einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt und eluiert. Die Religation der Vektor-tragenden Fragmente ergab für das 8-kb-Fragment aus der *ClaI*-Spaltung das Plasmid *p37st8C* und für das 7-kb-Fragment aus dem *HindIII*-Verdau das Plasmid *p37st7H* (Abb. 4). Die restlichen Restriktionsfragmente, die Teile des *pl37pstI*-Inserts umfassen, wurden in den mit *ClaI*- bzw. *HindIII*-verdauten Vektor *pSK* ligiert und ergaben die Plasmide *p37st5C* (5 kb *ClaI/ClaI*-Insert), *p37st15H* (1,5 kb *HindIII/HindIII*-Insert) und *p37st1H* (1 kb *HindIII/HindIII*-Insert).

Subklonierung des Plasmids *p37st7H*

Das Plasmid *p37st7H* wurde einem weiteren Verdau mit *PstI* und *MunI* unterzogen. Die aufgereinigten Restriktionsfragmente wurden in *pSK* kloniert, der für die 0,3 kb, 1,2 kb und 1,8 kb großen *MunI/MunI*-Fragmente *EcoRI* und für das 1-kb-*PstI/MunI*-Fragment *PstI/EcoRI* verdaut vorlag. Daraus resultierten die Plasmide *p7Hst03M*, *p7Hst12M*, *p7Hst18M* und *p7Hst1M* (Abb. 4).

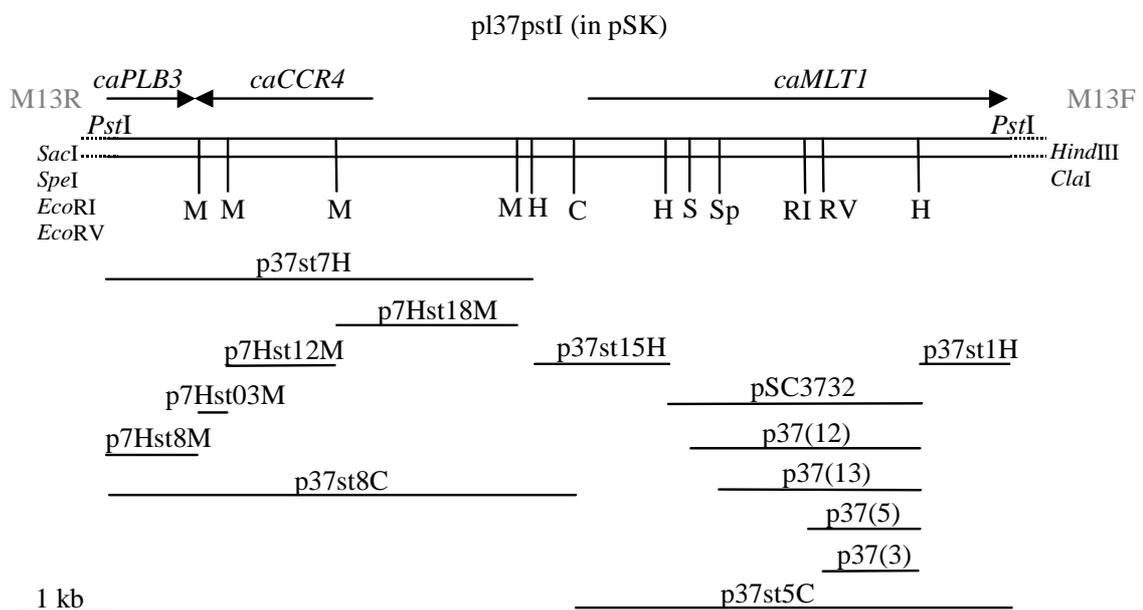


Abbildung 4: **Subklonierungen.** Lage aller subklonierter Fragmente in Bezug auf das 10 kb umfassende genomische Fragment des Plasmids *pl37pstI*. Weiterhin ist das Insert des Phagen-Subklons *pSC3732* zusammen mit dessen subklonierten Fragmenten angegeben, die von G. Köhler zur Verfügung gestellt wurden. Restriktionsschnittstellen: C (*ClaI*), RI (*EcoRI*), RV (*EcoRV*), H (*HindIII*), M (*MunI*), S (*SacI*), Sp (*SpeI*)

Alle entstandenen Plasmide wurden durch Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin überprüft und als Template in Sequenzierreaktionen eingesetzt. Mit den vektoriellen Primern UNIVERSAL und REVERSE sowie intern gelegener Oligonukleotide ließen sich die Basenabfolgen der einzelnen subklonierten genomischen DNA-Fragmente ermitteln und mit Hilfe des GCG-Programmpakets zu einer Gesamtsequenz zusammenfügen.

Zur Bestimmung der vollständigen *caPLB5*- und *caMLT1*-Gensequenzen wurden der Fosmidklon 9D6 herangezogen sowie *caPLB5*- und *caMLT1*-Fragmente, die in PCR mit 0,1 - 1,0 µg chromosomaler *C.-albicans*-DNA als Template erhalten wurden. Je nach zu sequenzierender DNA wurden entsprechende Sequenzierprimer (siehe Tab. 5) eingesetzt.

7.10 5' und 3' RACE

Start- und Polyadenylierungs-Seiten des *caMLT1*- sowie des *caPLB5*-Transkripts wurden bestimmt mittels PCR-Amplifikation der cDNA-Enden, dem sogenannten RACE-(*rapid amplification of cDNA ends*)-Verfahren. Zuerst wurde nach Anleitung des Oligotex-mRNA-Mini-Kits (Qiagen) Poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA von *C. albicans* isoliert. Anschließend erfolgte die Herstellung von Gen-spezifischer cDNA unter Verwendung der RnaseH-negativen SuperscriptII-Reverse-Transcriptase (Gibco) und in Anlehnung an Standardprotokolle (11).

Ermittlung des Transkriptions-Startpunkts (5'RACE)

Für die Synthese des cDNA-Erststrangs wurden Primer verwendet, die sich ca. 500 bp vor dem möglichen Startcodon innerhalb der Gen-codierenden Region anlagerten. Als *caMLT1*-spezifischer Primer wurde XHESP1Y und als *caPLB5*-spezifischer Primer UPPLIP3 gewählt. Etwa 500 ng Poly(A)⁺-RNA (Menge ist abhängig vom Expressionsniveau des zu untersuchenden Transkripts) wurden zusammen mit 3 pmol Primer in 90 µl Wasser aufgenommen und über Nacht bei -20°C gefällt. Das noch leicht feuchte Pellet wurde in 20 µl Annealing-Puffer (12 ml H₂O + 4 µl 400 mM TrisCl pH 8,3 + 4 µl 400 mM KCl) gelöst, auf 90°C erhitzt und langsam auf 37°C abgekühlt. Die anschließende dreistündige Inkubation bei ca. 52°C (Temperatur ist abhängig von der Basenpaar-Zusammensetzung des Primers) ermöglicht die spezifische Bindung des Oligonukleotids an die RNA. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte in einer reversen Transkriptions-(RT)-Reaktion nach der SuperscriptII-Vorschrift des Herstellers (Gibco). Nach einem Phenol-Aufreinigungsschritt wurde an das freie 3'-OH-Ende des erstellten cDNA-Erststrangs mittels Terminaler-Transferase (Roche, Angaben des Herstellers) ein Poly(A)-Schwanz angehängt, an den der Anker-Primer DTNOT binden konnte. Zusammen mit dem Primer NHEKNUT (bindet ca. 300 bp nach dem möglichen *caMLT1*-Startcodon) bzw. ECOMUPL5 (bindet ca. 400 bp nach dem möglichen

caPLB5-Startcodon) konnten nun mittels PCR die jeweiligen cDNAs amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden Gel-gereinigt und in den Vektor pSK kloniert. Im Falle der *caMLT1*-5'-cDNA erfolgte die Klonierung durch Verdau mit *NsiI* und *NotI*, die an einer intern gelegenen *NsiI*-Erkennungsstelle und der durch DTNOT eingebrachten *NotI*-Stelle schnitten. Im Falle der *caPLB5*-5'-cDNA erfolgte die Klonierung in den pSK Vektor durch Verdau mit *NotI* und *EcoRI*, deren Erkennungssequenzen beide über die PCR-Primer eingebracht worden waren. Zur Bestimmung der cDNA-Sequenzen und der Transkriptions-Startpunkte wurden mehrere Klone sequenziert.

Ermittlung der Polyadenylierungs-Stellen (3'RACE)

Etwa 500 ng Poly(A)⁺-RNA wurden mit 3 pmol Primer in 12 µl Wasser aufgenommen, für 10 min bei 70°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Nach der Primer-Bindung erfolgte die cDNA-Erststrangsynthese mittels reverser Transkription der Poly(A)⁺-RNA mit dem Primer DTNOT. Um cDNA-Fragmente zu erhalten, die spezifisch für *caMLT1* sind, wurde eine PC-Reaktion mit den Primern DTNOT und RMDR1 durchgeführt. *caPLB5*-spezifische cDNA wurde mit den Primern DTNOT und RACE3 erhalten. Die Amplikons wurden in beiden Fällen mit *NotI* und *PstI* (interne Erkennungsstelle) verdaut, in pSK kloniert und einige Klone zur Bestimmung der Insert-Sequenzen ausgewählt.

8. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung fluoreszierender *C.-albicans*-Zellen wurde ein Zeiss Axiovert 100 M Mikroskop verwendet, das mit einer Zeiss LSM 510 confocalen Laser-Aufnahmetechnik (Carl Zeiss, Jena) ausgestattet ist. Die Fluoreszenzaufnahmen und zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen wurden mittels einem 63 x Plan-Apochromat Objektiv mit Ölimmersion aufgenommen.

Detektion der MLT1::GFP-Zelllokalisierung

Zur Lokalisation von Mlt1p innerhalb der Pilzzelle wurden die zu untersuchenden *C.-albicans*-Stämme über Nacht (16 h) in dem Vollmedium YPD angezogen. Die GFP-markierten Zellen wurden zusätzlich mit dem Styryl-Farbstoff N-(3-Thiethylammoniumpropyl)-4-(p-Diethylaminophenylhexatrienyl)-Pyridinium-Dibromid, kurz FM4-64 (Molecular Probes), gefärbt. 1 ml der Übernachtskultur wurden kurz bei 2.000 rpm abzentrifugiert und in 1 ml frischem YPD-Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl einer 16 mM Stammlösung von FM 4-64 in DMSO (20 - 40 µM Endkonzentration) erfolgte eine Inkubation unter Lichtabschluss bei 30°C für 1 h im Schüttler. Anschließend wurden die Zellen bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in frischem YPD ohne Farbstoffzugabe für eine weitere Stunde im Dunkeln bei 30°C wachsen gelassen. Die

sowohl GFP-markierten, als auch mit FM4-64 gefärbten Zellen konnten dann ohne zusätzliche Fixierungsschritte unter dem Mikroskop mit folgender dualer Kanaleinstellung betrachtet werden: 514 nm Excitation mit einem LP560 Detektionsfilter für FM4-64 und 488 nm Excitation mit einem BP505-530 Filter für GFP.

Detektion vakuolarer Akkumulation von Monochlorobiman-GS

Zur Detektion der durch Gluthationkonjugat-(GS-X)-Pumpen vermittelten Anreicherung von Monochlorobiman innerhalb der Vakuole wurden Pilzzellen aus einer Übernachtskultur 1:100 in YPD-Vollmedium mit 100 μ M Monochlorobiman (syn-(ClCH₂, CH₃)-1,5-diazabucyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dione-2,8-dione, Molecular Probes) verdünnt und für 2, 6 oder 16 h im 30°C-Schüttler inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie für *S. cerevisiae* beschrieben (160): Nach Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (2000 rpm, 4°C, 5 min) pelletiert und zweimal mit frischem YPD-Medium ohne Farbstoffzugabe gewaschen. Die behandelten Zellen konnten anschließend ohne weitere Fixierungsschritte unter dem Mikroskop unter UV-Laser-Excitation (364 nm) und einem LP560 Detektionsfilter betrachtet werden.

9. Experimente im Tiermodell

Experimentelle Infektionen im Tiermodell wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. M. Kretschmar und Herrn Dr. T. Nichterlein am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Mannheim, durchgeführt. Labormäuse wurden mit den zu untersuchenden *C. albicans*-Stämmen wie beschrieben infiziert (144). Hierfür wurden die Stämme über Nacht (18 h) unter Schütteln bei 37°C in Sabouraud-Glucose-Medium angezogen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Gibco) wurden die Zellpellets anschließend im selben Puffer resuspendiert. Für die Tierversuche wurden 8 - 12 Wochen alte BALB/c-Mäuse von Harlan (Borchen, Germany) bezogen. Insgesamt wurden zur Untersuchung einer Infektion mit disseminierendem Krankheitsbild zwei *C. albicans*-Infektionsmodelle verwendet: intraperitoneale und intravenöse Infektion.

Für die systemische Infektion nach intravenöser Inokulation wurden unbehandelte BALB/c-Mäuse mit 2×10^5 oder 4×10^5 Blastokonidien in 0.4 ml 0,9 % NaCl oder PBS über die laterale Schwanzvene infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (siehe Ergebnisse) wurden die Organe Leber, Milz, Nieren, Herz und Gehirn der Tiere unter sterilen Bedingungen entnommen, in sterilem Wasser homogenisiert und zur Bestimmung der CFU pro Organ in flüssigem Tryptoseagar (Difco) aufgenommen.

Für die intraperitoneale Infektion wurden unbehandelte BALB/c-Mäuse mit einer subletalen Dosis von 1×10^8 Blastokonidien pro Balb/c-Maus (in 0,5 ml PBS) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von 200 μ l Blut mittels Herzpunktat aus den getöteten Mäusen. Messungen von Enzymaktivitäten und histopathologische Untersuchungen wurden durchgeführt wie beschrieben (144, 146): Die Transaminase-Aktivität (ALT, EC 2.6.1.2), die ein geeigneter Maßstab für den Untergang von Hepatozyten durch die Invasion von *C. albicans* Hyphenzellen in die Leber ist, wurde 24 h nach Infektion im Blutplasma mit dem Kinetik-UV-Test (empfohlen durch die International Federation of Clinical Chemistry) bestimmt. Sechs Mäuse wurden 24 h p. i. histopathologisch untersucht, wobei jeweils mindestens zehn Lebersektionen hergestellt wurden. Hierfür wurden Teile der Leber in einer 10%igen Formaldehydlösung in PBS fixiert. Nach Einbettung in Paraffin und Herstellung von 2 μ m dicken Gewebeschnitten nach Standardmethoden erfolgte die Anfärbung der *C.-albicans*-Zellen durch PAS-(*periodic acid Schiff's*)-Reaktion. Die Gewebesektionen wurden mit Mayer's Hemalum Lösung (Merck) gegengefärbt. Auf die Durchführung der Tierexperimente im Einzelnen wird an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil näher eingegangen.

V ERGEBNISSE

Vorausgegangene Forschungsarbeiten

Aus einer durch DNaseI-Partialverdau generierten genomischen Expressionsgenbank von *C. albicans* SS in Lambda ZapII isolierten Köhler und Mitarbeiter an der University of California, San Francisco / CA, U.S.A., ein 634 bp großes Phagemidinsert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Identitäten zu MRP-ähnlichen ABC-Transportproteinen verschiedener Organismen aufwies. Das Phagemid stammt aus einem Lambda ZapII Phagenklon, der zusammen mit weiteren positiven Phagen beim Überprüfen der *C.-albicans*-Genbank mit einem polyklonalen Antiserum gegen den humanen Fibronectinrezeptor Integrin $\alpha 5\beta 1$ isoliert wurde. Das ursprüngliche Vorhaben lag hierbei in der Identifizierung Integrin-ähnlicher Rezeptoren aus *C. albicans*, die dem opportunistischen Infektionserreger als Adhäsine zur Anheftung an extrazelluläre Matrixproteine dienen könnten (G. Köhler, persönliche Information). Aufgrund der Kreuzreaktivität Fibronectin-bindender Oberflächenmoleküle von *C. albicans* mit Anti-Human- $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Antikörper wurde erwartet entsprechende Integrinanalogue isolieren zu können (242, 243). Keiner der positiven Phagemidisolate zeigte jedoch ausreichende Sequenzähnlichkeiten zu Integrinen.

Köhler und Mitarbeiter überprüften mit dem klonierten 634-bp-Fragment eine im Lambda FixII Phagen angelegte *C.-albicans*-SS-Genbank, die partial *Sau3AI*-verdaute genomische DNA enthielt. Hierbei konnte ein Phage isoliert werden, der jedoch nicht die gesamte kodierende Sequenz des möglichen ABC-Transportproteins umfasste, da das 3'-Ende des Gens fehlte. Erste Sequenzierungen des durch Subklonierung des Phagen erhaltenen Plasmids pL37pstI zeigten jedoch, dass sich auf dem 10 kb großen *PstI*-Insert neben den an einem Insertende lokalisierten ABC-Transportersequenzen ein weiteres offenes Leseraster (*open reading frame* (ORF)) am gegenüberliegenden Ende befindet. Eine BLAST-Sequenzanalyse (6) ergab hierbei hohe Ähnlichkeiten zu Phospholipase-B-Proteinen der Pilzstämmen *Saccharomyces cerevisiae* und *Torulaspora delbrueckii*. Leider war auch diese genkodierende Region nicht vollständig auf pL37pstI vorhanden (siehe auch Abb. 6 b).

1. Isolierung des *caMLT1*- und *caPLB3*-tragenden genomischen Bereichs aus *Candida albicans*

Ausgehend von den vorangegangenen Untersuchungen war das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit die Isolierung der gesamten kodierenden Region des *MRP like transporters* Mlt1 sowie der putativen Phospholipase B (Plb3) und die Bestimmung ihrer Nukleotidsequenzen. Im weiteren Verlauf sollte die physiologische Funktion beider Gene analysiert werden.

1.1 Hybridisierung einer Fosmidgenbank mit *caMLT1*- und *caPLB3*-spezifischen Gensonden

Um die fehlenden Gensequenzen im 5'-Bereich von *caPLB3* und im 3'-Bereich von *caMLT1* bestimmen zu können, sollte aus einer genomischen *C.-albicans*-Bibliothek ein Klon isoliert werden, der die entsprechende Region abdeckt. Hierfür wurde eine Fosmidgenbank eingesetzt, die freundlicherweise von S. Scherer zur Verfügung gestellt wurde (siehe auch Kapitel IV 1.). Die ersten 20 Platten, die das haploide *C.-albicans*-Genom ca. fünf Mal umfassen, wurden von Sonja Michel, Arbeitsgruppe Morschhäuser am Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg, auf insgesamt vier Nylonmembranen aufgestempelt. Die DNA war nach Aufschluss der Bakterien denaturiert und auf der Membran fixiert worden.

Zunächst erfolgte eine Hybridisierung der Kolonieblots mit einem 1 kb großen *PstI/MunI*-Fragment des Plasmids pl37pstI, das spezifisch für das *caPLB3*-Gen ist (PLB3#1). Sieben Klone zeigten ein positives Signal und wurden mittels Southernblotanalysen näher untersucht (Abb. 5).

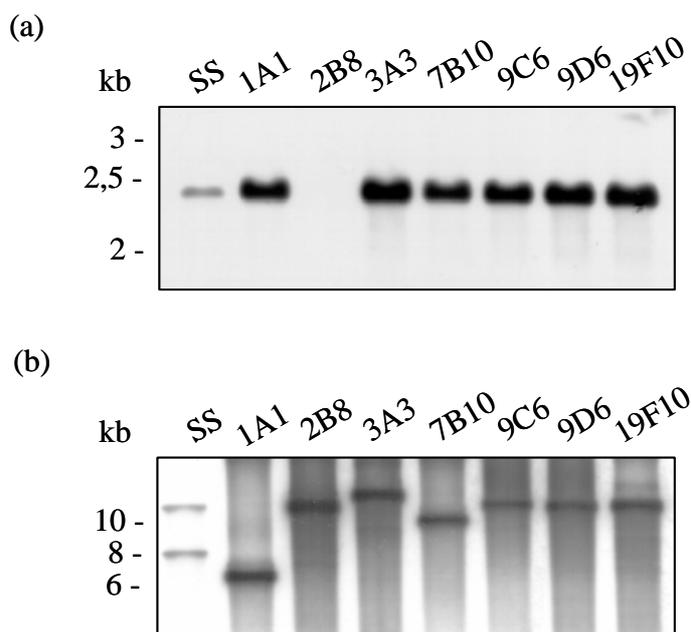


Abbildung 5: Southernblotanalyse von sieben Fosmiden einer *C.-albicans*-Genbank. Die DNA wurde mit *EcoRI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einer spezifischen Sonde für *caMLT1* (MLT1#1, Bild a) sowie für *caPLB3* (PLB3#1, Bild b) hybridisiert. Chromosomale DNA des Stammes SS (Spur 1), die ebenfalls einem *EcoRI*-Verdau unterzogen wurde, hybridisierte spezifisch mit MLT1#1 in einer 2,4 kb großen Bande und mit PLB3#1 in einer 11,2- sowie einer 8-kb-Bande.

Die DNAs der positiven Fosmide wurden isoliert, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* behandelt und wiederum mit der Sonde PLB3#1, sowie mit einer, durch *PstI/HindIII*-Verdau des Plasmids pl37p*stI* generierten *MLT1*-spezifischen Sonde (*MLT1*#1) hybridisiert (die Position der Sonden ist in Abb. 6 a eingezeichnet). Von den sieben untersuchten Klonen zeigten nur die Fosmide 9C6, 9D6 und 19F10 in beiden Hybridisierungen die erwarteten Hybridisierungsbanden in der erwarteten Höhe von 2,4 kb (Sonde *MLT1*#1, Abb. 5 a) und 11,2 kb (PLB3#1, Abb. 5 b). Die *EcoRI*-verdaute chromosomale DNA des wildtypischen Stammes *C. albicans* SS, die als Kontrolle herangezogen wurde, wies in der *caPLB3*-spezifischen Hybridisierung einen Restriktionslängenpolymorphismus auf (Abb. 5 b, Spur 1). Für die Bestimmung der fehlenden *caMLT1*- sowie *caPLB3*-Nukleotidsequenzen wurde im weiteren Verlauf der Klon 9D6 herangezogen.

1.2 Sequenzbestimmung der *caPLB3*- und *caMLT1*-umfassenden Region und Identifizierung weiterer offener Leseraster

Zunächst wurden die Lambda FixII Phagensubklone pl37p*stI* und pSC3732 (enthält ein 2,7-kb-*HindIII*-Fragment, Abb. 6 b) zur Ermittlung der *caMLT1*- sowie *caPLB3*-Gensequenzen herangezogen. Die Plasmide wurden hierfür mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die subklonierten Fragmente in PCR-Sequenzierreaktionen eingesetzt (Plasmide und Klonierungsschritte sind in Kapitel IV 2. und IV 7.9 näher erläutert). Ausgehend von den vektoriiellen Primern konnten die jeweiligen Plasmidinserts von zwei Seiten aus ansequenziert werden. Fehlende Bereiche der sich teils überlappenden DNA-Sequenzen ließen sich ermitteln durch den Einsatz intern gelegener Oligonukleotide, die von den bereits bekannten Sequenzen abgeleitet wurden.

Eine Analyse der so vervollständigten und zusammengesetzten Nukleotidsequenz ergab, dass im *C. albicans*-Genom zwischen den Genen *PLB3* und *MLT1* ein weiteres offenes Leseraster mit einer Größe von 1839 bp auf dem Gegenstrang lokalisiert ist (*caCCR4*, Abb. 6 b). Das nur 97 bp stromabwärts des *caPLB3*-Stopcodons endende putative Gen zeigt signifikante Ähnlichkeit in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz zu Ccr4p von *Saccharomyces cerevisiae*, einem generellen Transkriptionsregulator, der als Komponent eines Multiuntereinheiten-Komplexes diverse zelluläre Prozesse in *S. cerevisiae* sowohl negativ als auch positiv beeinflusst (163). So ist das scCcr4-Protein in die Carbon-Katabolitrepression (67, 68) involviert und nimmt Einfluss auf die Integrität der Zellwand und den Zellzyklus (164). Der Ccr4-Komplex scheint nicht nur an der Gentranskription und somit mRNA-Synthese, sondern auch am mRNA-Abbau beteiligt zu sein (290). Im Rahmen des *C. albicans* Genomprojektes (Sanger Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge und Inst. of Med. Department of Mol. and Cell Biol., Aberdeen) wurde

zwischenzeitlich unter der *Accession-Number* (AN) AL033501 die Sequenz eines sogenannten „*glucose repressible alcohol dehydrogenase transcriptional effectors*“ veröffentlicht, die mit 97 % Identität (BLAST) fast identisch ist mit der abgeleiteten Proteinsequenz des möglichen *caCCR4*-Gens.

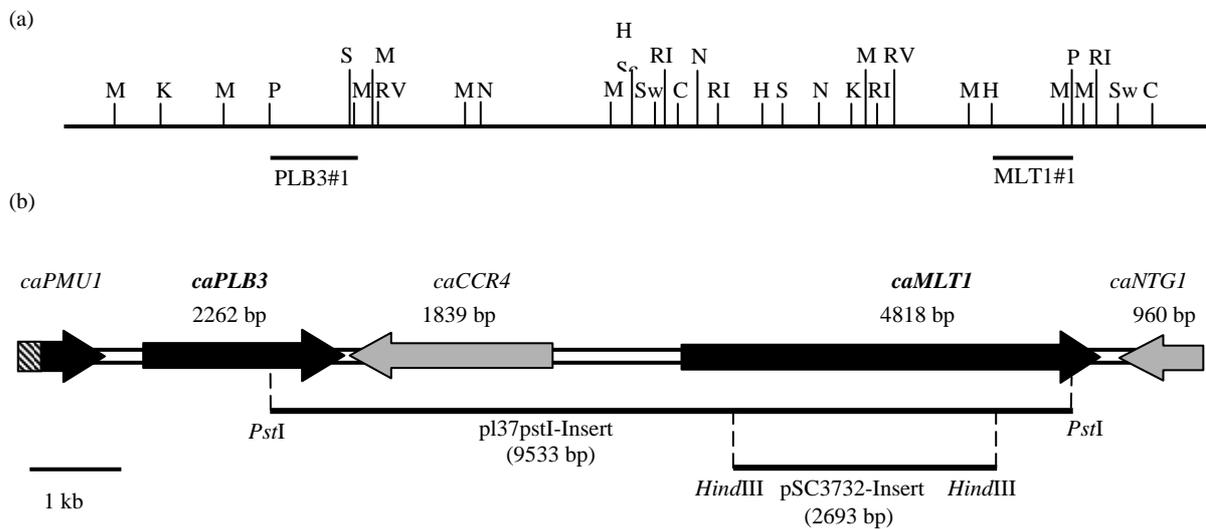


Abbildung 6: **Übersicht über den *caPLB3*- und *caMLT1*-umfassenden Genomabschnitt in *C. albicans*.** Angegeben sind eine Genkarte mit Restriktionsenzymstellen und die in den Southernhybridisierungen eingesetzten Gensonden (a), Lage und Größe der identifizierten Gene sowie der zur Sequenzbestimmung eingesetzten *pl37pstI*- und *pSC3732*-Inserts (b). Weitere Sequenzdaten wurden mittels Fosmid 9D6 ermittelt. Die hier nicht vollständig bestimmte kodierende Sequenz der Phosphomutase *caPMU1* kann nach den veröffentlichten Sequenzdaten im Rahmen des Genomsequenzierprojektes (Stanford) mit einer Größe von 990 bp angenommen werden. Restriktionsschnittstellen: C (*ClaI*), RI (*EcoRI*), RV (*EcoRV*), H (*HindIII*), K (*KpnI*), M (*MunI*), N (*NsiI*), P (*PstI*), S (*SacI*), Sc (*ScaI*), Sw (*SwaI*). Pfeile stellen Gene dar mit Angabe der Transkriptionsrichtung, wobei die Sequenz von *caPMU1* nicht vollständig bestimmt wurde (gestreifter Bereich).

Unter Verwendung des Fosmids 9D6 wurden nun die noch fehlenden *caPlb3p*- und *caMlt1p*-kodierenden Gensequenzen mittels *Primer-Walking* bestimmt. Bei dieser Technik wird für eine PCR-Sequenzierreaktion der erste Primer so gewählt, dass er in kurzem Abstand vor dem Ende einer bereits bekannten Nukleotidsequenz bindet und man in den unbekanntem Bereich weiterlesen kann (Sequenzüberlappung!). Für jeden weiteren Sequenzierschritt werden wiederum am Ende der Sequenz neue Oligonukleotide ausgewählt, so dass die gesuchte Nukleotidsequenz fortlaufend bestimmt werden kann. Auf diese Weise ließen sich ausgehend von den vorliegenden Sequenzdaten die fehlenden C-terminalen 312 bp der *caMlt1p*-kodierenden Region (4821 bp) plus weitere 1 kb stromabwärts sequenzieren sowie 1,4 kb des N-terminalen Bereichs der *caPlb3p*-kodierenden Sequenz (2265 bp) plus weitere 1,1 kb stromaufwärts.

Die Analyse der ermittelten Sequenzdaten zeigte, dass 495 bp vor dem *caPLB3*-Startcodon ein ORF endet (*caPMU1*, Abb. 6 b) mit Ähnlichkeit zum Phosphomutase-Homolog Pmu1p von *S. cerevisiae* (BLAST: I 27 %, P 46 %), dessen zelluläre Funktion bislang unbekannt ist. Neueste Homologierecherchen ergaben eine fast 100%ige Identität zu einem konservierten hypothetischen Protein (AN: AL033501) von *C. albicans*. Nur 108 bp nach dem *caMLT1*-Stopcodon grenzt auf dem Gegenstrang ein ORF von 960 bp an (*caNTG1*, Abb. 6 b), das unter Verwendung des BLAST-Algorithmus die höchsten Aminosäure-(AS)-Ähnlichkeiten zu Ntg1p (I 44 %, P 62 %) und Ntg2p (I 41 %, P 58 %) von *S. cerevisiae* und Nth-Spop (I 41 %, P 59 %) von *Schizosaccharomyces pombe* zeigt. Die strukturell und funktional hoch konservierten Endonuklease-III-ähnlichen Glycosylasen sind durch das Entfernen oxidiertes Pyrimidinbasen an der Reparatur geschädigter Zell-DNA beteiligt (5, 230). Das putative *caNtg1p* zeigt eine 96%ige Identität zur abgeleiteten Aminosäuresequenz eines kürzlich veröffentlichten partiellen offenen Leserasters von *C. albicans* (AN: AF222908).

Weiterhin lassen sich in den veröffentlichten Sequenzdaten des *C.-albicans*-Genom-Sequenzierprojekts am Stanford Technology Center nahezu 100%ige Übereinstimmungen zu *caPMU1* (Contig 6-2306, ORF 6.4038 und Contig 6-2454, ORF 6.6347), *caCCR4* (Contig 6-2306, ORF 6.4036) und *caNTG1/YOL43* (Contig 6-2306, ORF 6.4033) finden.

Von den nun vorliegenden Sequenzdaten wurden PCR-Oligonukleotide abgeleitet, die eine Amplifikation der *PLB3*- und *MLT1*-umfassenden Genbereiche aus chromosomaler DNA von *C. albicans* ermöglichen. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sie noch vor der jeweiligen putativen Promotorregion stromaufwärts des Startcodons bzw. nach der möglichen Transkriptions-Terminatorregion stromabwärts des Stopcodons hybridisieren. Die ermittelten *caPLB3*- und *caMLT1*-Sequenzdaten ließen sich durch Amplifikation beider Genregionen (*MLT1*: [ABCFOX-ABCREV], *PLB3*: [AMPLI1-AMPLI3]) aus chromosomaler DNA des Stammes *C. albicans* SS und anschließender Sequenzierung bestätigen. Eine Darstellung der Nukleotidsequenzen der *PLB3*- und *MLT1*-tragenden chromosomalen Genregionen befindet sich zusammen mit den davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Anhang.

2. Charakterisierung des *caMlt1p*-Transportproteins

2.1 Analyse der Sequenzdaten

Aus chromosomaler DNA der Stämme SS, SC5314 und dessen *ura3*-negativem Abkömmling CAI4 ließ sich mit dem Primerpaar ABCFOX und ABCREV ein DNA-Bereich vervielfältigen, der

die gesamte *caMlt1p*-kodierende Region mit flankierenden Bereichen umfasst. Die amplifizierten DNA-Fragmente wiesen im Agarosegel dieselbe Bandengröße von 6,4 kb auf.

Das *caMLT1*-Gen umfasst ein 4821 bp großes, ununterbrochenes offenes Leseraster, das für ein 1606 Aminosäuren großes Protein mit einem kalkulierten Molakulargewicht von Mr 180.645 kodiert. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei pI 5,93. Die Polyadenylierungsstellen ließen sich mittels 3'RACE ermitteln und liegen an den Positionen +4891, +4902 und +4932 der im Anhang dargestellten Sequenz. Mittels 5' RACE wurden die Haupttranskriptionsstartpunkte der *caMLT1*-mRNA bestimmt, die an den Positionen -16 und -28 liegen. Das erste ATG-Codon (Pos. +1) stromabwärts der ermittelten Transkriptionsstarts stellt die mögliche Translations-initiationsstelle dar. Dafür spricht auch, dass sich drei Nukleotide vorher (Pos. -3) ein Adenosinrest befindet, was nach dem Translations-Initiations-Model nach Kozak für ein Initiator-ATG-Codon spricht (142). In Hefen ist der Transkriptionsstart meist 40 - 120 bp stromabwärts der TATA-Sequenz gelegen (277). Entsprechend diesem Muster folgen auch den beiden ermittelten *caMLT1*-Transkriptionsstarts 46 bp (bzw. 58 bp) und 72 bp (bzw. 84 bp) stromaufwärts zwei TATA-Elemente. Noch weiter stromaufwärts lassen sich zwei imperfekte Poly(dA-dT)-Sequenzen an den Nukleotidsequenzpositionen -132 bis -109 und -611 bis -597 finden. Das Sequenzelement Poly(dA-dT) scheint die Zugänglichkeit des Promotors zu erleichtern und ist *in vivo* für einen wildtypischen Transkriptionslevel vieler Hefegene notwendig (276). 143 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstellen befindet sich eine mögliche CCAAT-Box in reverser Orientierung (Pos. -172 bis -176, 5'-ATTGG-3'), ein sehr häufiges Modul eukaryotischer Promotoren, das in beiden Orientierungen aktiv ist.

2.1.1 Analyse der putativen Promotorregion von *caMLT1*

Mit dem Bindungsstellensuchprogramm MatInspector (217) (TRANSFEC-Programm, BCM Search Launcher) konnten weiterhin einige putative Promotormodule lokalisiert werden, die Hinweise auf die mögliche Regulation der *caMLT1*-Transkription liefern können (siehe auch abgebildete *caMLT1*-Nukleotidsequenz im Anhang). So befindet sich ein *Stress-Responsive-Element* (STRE) an Position -59 bis -55, dessen Sequenz 5'-CCCCT-3' die Induktion oder Repression vieler Gene in *S. cerevisiae* in Antwort auf unterschiedliche Stressfaktoren, wie z. B. Hunger, Hitzeschock oder osmotischer Stress, vermittelt (für ein Review über Stress-induzierte transkriptionelle Aktivierung siehe (171)). In der analysierten ca. 1 kb umfassenden Region stromaufwärts von *caMLT1* liegt an Position -577 bis -571 eine Sequenz, die genau mit der Consensusbindungsstelle 5'-TGA(C/G)TCA-3' (203) des zu AP-1 ähnlichen Hefe-Transkriptionsfaktors Gcn4

übereinstimmt. Eine weitere Gcn4p-Kernbindungssequenz (5'-TGACTC-3') liegt an Position -846 bis -841. In *S. cerevisiae* wird Gcn4p in Antwort auf z. B. Glucose-, Purin- und Aminosäurelimitation aktiviert (121, 231, 319) und ist in die Expression von wenigstens 40 Genen involviert. Weiterhin sind mehrere 5'-GATAA-3' Einheiten vorhanden, die als Bindungsstellen für Nitrogen-Regulatorproteine dienen könnten (176). Auch eine TAE-Consensussequenz (TCS) 5'-CATTCY-3' (7)) lässt sich finden (Pos. -171 bis -166), an die Transkriptionsfaktoren der TAE/ATTS-Familie binden können. Mitglieder dieser Genregulatorfamilie sind in höheren Pilzen und Eukaryonten in die morphologische Entwicklung involviert.

2.1.2 Suche nach caMlt1p-Homologien

Homologierecherchen und Sequenzvergleiche, die mit Hilfe des GCG-Programmpakets durchgeführt wurden, zeigten, dass caMlt1p über den gesamten Aminosäuresequenzbereich die größten Ähnlichkeiten zu zwei *S.-cerevisiae*-Transportern aufweist: 43 % Identität (53 % Ähnlichkeit) zu dem *yeast cadmium factor* Ycf1p (AN: P39109) und 42 % Identität (52 % Ähnlichkeit) zu YLL015w, später benannt als *bile pigment transporter* Bpt1p (AN: P14772). Mit 37 % Aminosäureübereinstimmung folgt eine putative ATP-abhängige Permease von *Schizosaccharomyces pombe* (AN: Q10185) sowie mit 36 % Identität das humane *multidrug resistance associated protein* MRP1 (AN: P33527).

Die Suche nach Sequenzübereinstimmungen in den veröffentlichten Sequenzdaten des *C.-albicans*-Genomsequenzierprojekts (Stanford) zeigte, wie bereits erwähnt, dass Contig 6-2306 ORF 6.4035 mit der caMlt1-Proteinsequenz nahezu identisch ist. Die von ORF 6.4035 abgeleitete AS-Sequenz unterscheidet sich lediglich in den drei Aminosäuren L8, A42 und T1465, für die in caMlt1p F, G und A stehen. Die partiellen ORFs 6.5834 und 6.5835 des Contigs 6-2429 sowie Contig 6-2274 ORF 6.3716 weisen Sequenzidentitäten von 42 % zu caMlt1p auf. Es könnten sich dabei um weitere mögliche MRP-ähnliche ABC-Transporter von *C. albicans* handeln, wobei die aufeinander folgenden ORFs 6.5834 und 6.5835 vermutlich ein unterbrochenes Leseraster darstellen. Diese Unterbrechung könnte durch Sequenzierfehler hervorgerufen sein oder es handelt sich hierbei um ein Pseudogen. Noch höhere Ähnlichkeiten weisen die von 6.3716 und 6.5834/6.5835 abgeleiteten Peptidsequenzen zu den *S.-cerevisiae*-Transportern Ycf1p (59 % und 44 % Identität) und Bpt1p (45 % und 44 %) auf.

2.1.3 Identifikation ABC-Transporter typischer und konservierter Bereiche in der von *caMLT1* abgeleiteten Aminosäuresequenz

Je nach Topologie und Sequenzeigenschaft können ATP-abhängige Transportproteine in verschiedene Klassen unterteilt werden (16, 64, 283). ABC-Transporter mit strukturellen Ähnlichkeiten zu MRP1 lassen sich in der MRP/CFTR-Unterklasse (291) bzw. im Subcluster II.1 nach Decottignies und Goffeau (64) zusammenfassen. Auch caMlt1p weist die für diese Klasse typische $(TMD_n-NBD)_2$ -Topologie auf: N-terminale Transmembrandomänen (TMD1) werden gefolgt von der ersten Nukleotidbindungsdomäne (NBD1), weiteren möglichen Transmembrandomänen (TMD2) und der zweiten NBD am COOH-Terminus (NBD2). Hinsichtlich Primärstruktur und Topologie unterscheidet sich dieser Transporter somit deutlich von den caCdr-Proteinen, die in die Azolresistenzbildung von *C. albicans* involviert sind und zu der PDR-Untergruppe (Subcluster I.1 (64)) mit einer $(NBD-TMD_n)_2$ -Topologie gezählt werden können. Mit Hilfe des Analyseprogramms PredictProtein-Software (232) ließen sich insgesamt zwölf putative Transmembransegmente in der Proteinsequenz von caMlt1p finden. Abbildung 7 zeigt einen Hydrophobizitätsplot, der mit der sogenannten „Dense-Alignment-Surface-(DAS)-Methode“ erstellt wurde (58). Danach sind acht TM-Segmente N-terminal zu NBD1 lokalisiert (TMD1) und vier N-terminal zu NBD2 (TMD2). Das Programm PSORTII detektiert im Bereich TMD1 eine weitere, dreizehnte Transmembranhelix in der Region von I137 bis V152.

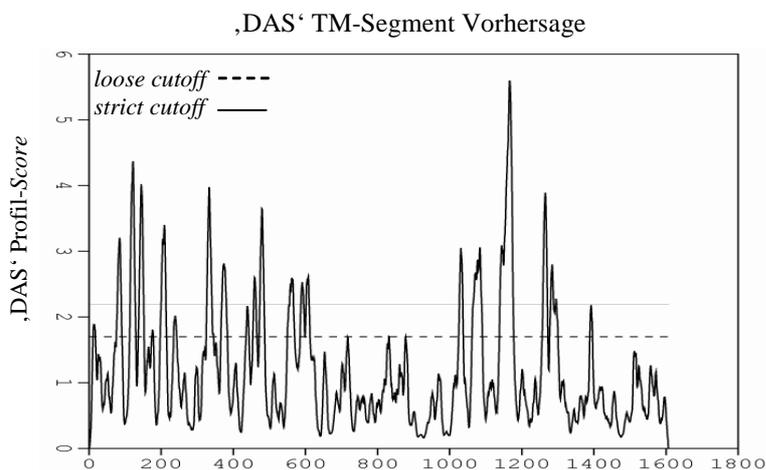


Abbildung 7: **Hydrophobizitätsplot.** Hydrophobizitätsplot der von *caMLT1* abgeleiteten Aminosäuresequenz, der mittels DAS-Server für Vorhersagen von Transmembranregionen erstellt wurde.

Mit Hilfe des MOTIFS-Suchprogramms des GCG Programmpakets (70) konnten zwei NBDs (NBD1 und NBD2) detektiert werden, die die folgenden für ATP-bindende Proteine typischen Regionen enthalten: Jeweils ein ATP/GTP-Bindungsstellen-Motiv A (Walker A, P-loop) mit der AS-Sequenz GKVGS₇₀₄GKS (Pos. 704 - 711) sowie GRTGAGKS (Pos. 1379 - 1386) und eine ABC-

Signatur mit LSGGQKARISLARSV (Pos. 805 - 819) sowie LSSGQKQLLCLARAL (Pos. 1502 - 1516). Das hochkonservierte Walker-B-Motiv (hhhhD, h steht für eine hydrophobe Aminosäure) ist ebenfalls in beiden Nukleotidbindungsdomänen enthalten (300).

Ein Vergleich der NBDs ähnlicher Proteine in Abbildung 8 spiegelt die Konserviertheit dieser Regionen innerhalb der MRP/CFTR-Subgruppe wieder. Nach Decottignies scheinen verschiedene Sequenzmotive für bestimmte ABC-Transportprotein-Subcluster charakteristisch zu sein (64). So variiert die N-terminale ABC-Signatur je nach Cluster und zeigt sich mit der Sequenz „SGGQK/QQ/AR“, wie sie auch bei caMlt1p vorliegt, typisch für Cluster-II-Mitglieder. Typisch für MRP/CFTR-ähnliche Transporter sind auch zwei konservierte Aminosäuren, die in der sogenannte *Centre-Region* zwischen dem Walker A- und B-Motiv liegen: ein Phenylalanin F765 (NBD1) bzw. ein Asparagin N1439 (NBD2). Mutationen in den korrespondierenden Aminosäureresten F508 und N1303 des humanen CFTRs (wo sie mit Fällen von Cystischer Fibrose assoziiert sind) bzw. F713 und N1366 des scYcf1-Proteins führen zu einem Defekt in der Biogenese dieser Proteine (80, 323).

2.1.4 Vergleich der von *caMLT1* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit scYcf1p

Um einen besseren Homologievergleich erzielen zu können, wurden mit CLUSTALW einzelne Regionen der AS-Sequenz von caMlt1p getrennt voneinander mit dem gleich strukturierten und gut analysierten Protein Ycf1p von *S. cerevisiae* verglichen. So sind die AS-Sequenzen beider Nukleotidbindungsdomänen mit je 66 % Identität hoch konserviert. Die beiden Transmembranbereiche sind weit weniger konserviert und stimmen mit 34 % Identität für TMD1 und 36 % für TMD2 in ihrer AS-Sequenz miteinander überein. Der COOH-Terminus ist mit 66 % Identität sehr ähnlich.

Im Unterschied zum humanen CFTR zeichnet sich scYcf1p zusammen mit dem humanen MRP1 durch einen zusätzlichen, aminoterminalen hydrophoben Bereich aus, der im Falle des scYcf1p vier bis sechs Transmembranregionen beinhaltet. Auch caMlt1p zeichnet sich durch einen ca. 225 AS großen Überhang aus, der mit CFTR keine Übereinstimmung findet und vermutlich drei bis vier Transmembranregionen umfasst. Ein direkter Sequenzvergleich mit der entsprechenden Region von scYcf1p ergab jedoch nur eine Identität von 18 %.

Abbildung 8: **Vergleich von Nukleotidbindungsdomänen (NBDs) MRP-ähnlicher ABC-Transporter.** Der AS-Sequenzvergleich zwischen caMlt1p und ORF6.3716 von *C. albicans*, scYcf1p und scBpt1p von *S. cerevisiae* sowie human-MRP1 wurde durchgeführt mittels PILEUP (GCG-Programmpaket) und BoxShade 3.21. Unter (a) ist ein Vergleich der NH₂-NBDs und unter (b) der COOH-NBDs dargestellt, wobei Walker A und B, die Centre-Rregion sowie die ABC-Signatur benannt werden. Die konservierten AS-Reste F765 (F) und N1439 (N) sind gekennzeichnet, ebenso wie die für Subcluster II charakteristischen Aminosäuren in der NH₂-terminalen ABC-Signatur (*). Gleiche Aminosäuren sind schwarz hinterlegt und ähnliche grau.

Die Aminosäuren an Position 849 - 1008 der caMlt1p-Sequenz zeigen eine signifikante Ähnlichkeit zu der zentralen regulatorischen Domäne von scYcf1p und enthalten eine lokale Anhäufung geladener Aminosäurereste (39 % gegenüber durchschnittlich 23 % des Gesamtproteins), die in alternierenden Clustern positiver (K, R und H) und negativer (D und E) Ladung angeordnet sind. Diese sogenannte R-Domäne wurde zuerst für den humanen Chloridionenkanal CFTR beschrieben (226), wo sie einige Consensus-Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) sowie die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aufweist. Vor allem den PKA-Phosphorylierungsstellen scheint eine wichtige Funktion in der Regulation der Kanalaktivität zuzukommen (93). Ein Vergleich der R-Domänen ähnlicher Proteine der MRP/CFTR-Subgruppe ist in Abbildung 9 dargestellt, unter Angabe der möglichen PKA-Phosphorylierungspositionen. Das scYcf1-Protein beinhaltet in seiner zu CFTR wesentlich kürzeren R-Domäne nur eine putative PKA-Phosphorylierungsstelle an AS-Position 908 - 911. Diese RRAS-Sequenz ist auch in der putativen R-Domäne von caMlt1p (AS-Pos. 973 - 976), caBpt1p (AS-Pos. 931 - 934) und ORF 6.3716 (AS-Pos. 932 - 935) konserviert. Zusätzlich weist caMlt1p innerhalb der putativen R-Domäne eine weitere PKA-Phosphorylierungsstelle (RKGTT) an AS-Pos. 1005 - 1008 auf.

Mit PROSITE des *Swiss Institute of Bioinformatics* SIB (8) lassen sich in caMlt1p noch weitere Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen finden sowie insgesamt neun N-Glykosylierungsstellen.

R-Domäne

```

Mlt1 850  VLSNE-GLIGNRCRILATNSVPLHEANDIYLIAGGAFVEHGKPKEV-----MKR---NGDLAK
Bpt1 815  VLIKKTALLKNTIILTTNTVSIKHSQMIYALENGEIVEQGNVEDV-----MNRKNNTSKLLK
3716 824  VL-GPNGLLKSCKILATNNIIVLSIADTLNLVSDGRLEIQGTYYDDI-----M--KQSSKIRQ
Ycf1 798  VL-GPNGLLHTTKVLATNKVSALSIAADSLALLDNGEITQQGTYYDEI-----T--KDADSPLWK
CFTR 594  CVCK---LMANKTRILVTSKMEHLKADKILILHEGSSYFYGTFSLELQNLQPDFSSLMGCDSFDQFSAE RRNSILTE

Mlt1      LIKEYGRKKD-----BPTFEETTEASTEPKEDHS-----NGKSDTAVHDELD-----
Bpt1      LLEEFDSPID-----NGNES-----DVQTEHRS-----ESEVDEPLQLKVT-----
3716      LISFSGKKKD-----DSPTP-----TPSSQTDI-----NNEVEIKIK-----D-----
Ycf1      LLNNGYKKN-----CKSNE-----FGDSSESS-----VRESSIPVEGLE-----
CFTR 669  TLHRFSLEGDAPVSWTEITKKQSFKQTGEFGEKRRKNSILNPNINSIRKFSIVQKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLSLVPS

Mlt1 922  -----TDELVDEIVDYV--GEQNRGVVEQAAILRRASVVSYGHENYENDE---ADNGQIRKT
Bpt1 888  -----ESETEDVVVTES--ELE---LIKANSRRASLATAL--RPRPF-VGAQLDVKKKT
3716 894  -----DDINLDDLDSEC--DLE---VE--SLRRASEASLVVDDEERQLGPPEEEEEDEDT
Ycf1 868  -----QLQKLNLDLDFG--NSD---AI--SLRRASDATLGSID---FG-----DDEN
CFTR 747  EQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNQGNIRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIIYSRRLSQETGLEI

Mlt1 986  RHEQEESRRGT-----VPW
Bpt1 946  AOKAEKTEVGR-----VKT
3716 949  KARKEHLEQK-----VKW
Ycf1 922  IAKREHREQK-----VKW
CFTR 825  SEEINEEDLKECLFDDMESIPAVTTW

```

Abbildung 9: Vergleich der R-Domänen MRP/CFTR-ähnlicher ABC-Transporter. Der AS-Sequenzvergleich zwischen caMlt1p und ORF6.3716 von *C. albicans*, scYcf1p und scBpt1p von *S. cerevisiae* sowie dem humanen CFTR-Transporter wurde durchgeführt mittels CLUSTALW. Positiv geladene Aminosäuren (K (Lys), R (Arg), H (His)) sind grau hinterlegt und negativ geladene Aminosäuren (D (Asp), E (Glu)) schwarz. Mögliche PKA-Phosphorylierungsstellen sind umrandet.

2.2 Untersuchungen der *caMLT1* mRNA-Expression *in vitro*

2.2.1 Wachstumskinetik in YPD

Zur Erstellung eines *caMLT1*-mRNA-Expressionsprofils wurde der wildtypische *C. albicans*-Stamm SC5314 in YPD-Vollmedium angezogen und bei 30°C für 72 Stunden im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurde die Zelldichte gemessen (Kurve in Abb. 10 a) und gleichzeitig eine Probe zur Isolation von Gesamt-RNA entnommen. Mittels Northernhybridisierung wurde das *caMLT1*-spezifische Transkript mit der erwarteten Größe von 4,8 kb bestimmt (Abb. 10 b). Das temporäre Muster der *caMLT1*-Genexpression konnte durch eine semiquantitative Messung der relativen Signalintensitäten (RI) ermittelt werden (Säulen in Abb. 10 a). Hierbei wurde die Aktin-*(caACT1)*-spezifische mRNA als interner Standard herangezogen (308).

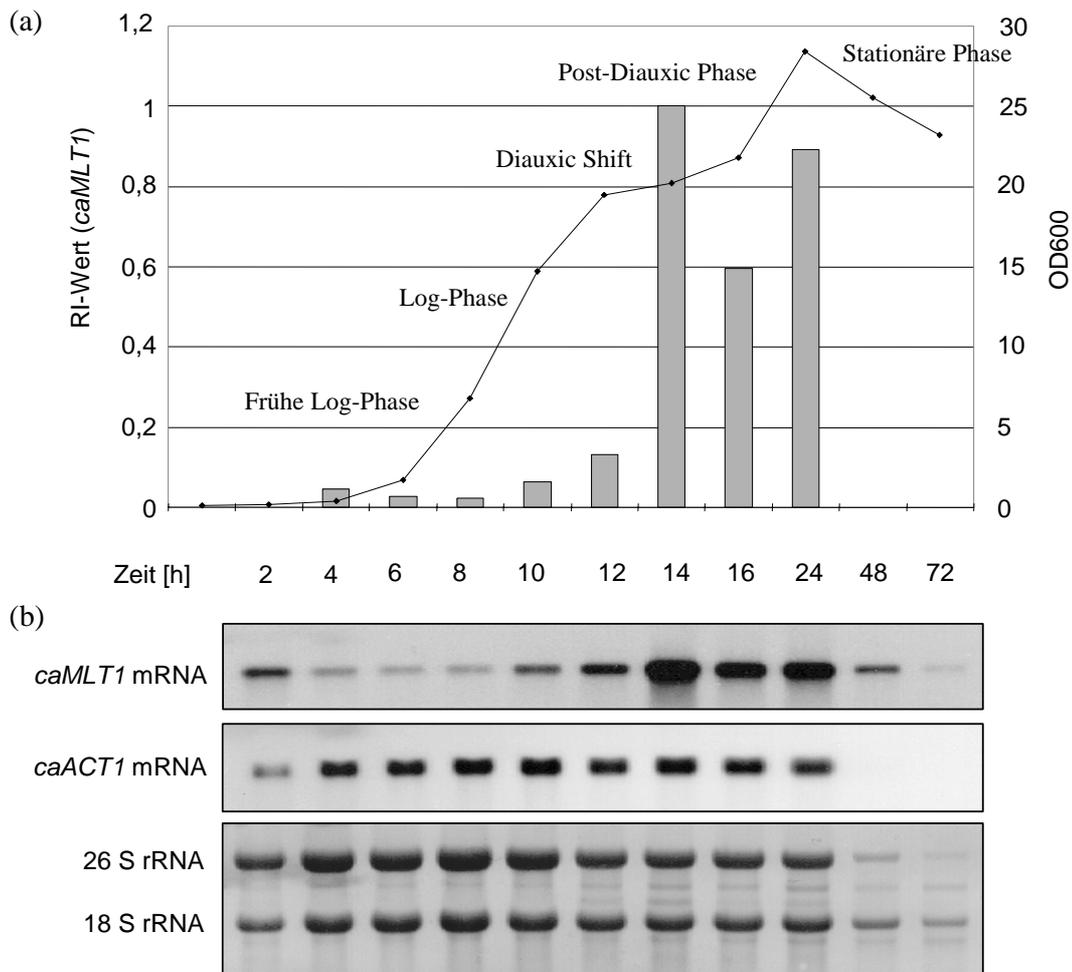


Abbildung 10: *caMLTI*-Transkription im Verlauf des Zellwachstums. (a) Wachstumskurve und Vergleich der relativen Intensitäten (RI) der *caMLTI*-Transkripte (Säulen). (b) Northernblotanalyse der korrespondierenden *caMLTI*-mRNA-Expression: Die geblottete Gesamt-RNA wurde mit der *MLT1#2*-Sonde hybridisiert (*MLTI*-spezifische Banden) sowie mit der *ACT1#1*-Sonde rehybridisiert (Aktin-spezifische Banden). Zur Qualitäts- und Ladungskontrolle der aufgetragenen RNA wurde der Northernblot mit Methyleneblau gefärbt (rRNA-Banden). Unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals wurden je Bande die Summe der Pixel-Intensitätseinheiten pro mm^2 ermittelt. Zur RI-Bestimmung der *caMLTI*-Signale wurden diese mit dem entsprechenden Aktinsignal standardisiert und anschließend auf den Wert mit der höchsten Intensität normalisiert, der den RI-Wert 1 erhielt (hier der 14-h-Wert). Die *caMLTI*-Signale aller weiteren Zeitpunkte wurden darauf abgeglichen

Die *caMLTI*-mRNA-Expression scheint während des Zellwachstums stark reguliert zu sein. So zeigte sich zu Beginn der frühen logarithmischen Wachstumsphase eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge im Northernblot, die während der weiteren logarithmischen Phase um das etwa 10-fache abnahm. Nach 10 h stieg das RNA-Expressionsniveau wieder leicht an, wobei am Ende der exponentiellen Phase, während des sogenannten *Diauxic-Shift*, eine stark Induktion erfolgte: Im Vergleich zu den 6-h- und 8-h-Werten, die die geringsten Intensitäten aufwiesen, war die Transkriptmenge nach 14 h Wachstum ca. 40-fach erhöht. Dieser hohe Transkriptpegel blieb

während der *Post-Diauxic*-Phase nahezu erhalten und reichte noch bis in die Stationäre Phase hinein (16 - 24 h). Nach 48 h Wachstum in YPD-Medium ließ sich qualitativ hochwertige Gesamt-RNA immer schwieriger isolieren, was auf einen verringerten mRNA-Gehalt der Zellen und vermutlich auch auf eine erhöhte RNase-Aktivität zurückgeführt werden kann. Dennoch ließ sich auch noch nach 48 h und 72 h für *caMLT1* eine spezifische Expression nachweisen; im Gegensatz zur Aktin-Kontrolle, deren mRNA-Gehalt mit Eintritt der Zelle in die Stationäre Wachstumsphase (24 h) abnahm.

2.2.2 *caMLT1*-Transkription unter Hyphen-induzierenden Bedingungen

C. albicans ist in der Lage sowohl als Hefe als auch als Hyphe zu wachsen. Dieser Dimorphismus ist eine typische und für die Pathogenität des Pilzes wichtige Eigenschaft (165). Der Wechsel zwischen den Wachstumsformen ist von äußeren Signalen, wie Temperatur, pH-Wert oder Mangel an bestimmten Nährstoffen abhängig und kann durch die Wahl des Mediums bestimmt werden (199).

Zur Analyse der *caMLT1*-Expression unter Hyphen-induzierenden Wachstumsbedingungen wurden drei verschiedene, in der Literatur beschriebene Medien gewählt: RPMI 1640 (Zellkulturmedium, ohne Zugabe von Glucose), Spider-Mannitol-Medium und Lee's Medium (154) pH 4,5 (für Hefenwachstum) bzw. pH 6,8 (für Hypheninduktion). Zellen des *C. albicans* Stammes SC5314 wurden aus der stationären Wachstumsphase heraus 1:100 in den angegebenen Wachstumsmedien angeimpft und bei 25°C für hefeförmiges Wachstum und bei 37°C für filamentöses Wachstum inkubiert. Nach 2 h und nach 6 h (nur Spider-Medium) wurden Proben entnommen, die Zellmorphologie mikroskopisch analysiert und Gesamt-RNA isoliert. Mittels Northernhybridisierungen konnte die *caMLT1*-mRNA detektiert und die relativen Intensitäten der Transkriptbanden semiquantitativ bestimmt werden.

Abbildung 11 zeigt, dass sich nach zweistündigem Wachstum der Pilzzellen bei 37°C in RPMI 1640 und im Spider-Mannitol-Medium (162) die *caMLT1*-Transkriptmenge im Vergleich zu den 25°C Kulturen um das ca. Zweifache erhöht. Die mikroskopische Kontrolle ergab dabei, dass die Pilzzellen nach 2 h Inkubation bei 37°C nahezu alle Keimschläuche ausgebildet hatten. Nach sechsstündigem Wachstum der Zellen in Spider-Mannitol-Medium (37°C) fiel das Transkriptionsniveau wieder auf unterhalb des Ausgangswerts ab. Die alleinige Erhöhung der Wachstumstemperatur auf 37°C scheint nicht ausreichend zu sein um die *caMLT1*-Expression zu steigern. So zeigte sich bei Wachstum der Zellen in YPD-Vollmedium bei 25°C (Hefenwachstum) und 37°C (Zellen wachsen als Blastosporen und nicht eindeutige filamentöse Mischformen) keine Änderung in der Höhe des mRNA-Levels. Kaum ein Unterschied im *caMLT1*-Transkriptlevel

konnte auch bei Wachstum der *C.-albicans*-Zellen im synthetischen Lee's Medium detektiert werden (Abb. 10). In diesem Medium wuchsen die Zellen bei pH 6,8 / 37°C als reine Hyphen und bei pH 4,5 / 25°C als Blastokonidien. Bei intermediären Bedingungen bildeten sich die Zellen bei pH 6,8 / 25°C als Hefen aus und bei pH 4,5 / 37°C als Pseudohyphen.

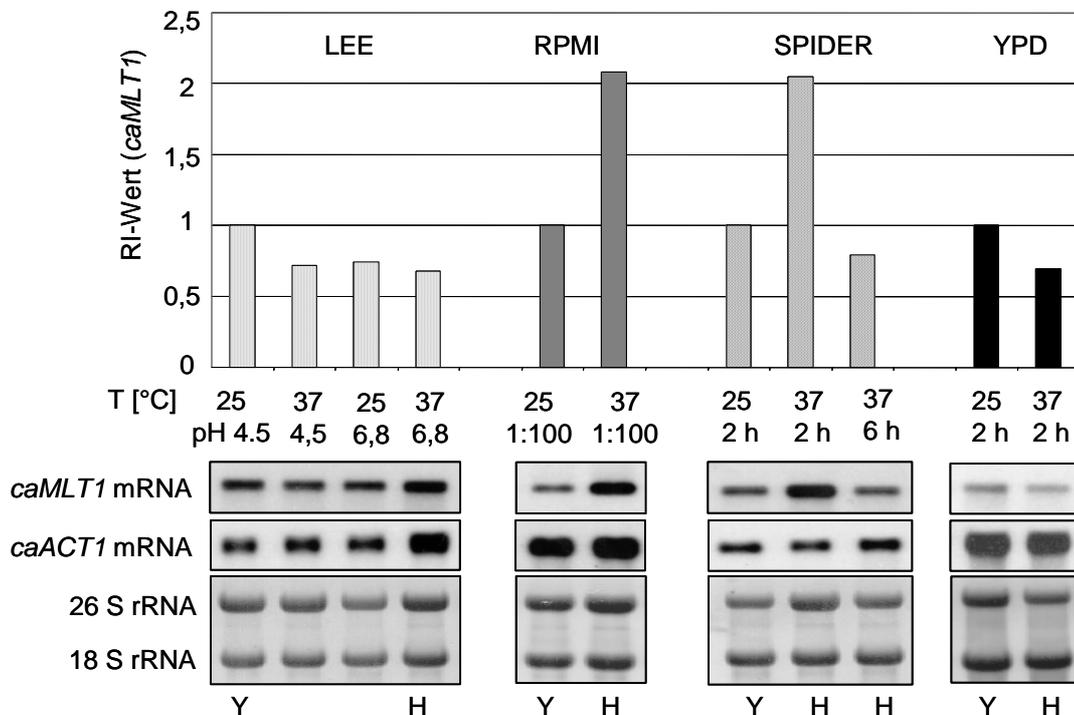


Abbildung 11: **Ermittlung des relativen caMLT1-mRNA-Niveaus unter Hypheninduktion.** SC5314-Zellen wurden in den angegebenen Medien bei 25°C und 37°C inkubiert, wobei die Zellmorphologie mit Y (Yeast) für Hefe und H für die Hyphe angegeben ist. Mit den Sonden MLT1#2 und ACT1#1 wurden Northernhybridisierungen durchgeführt. Methylblau-gefärbte rRNA-Banden dienten der Ladungskontrolle. Hierbei korrelierten die ACT1-Signalstärken sehr gut mit den aufgetragenen rRNA-Mengen und blieben zwischen den beiden Morphogeneseformen relativ konstant. Für eine Veröffentlichung zur Untersuchung der Morphogenese-unabhängigen Regulation des Aktin-Transkriptlevels siehe (66). Zur semiquantitativen Bestimmung der relativen Intensitäten (RI) der caMLT1-Signale wurden diese mit dem entsprechenden Aktinsignal standardisiert und anschließend auf den Wert bei 25°C Wachstum normalisiert, der willkürlich gleich 1 gesetzt wurde.

2.3 Subzelluläre Proteinlokalisierung von caMlt1p

Die hohe Ähnlichkeit von caMlt1p in Primärsequenz und Struktur zu dem Transportprotein scYcf1p wirft die Frage auf, ob auch funktionale Analogien vorliegen könnten. ScYcf1p ist als Effluxpumpe in die Detoxifikation der Zelle involviert und in der Vakuolenmembran lokalisiert (303). Mittels genomischer Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP (*green fluorescent protein*) der Qualle *Aequorea victoria* sollte die Lage von caMlt1p innerhalb der

Pilzzelle bestimmt werden. Auf GFP-basierende Reportersysteme haben den Vorteil, dass keine Kofaktoren zur *GFP*-Genexpression benötigt werden und dass das resultierende Fluoreszenzsignal in lebenden Organismen auf Ebene der Einzelzelle detektiert werden kann.

Zur subzellulären Lokalisation von caMlt1p wurde eine genetisch veränderte *GFP*-Genversion (*GFP**) gewählt, die chromophore Mutationen für eine verstärkte Fluoreszenz enthält sowie ein CTG zu TTG Codonaustausch, der die Expression eines funktional aktiven GFPs in *C. albicans* möglich macht (183). Nach einer abgeänderten Version der Methode nach Wach und Mitarbeitern (299) wurde nun das *GFP**-Gen C-terminal mit *caMLT1* fusioniert (siehe Kapitel IV 7.4.1). Die resultierende *MLT1-GFP**-Kassette ist in Abbildung 12 a dargestellt.

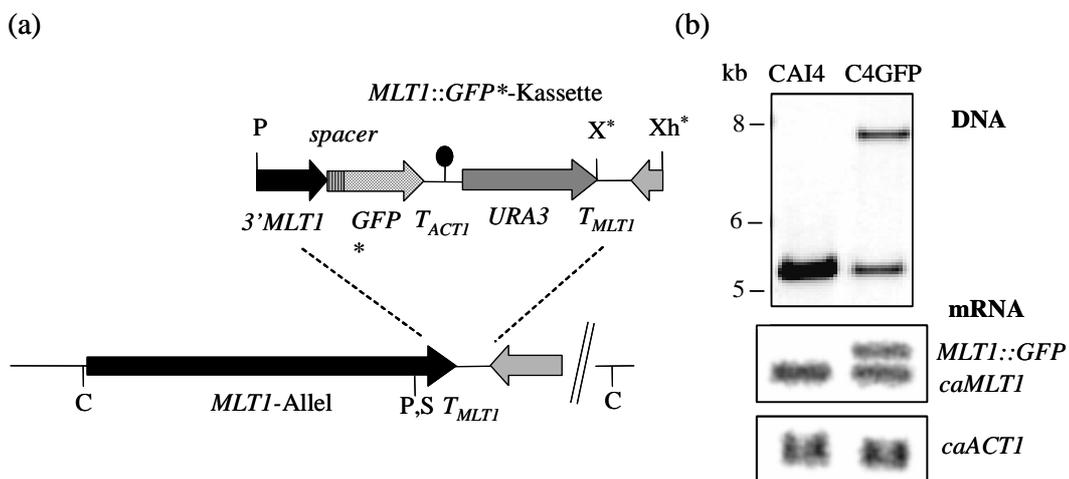


Abbildung 12: Konstruktion und Überprüfung des genomisch *GFP**-markierten *C.-albicans*-Stamms C4GFP.

(a) Dargestellt ist die Struktur der *MLT1-GFP**-Fusionskassette sowie dessen Integration in ein *caMLT1*-Allel durch intrachromosomale homologe Rekombination. Die zur Konstruktion verwendeten Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen sind angegeben. Über Primer eingebrachte Spaltsequenzen sind mit * gekennzeichnet. Der graue Pfeil stellt ein angrenzendes ORF dar. C (*ClaI*), M (*MluI*), P (*PstI*), S (*SpeI*), X (*XbaI*), Xh (*XhoI*). (b) Überprüfung des Transformanden C4GFP auf DNA- und mRNA-Ebene. DNA: Isolierte chromosomale DNAs der Stämme CAI4 und C4GFP wurden *ClaI* verdaut und mit der *caMLT1*-spezifischen Sonde *MLT1#1* hybridisiert. mRNA: Isolierte Gesamt-RNAs wurden mit den DNA-Sonden *MLT1#2* (spezifisch für *caMLT1*) und *ACT1#1* (spezifisch für *caACT1*) hybridisiert.

Sie besteht aus C-terminalen 260 Basenpaaren von *caMLT1*, die unter Einbringung eines 27 bp umfassenden Einschubs (*spacer*) mit dem *GFP**-Gen *inframe* fusioniert sind, so dass der Leserahmen erhalten bleibt. Der dahinter geschaltete *caACT1*-Terminator dient als Transkriptionsstop für das fusionierte Gen und *caURA3* als Selektionsmarker. Die sich anschließenden 221 bp aus der *caMLT1*-flankierenden Sequenz ermöglichen die gezielte Insertion

durch homologe Rekombination der *MLT1-GFP**-Fusionskassette in ein *caMLT1*-Allel. Das *MLT1-GFP**-Fusionskonstrukt wurde als lineares *PstI/XhoI*-Fragment in den *ura3*-negativen Stamm CAI4 transformiert. Die Ura-prototrophen Transformanten wurden mittels Southernblot auf die korrekte genomische Integration des *MLT1-GFP**-Fragments überprüft (Abb. 12 b). In den *C. albicans*-Stamm C4GFP (Abb. 12 b, Spur 2) erfolgte die Integration des *MLT1-GFP**-Fragments in ein *MLT1*-Allel des Stammes CAI4 (Spur 1), so dass die wildtypische *caMLT1*-spezifische Bande eines Allels bei *ClaI*-Verdau der isolierten chromosomalen DNA von ca. 5,3 kb auf ca. 7,8 kb vergrößert wurde. Die Expression des *MLT1-GFP**-Fusionskonstrukts im Stamm C4GFP konnte auf Ebene der mRNA im Northernblot nachgewiesen werden, wobei sich neben der wildtypischen Bande eine zweite, ca. 1 kb größere *caMLT1*-spezifische Bande (*MLT1::GFP*, Abb. 12 b, Spur 2) detektieren ließ.

Abbildung 13 zeigt die mikroskopische Analyse des Stammes C4GFP. Die Zellen wurden über Nacht in YPD-Medium angezogen und ohne weitere Fixierungsschritte mikroskopisch betrachtet (Bild A - D). Es zeigte sich innerhalb des Zytoplasmas lebender Blastokonidien des Stammes C4GFP eine ringartige GFP-Fluoreszenz. Diese grün leuchtenden, ringartigen Strukturen ließen sich auch in Zellen detektieren, die in Hyphen-induzierendem Medium angezogen wurden (Bild E - F). GFP-markierte Blastokonidien wurden zusätzlich mit dem Styrylfarbstoff FM4-64 gefärbt. Styrylfarbstoffe sind gegenüber Membranpotentialen sensitiv und werden vermutlich über einen endozytischen Mechanismus über die Plasmamembran und zytoplasmatischen Intermediaten schließlich in die Vakuolenmembran eingelagert (296). Die gleichzeitige Färbung GFP-markierter Zellen mit dem Farbstoff FM4-64, der sich spezifisch in die Membran von Vakuolen einlagerte, macht eine Kolokalisation des *caMlt1-GFP**-Fusionsproteins mit dieser Membran deutlich.

2.4 In vitro Untersuchungen zur Funktionalität von caMlt1p

2.4.1 CaMLT1-Transkription in Anwesenheit zytotoxischer Substanzen

Als ein mögliches vakuolares Membranprotein könnte die Funktion von *caMlt1p* darin liegen als Transporter zytotoxische Substanzen aus dem Zytoplasma in die Vakuole zu schleusen. Aufgrund seiner hohen Similarität zu *scYcf1p*, einer Glutathion-S-Conjugat-Pumpe, wurde untersucht, ob die *caMLT1*-Expression durch die Anwesenheit der *scYcf1p*-Substrate und wachstumshemmenden Substanzen Cadmium (CdCl_2) und 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol (CDNB), einem Glutathion S-Conjugat Vorläufer, beeinflusst wird.

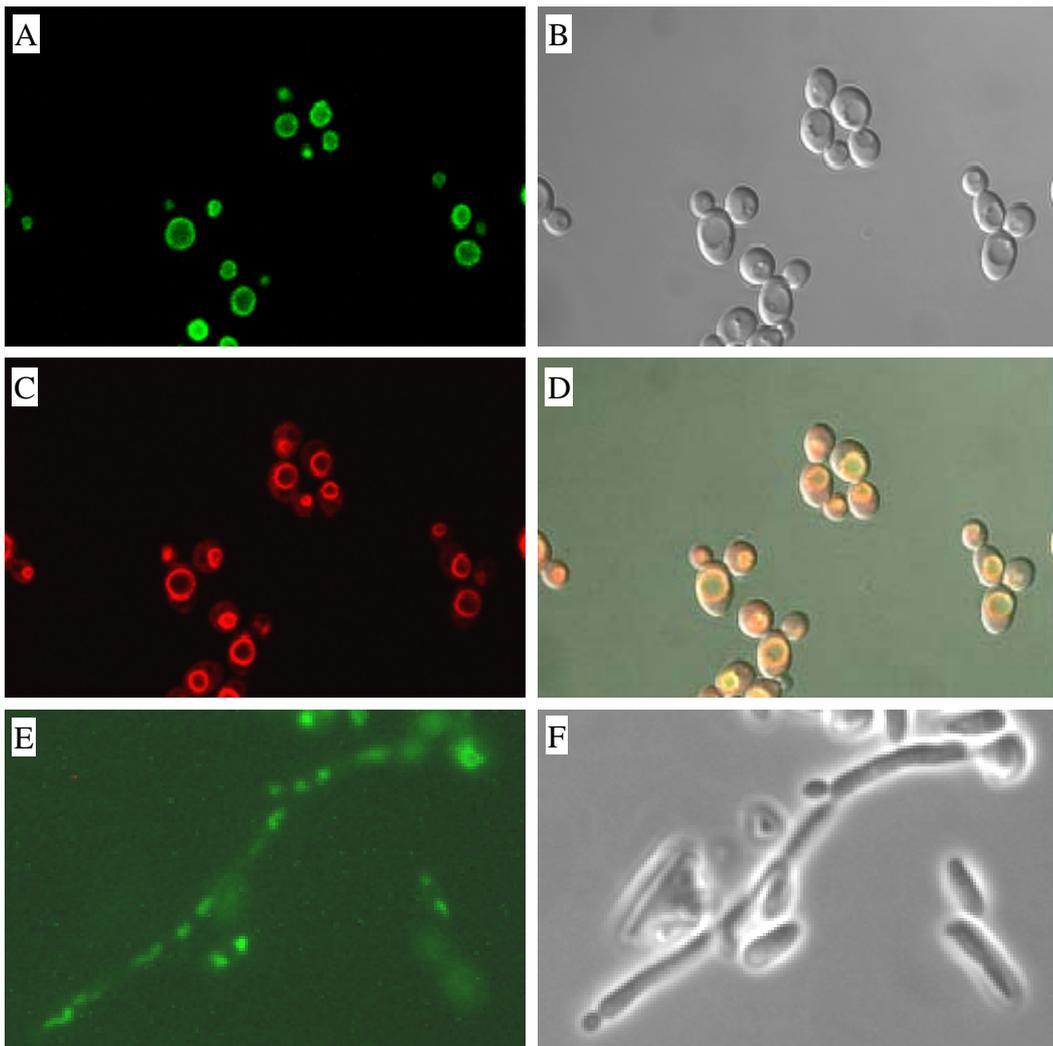


Abbildung 13: **Lasermikroskopische Aufnahmen lebender C4GFP-Zellen zur intrazellulären Lokalisation des caMlt1-Transportproteins.** (A - D) Für die Mikroskopie wurden die Hefezellen über Nacht in YPD-Medium angezogen und zusätzlich mit FM4-64 gefärbt. (E - F) Zur Induktion von Hyphen wurden die Zellen 1:100 verdünnt und in Lee's Medium pH 6,8 bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Parameter der Lasermikroskoptaufnahmen wurden in (A) und (E) auf GFP und in (C) auf FM4-64 eingestellt. In Bild (B) werden die Vakuolen durch DIC-(*differential interference contrast*)-Aufnahme sichtbar. Bild D zeigt alle drei Aufnahmetechniken überlagert, so dass die Kolokalisation (gelb) der GFP- und FM4-64-Fluoreszenz in der vakuolaren Membran sichtbar wird. Bild F zeigt eine Phasenkontrastaufnahme.

Zu diesem Zweck wurden *C. albicans* SC5314-Zellen in Medium angezogen, dem subinhibitorische Konzentrationen an CdCl₂ (100 µM) oder CDNB (40 µM) zugegeben wurden. Bei einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 erreichten die Kulturen nach 6 h Wachstum in YPD eine für die RNA-Isolierung gewählte OD von 1,5. Die Hefekulturen, die in YPD + CdCl₂ oder in YPD + CDNB wuchsen zeigten eine leichte Verlangsamung des Wachstums und erreichten eine OD₆₀₀ von 1,5 nach 8 h. Northernhybridisierungen isolierter Gesamt-RNA ergaben einen deutlichen

Mengenanstieg der *caMLT1*-mRNA, wenn dem Wachstumsmedium Cadmiumionen (3,9-fach) oder CDNB (2,3-fach) zugegeben worden war (Abb. 14). Vergleichbare Daten wurden auch für die Deregulation der *scYCF1*-mRNA beschrieben (159).

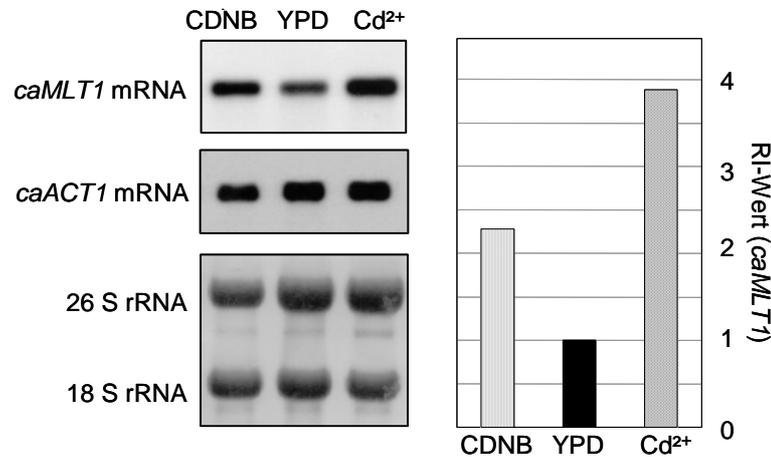


Abbildung 14: *caMLT1*-Expression in SC5314-Zellen in Anwesenheit von CdCl₂ und CDNB. Die Zellen wurden in YPD-Medium (bis OD₆₀₀ 1,5) unter Zugabe von 100 µM CdCl₂ oder 40 µM CDNB angezogen. Aus den behandelten Zellen und der Kontrolle (reine YPD-Kultur) wurde Gesamt-RNA isoliert und die *caMLT1*-spezifische mRNA mittels Northernhybridisierungen mit der Sonde MLT1#2 detektiert. Spezifische *caACT1*-mRNA-Signale wurden durch Rehybridisierung des Blots mit ACT1#1 erhalten und die rRNA-Banden durch Methylenblaufärbung. Für die Ermittlung der relativen *caMLT1*-mRNA-Mengen (RI) wurden die Bandenintensitäten ermittelt und mit dem entsprechenden *caACT1*-Signal normalisiert, wobei der Wert der YPD-Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde.

2.4.2 Komplementationsversuch eines *scycf1*-negativen Stammes

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *caMLT1*-Transkription durch die Anwesenheit von Cadmiumionen und CDNB induziert wird, ist eine Beteiligung des caMlt1-Proteins am Transport dieser Substanzen aus dem Zytoplasma zur Entgiftung der Pilzzelle denkbar. Durch Einbringung des *caMLT1*-Gens in einen *scycf1*-negativen *S. cerevisiae*-Stamm sollte nun überprüft werden, ob caMlt1p am Transport von Cadmiumionen in die Zellvakuole beteiligt ist und möglicherweise den Cadmium-hypersensitiven Phänotyp der *S. cerevisiae*-Mutante *in trans* komplementieren kann. Zu diesem Zweck wurden das *scYCF1*-Gen im Plasmid pJAW50, das freundlicherweise von W. S. Moye-Rowley zur Verfügung gestellt wurde, durch das wildtypische *caMLT1*-Gen ersetzt (siehe auch Kapitel IV 7.4.2). Sowohl das konstruierte, *caMLT1*-tragende Plasmid pMLT424 als auch das *scYCF1*-tragende Kontrollplasmid pJAW50 wurden in den *scycf1*-negativen Stamm JWY53 (ebenfalls von W. S. Moye-Rowley zur Verfügung gestellt) transformiert. Da beide Vektoren *TRP1* als Selektionsmarker enthalten und der Stamm JWY53 auxotroph für Tryptophan ist, wurden für die Selektion positiver Transformanten SD-Agarplatten ohne Tryptophan eingesetzt. Positive

pMLT424-Transformanten wurden auf *caMLT1*-Genexpression mittels Northernblotanalyse untersucht.

Tabelle 9 gibt das Ergebnis des Komplementationsversuchs wieder. Beide Plasmid-tragenden JWY53-Stämme wurden auf ihre Sensitivität gegenüber aufsteigenden Konzentrationen an CdCl₂ in SD-Agarplatten getestet. Entsprechend den veröffentlichten Daten von Szczycka (282) zeigte die *scycf1*-negative Mutante bei 100 µM CdCl₂ kein Wachstum mehr, wohingegen die Expression des *scYCF1*-Gens ausgehend vom Plasmid pJAW50 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cadmiumionen führte (Wachstum bis > 350 µM CdCl₂). Im Gegensatz dazu ließ sich der hypersensitive Phänotyp des *scycf1*-negativen Stammes JWY53 durch die Einbringung des *caMLT1*-Gens nicht komplementieren. *S. cerevisiae* JWY53-Zellen, die den pMLT424-Vektor tragen (Tryptophan-positiv) verhielten sich weiterhin hypersensitiv gegenüber Cadmium.

Tabelle 9: **Komplementationsversuch des Cadmium-hypersensitiven Phänotyps von *S. cerevisiae* JWY53 mit dem *caMLT1*-tragenden Vektor pMLT424.**

CdCl ₂	JWY53 (<i>trp1</i> -, <i>ycf1</i> -)		JWY53 + pMLT424 (<i>TRP1</i> , <i>caMLT1</i>)		JWY53 + pJAW50 (<i>TRP1</i> , <i>scYCF1</i>)	
	SD/Tryp-	SD/Tryp+	SD/Tryp-	SD/Tryp+	SD/Tryp-	SD/Tryp+
0 µM	-	+	+	+	+	+
50 µM	-	+	+	+	+	+
100 µM	-	-	-	-	+	+
200 µM	-	-	-	-	+	+
350 µM	-	-	-	-	+	+

2.5 Mutagenese von *caMLT1* mittels *URA3*-Blaster im *ura3*-negativen Stamm

Die Inaktivierung von Genen ist eine grundlegende molekularbiologische Methode, um die biologische Rolle der entsprechenden Genprodukte zu ermitteln. Im Folgenden wurden zur *in vitro* und *in vivo* Analyse der caMlt1p-Funktion *camlt1*-negative Mutanten hergestellt. Hierbei wurde zunächst auf die von Fonzi und Irwine beschriebene *URA3*-Blaster-Methode zurückgegriffen, die das *caURA3*-Gene von *C. albicans* als selektierbaren Marker in einem Uridin-auxotrophen Hintergrund nutzt (87).

Für die Herstellung der Mutanten wurde der Stamm CAI4 herangezogen, einem *ura3*-negativen Abkömmling des Wildtyps SC5314. In einer ersten Transformationsrunde wurde die *MLT1-URA3*-

Blaster-Kassette durch homologe Rekombination und unter Deletion eines 1850 bp großen *caMLT1*-Bereichs (Pos. +192 bis +2041) in eines der beiden wildtypischen *caMLT1*-Allele inseriert (Abb. 15 a). Die *MLT1-URA3*-Blaster-Kassette besteht aus dem *hisG-URA3-hisG*-Konstrukt flankiert von *caMLT1*-Gensequenzen (siehe auch Kapitel IV 7.4.3). Durch spontane intrachromosomale homologe Rekombination der beiden *hisG*-Repeats und Selektion auf FOA-Agarplatten ließ sich der *URA3*-Marker gezielt wieder aus dem inaktivierten *caMLT1*-Allel der heterozygoten Mutante C10 entfernen. In einer zweiten Transformationsrunde wurde das zweite noch wildtypische *caMLT1*-Allel der nun entstandenen *ura3*-negativen heterozygoten Mutante C10-1 ebenfalls inaktiviert. Die so erhaltene *camlt1*-negative Mutante C10-11 ist wieder Uridinprototroph und zeigt im Northernblot keine *caMLT1*-Transkriptbande mehr. Abbildung 15 b zeigt eine Southernblotanalyse nach *SwaI*-Verdau isolierter chromosomaler DNAs sowie eine Northernblotanalyse isolierter Gesamt-RNAs der konstruierten Deletionsmutanten.

2.5.1 Analyse des *in vitro* Wachstumphänotyps der *camlt1*-Mutanten im Stamm CAI4

Die heterozygoten Mutantenstämme (C10, C10-1) und die homozygote Ura⁺-Mutante C10-11 wurden für phänotypische *in vitro* Analysen hinsichtlich Wachstum und Hyphenbildung sowie in Resistenztests eingesetzt. Als Vergleich wurden sowohl der Ura⁻-Ausgangsstamm CAI4 als auch dessen prototropher Vorgänger SC5314 herangezogen.

Plattenausstriche der Mutantenstämme auf YPD und SD +/- Uridin (30°C für 3 Tage) sowie Wachstum in Flüssigmedien (30°C, OD₆₀₀-Messungen bis zu 48 h) zeigten keine Wachstumsunterschiede zu den wildtypischen Stämmen. Auch die mikroskopische Kontrolle ergab keine Unterschiede hinsichtlich Zellmorphologie oder Vakuolenmorphologie. Bei Wachstum der *camlt1*-Nullmutante C10-11 unter hypheninduzierenden Bedingungen (Lee's Medium pH 6,8, Spider und 10 % Serum) bildete dieser Stamm ebenso wie der Vergleichsstamm SC5314 Keimschläuche und Hyphen aus.

Sensitivitätstests

In *S. cerevisiae* zeigen *scyf1*-Nullmutanten einen hypersensitiven Phänotyp gegenüber Cadmium, da das scYcf1-Protein durch den Transport der Cadmiumionen als Gluthation-S-Konjugat in die Pilzvakuole das Zellzytoplasma entgiftet (159, 160). Aufgrund der großen Ähnlichkeit des caMlt1-Transporters zu Ycf1p von *S. cerevisiae* und der Tatsache, dass CdCl₂ die Transkription von *caMLT1* induziert, wurde als nächstes untersucht, ob die *camlt1*-Mutanten gegenüber CdCl₂ einen hypersensitiven Phänotyp ausbilden. Hierfür wurde das Wachstum des Mutantenstamms C10-11

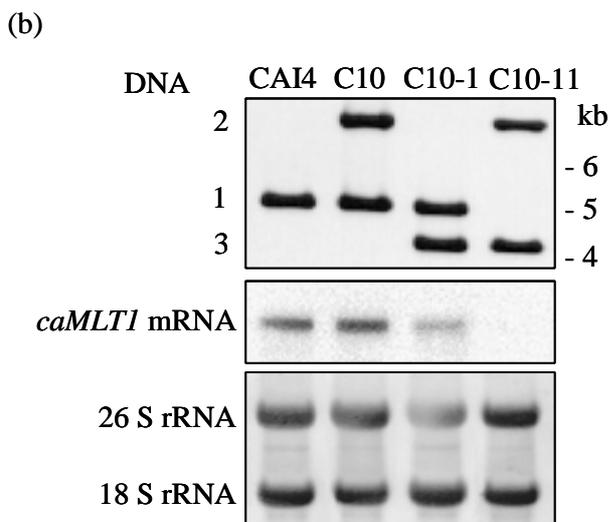
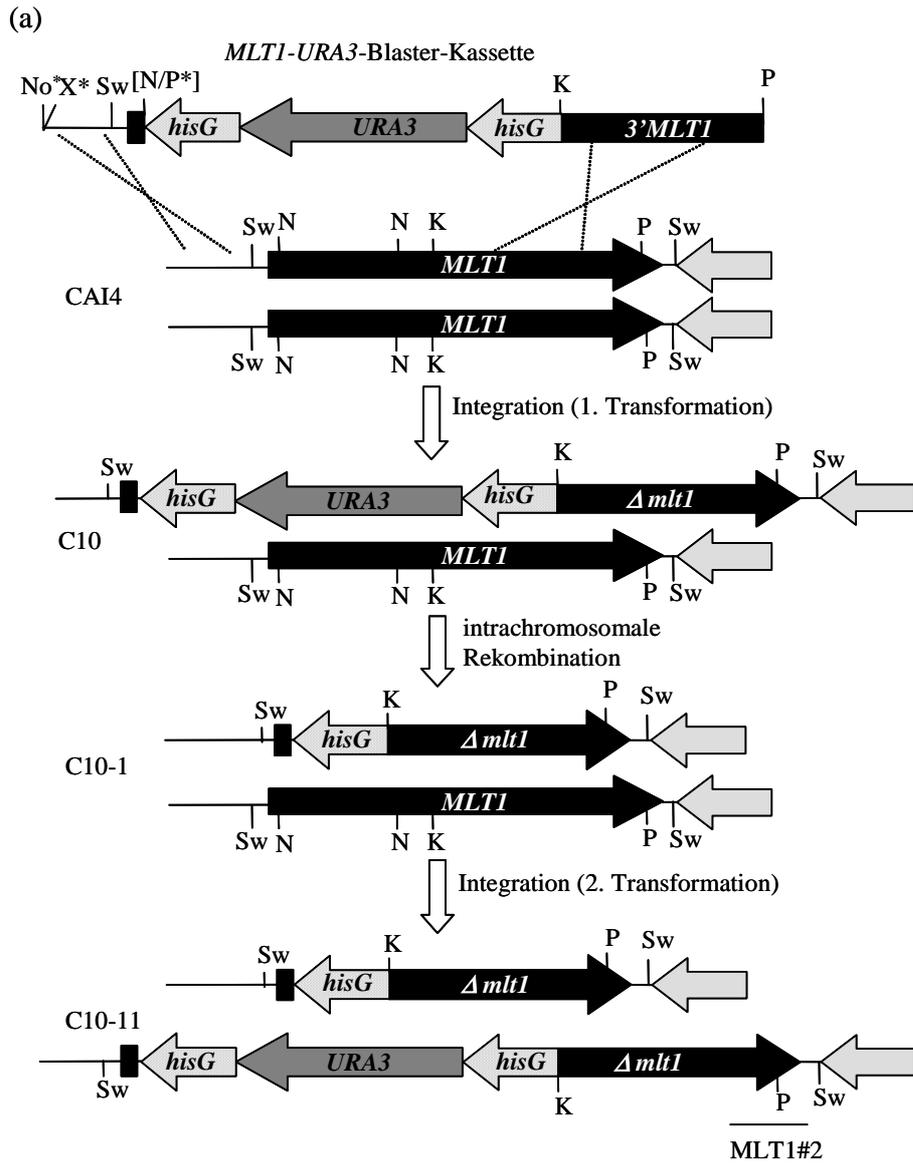


Abbildung 15: **Inaktivierung des *caMLT1*-Gens im Stamm CAI4 mittels Integration einer selektierbaren *URA3*-Markerkassette.** (a) Schematische Darstellung der Mutagenese-strategie. Angegeben sind die Stammbezeichnungen C10 ($\Delta mlT1::hisG-URA3-hisG / MLT1$), C10-1 ($\Delta mlT1::hisG / MLT1$) sowie C10-11 ($\Delta mlT1::hisG / \Delta mlT1::hisG-URA3-hisG$) und die für die Konstruktion relevanten Schnittstellen, wobei mit * markierte Sites Primer oder Vektor generiert sind. K (*KpnI*), Sw (*SwaI*), N (*NsiI*), No (*NotI*), P (*PstI*), X (*XbaI*). (b) Southernblotanalyse *SwaI*-verdauter genomischer DNAs der konstruierten *camlt1*-Mutanten und Northernblotanalyse isolierter RNAs. Die Hybridisierung beider Blots erfolgte mittels *MLT1#2*-Sonde, wobei die folgenden Banden detektiert wurden: wildtypische(s) *caMLT1*-Allel(e) (Bande 1), inaktiviertes *caMLT1*-Allel mit [*hisG-URA3-hisG*]-Insertion (Bande 2), inaktiviertes *caMLT1*-Allel mit *hisG*-Insertion (Bande 3), *scaMLT1*-mRNA-spezifische Bande.

und der Vergleichsstämme in Gegenwart subinhibitorischer bis inhibitorischer Cadmiumkonzentrationen auf SD-Agarplatten (+/- Uridin; 0, 100, 250, 350 und 500 μM CdCl_2) und in Mikroverdünnungsreihen (0 - 2 mM CdCl_2) getestet (siehe Kapitel IV 6.4.2). Die *camlt1*-Nullmutante zeigte gegenüber Cadmium dieselbe Sensitivität wie die wildtypischen Stämme: Mit zunehmender Cadmiumionenkonzentration nahm das Wachstum aller getesteten Stämme im gleichen Maße ab, wobei in beiden Testsystemen bei 500 μM CdCl_2 das Zellwachstum vollständig inhibiert war.

Als Transportprotein, das vermutlich in der Membran der Vakuole lokalisiert ist, könnte die Funktion von *caMlt1p* auch im Transport anderer Ionen oder toxischer Verbindungen liegen. So ist für *scYcf1p* bekannt, dass es neben divalenten Kationen, wie Cadmium und Nickel, auch gegenüber Arsenit und Arsenat (Arsenat wird in der Zelle zunächst in Arsenit enzymatisch reduziert) oder oxidativen Substanzen, wie z. B. Diamid, Resistenz verleiht (103, 282, 303). Auch ist bekannt, dass ABC-Transportproteine oftmals polyspezifisch sind, also eine Vielzahl an strukturell verwandter aber auch nicht verwandter Verbindungen transportieren können (13). Aus diesem Grund wurde die Sensitivität der *camlt1*-Nullmutante gegenüber einer Auswahl wachstumshemmender anorganischer und organischer Verbindungen in Plattenausstrichen getestet (Tab. 10). Veränderungen in der Empfindlichkeit der Mutante gegenüber der getesteten Substanz könnte diese als mögliches *caMlt1p*-Transportsubstrat identifizieren. Einige medizinisch relevante, antimykotisch wirksame Substanzen (Azolderivate sowie Terbinafin und Amorolfing) wurden zusätzlich in Mikroverdünnungsreihen getestet. Keine der überprüften Agentien rief in den verwendeten Testmodellen bei der *camlt1*-Mutante einen zum Wildtyp unterschiedlichen Phänotyp hervor.

Tabelle 10: Toleranztests der in *caMLT1* mutierten Stämme gegenüber anorganischen und organischen, wachstumshemmenden Agentien sowie Antimykotika^{1,2}.

Metalle	Nichtmetalle	metabolische Inhibitoren	Oxidanzien	Antimykotika
Cd ²⁺ (0,5) ²	[As(V)]	Kristallviolett	Diamid	Fluconazol (4) ²
Ni ²⁺		Brefeldin A		Ketoconazol (0,12) ²
Co ²⁺		Fluphenazin		Terbinafin (16) ²
Cr ²⁺		Nocodazol		Amorolfiin (0,04) ²
Pb ²⁺				
Ag ²⁺				

¹ Filterplättchen wurden mit inhibitorischen Konzentrationen der Testsubstanz getränkt und mittig auf die sternförmig zulaufenden Ausstriche der Stämme CAI4, SC5314 und C10-11 (*mlt1/mlt1*) gelegt (siehe Kapitel IV 6.4.2).

² Die Bestimmung der MHK von Cadmiumchlorid in mM bzw. Fluconazol, Ketoconazol, Terbinafin und Amorolfiin in µg/ml für die Stämme SC5314, CAI4 und C10-11 wurde in Mikroverdünnungsreihen ermittelt (siehe Kapitel IV 6.4.2). Die Ablesung erfolgte per Auge nach 48 h Inkubation in SD-Medium mit Uridin-Zugabe und steigenden Konzentrationen der inhibitorischen Testsubstanzen. Als MHK wurde die Konzentration angegeben, bei der kein Wachstum mehr sichtbar war.

2.6 Etablierung eines MPA-resisteneten *caIMH3*-Allels als dominanter Selektionsmarker zur Genmutagenese im wildtypischen Stamm

2.6.1 Beweggründe und Funktionsprinzip

Das *URA3*-Gen von *C. albicans* kodiert für die Orotidin-5'-Monophosphat-(OMP)-Decarboxylase, dem Enzym, dass die Konversion von OMP in Uridin-5'-Monophosphat (UMP) katalysiert, dem letzten Schritt in der *de novo* Pyrimidinbiosynthese. Ein Eingriff in diesen Weg, z. B. durch Deletion des *caURA3*-Gens, hat einen negativen Einfluss auf die *in vivo* Zellwachstumsrate und auf die Virulenz (136). So ist der Stamm CAI4, der als Ausgangsstamm für die Genmutagenese mittels *URA3*-Blaster-Technik meist verwendet wird, auf Grund seiner Ura-Auxotrophie im Tiermodell avirulent. Lay und Mitarbeiter zeigten zudem, dass die Expression des *URA3*-Markers in CAI4-Stämmen (die heterozygote oder homozygote Deletionen in verschiedenen Genen trugen) zu unterschiedlichen OMP-Decarboxylase Aktivitäten führt, was wiederum den generellen Virulenzphänotyp mit beeinflusst (153, 281). Da in diesen Stämmen das *caURA3*-Gen nicht mehr an seinem nativen Locus im Genom liegt sondern im jeweils zu deletierenden Zielgen, könnten sich Positionseffekte für die abweichenden OMP-Decarboxylase-Aktivitäten verantwortlich zeigen (118). Darüberhinaus scheint im CAI4 ein zum deletierten *caURA3*-Gen angrenzender ORF beschädigt zu sein, so dass Veränderungen im Eisenmetabolismus auftreten könnten (61).

So war die Konstruktion von *camlt1*-Deletionsmutanten mit ansonsten zum SC5314-Wildtyp isogenen Hintergrund wünschenswert, insbesondere für die Untersuchung des Virulenzverhaltens von caMlt1p-negativen Stämmen in Tiermodellen. Ein dominanter, selektierbarer Marker, der in einem wildtypischen Hintergrund genutzt werden könnte, war bis zu diesem Zeitpunkt für *Candida* jedoch nicht verfügbar und sollte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden. Hierfür wurde auf Arbeiten von Köhler und Mitarbeitern zurückgegriffen, die das Inosinmonophosphat-(IMP)-Dehydrogenase-Gen (*IMH3*) aus *C. albicans* isoliert hatten (141). Die Arbeiten zeigten, dass eine Plasmid-vermittelte Überexpression des *caIMH3*-Gens *C.-albicans*-Zellen gegenüber Mykophenolsäure (MPA) Resistenz verlieh wodurch eine positive Selektion transformierter *Candida*-Zellen möglich wurde. Die Isolation eines mutierten *caIMH3*-Allels (*MPA^R*), das im Vergleich zum wildtypischen Allel einen Aminosäure-Austausch aufweist (G. Köhler, persönliche Information) und *C. albicans* eine erhöhte MPA-Resistenz verlieh, bildete den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines dominanten *MPA^R*-Markersystems, wie er zur genetischen Manipulation von Wildstämmen benötigt wird.

2.6.2 Untersuchungen hinsichtlich der Selektionierbarkeit nach Integration des *MPA^R*-Gens als Einzelkopie ins Genom

Zunächst musste festgestellt werden, ob das *MPA^R*-Allel ektopisch als Einzelkopie ins Genom integriert genügend Resistenz verleiht, um transformierte Zellen auf MPA-haltigen Platten selektionieren zu können. Hierfür sollte das *MPA^R*-Allel gezielt in den *MLT1*-Lokus eines prototrophen *C.-albicans*-Stamms integriert werden.

Abbildung 16 a zeigt die hierfür konstruierte p5CMPA^R-Insertionskassette, die den *MPA^R*-Marker umgeben von 5'- und 3'-*caMLT1*-Gensequenzen enthält. Die Integration des Markers in ein *caMLT1*-Allel sollte durch homologe Rekombination der Randfragmente unter Deletion eines 2,5 kb großen *caMLT1*-Bereichs erfolgen. Die linearisierte Insertionskassette wurde in kompetente Zellen des wildtypischen *C.-albicans*-Stamms SS transformiert, welche anschließend auf SD-Medium mit 10 µg/ml und 20 µg/ml Mykophenolsäure ausplattiert wurden. Die Wahl der MPA-Konzentrationen richtete sich nach veröffentlichten MHK-Testreihen, die gezeigt hatten, dass in Mikrotiter-Verdünnungsreihen 10 µg/ml MPA nötig sind um eine über 90%ige Wachstumshemmung beim Stamm SS zu erreichen (141). Hier bleibt anzumerken, dass bei der Sensitivität gegenüber MPA stammspezifische Unterschiede auftreten können.

Nach fünf Tagen Wachstum bei 30°C konnten von den MPA-SD-Platten beider Konzentrationen mögliche Transformanten gepickt und auf MPA-haltigem Medium (10 µg/ml) überstrichen

werden. Hierbei zeigte sich, dass einige der gepickten Transformanten eine uneinheitliche Koloniezusammensetzung aufwiesen wobei auch nach nochmaligem Überstreichen einzelner Klone auf MPA-haltige Platten ein Gemisch großer und kleiner Kolonien auftrat. Der Grund für diesen Effekt könnte in der Verwendung von Mykophenolsäure als Selektionsdruckmittel liegen. Zur Kontrolle und Gewinnung von Reinkulturen wurden deshalb alle gepickten Klone auf Platten ausgestrichen, die 10 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ Mykophenolsäure enthielten. Auf Minimalagarplatten mit

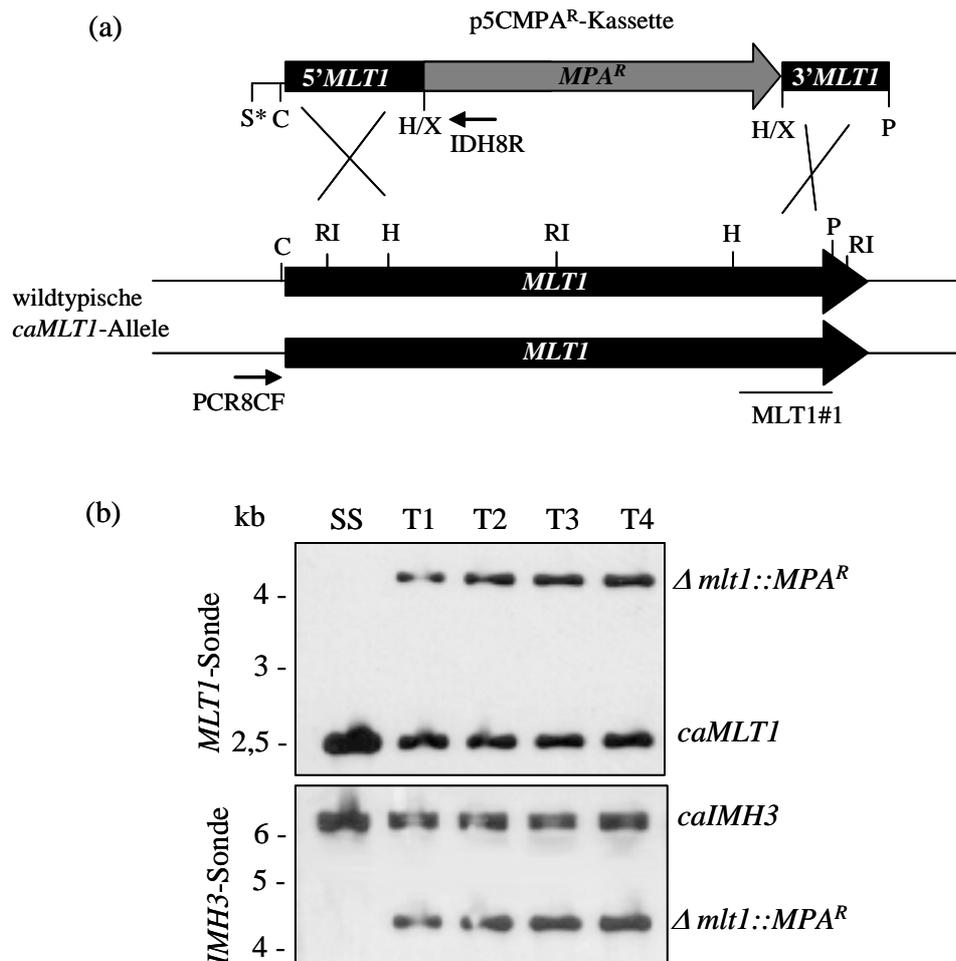


Abbildung 16: **Integration des MPA-resistenten *caIMH3*-Allels (MPA^R) in den *caMLT1*-Lokus.** (a) schematische Darstellung der Integration. PCR-Primer sind durch Pfeile angezeigt. C (*ClaI*), H (*HindIII*), P (*PstI*), RI (*EcoRI*), S (*SalI*), X (*XbaI*); * (Vektor generiert). (b) zeigt eine Southernblotanalyse *EcoRI* verdauter chromosomaler DNAs, die aus MPA-resistenten und PCR-positiven Transformanten isoliert wurden (T1 - T4). In Spur 1 wurde jeweils die DNA des Wildtyps *C. albicans* SS aufgetragen. Die DNAs wurden mit der *caMLT1*-spezifischen Sonde MLT1#1 und der *caIMH3*-spezifischen Sonde IMH3#1 hybridisiert. Die im Blot auftretenden zwei wildtypischen *caIMH3*-spezifischen Banden resultieren aus einem Alleldimorphismus. In einem der beiden *IMH3*-Allele des *C.-albicans*-Stamms SS befindet sich in der Terminatorregion eine 200 bp große Insertion (G. Köhler, persönliche Information), die ein potentielles Φ -ähnliches LTR-Element darstellt (106).

Zusatz von 1 µg/ml Mycophenolsäure können MPA-resistente und -sensitive Klone anhand ihrer Koloniegröße sehr gut unterschieden werden. Nur MPA-resistente Klone, die unter beiden Bedingungen Kolonien gleichmäßiger Größe bildeten wurden weiter verwendet und auf die Integration des *MPA^R*-Markers ins Genom untersucht. Dies erfolgte mittels PCR mit den Primern PCR8CF (*MLT1*-spezifisch) und IDH8R (*MPA^R*-spezifisch) (Abb. 16 a). Klone, die bei dieser Primer-Kombination eine Bande mit einer erwarteten Größe von 1,7 kb zeigten wurden im Southernblot näher untersucht. Bei vier von fünf PCR-positiven Transformanten ließ sich so die korrekte Insertion des *MPA^R*-Markers in eines der beiden wildtypischen *caMLT1*-Allele nachweisen, wobei die Bandengröße im Southernblot von ca. 2,4 kb auf die erwartete Bandengröße von ca. 4,3 kb wechselte (bedingt durch den Wegfall einer *EcoRI*-Schnittstelle im *caMLT1*-Allel nach *MPA^R*-Insertion). Diese, beim Wildtyp nicht detektierbare 4,3-kb-Bande hybridisierte auch mit einer *caIMH3*-(*MPA^R*)-spezifischen Sonde, was die gezielte *MPA^R*-Integration in ein *caMLT1*-Allel bestätigte (Abbildung 16 b).

2.6.3 Herstellung von *camlt1*-Deletionsmutanten mittels *MPA^R*-Blaster im wildtypischen Stamm SC5314

Die Selektionierbarkeit positiver Transformanten, die den *MPA^R*-Marker spezifisch als Einzelkopie ins Genom integriert hatten, zeigte, dass eine Nutzung des dominanten Selektionsmarkers *MPA^R* zur Gen-Mutagenese in klinischen Isolaten generell möglich war. Die Diploidität von *C. albicans* verlangt allerdings die Inaktivierung zweier Allele zur Herstellung einer vollständigen Gendeletions-Nullmutante. Der Versuch eine zweite Kopie des *MPA^R*-Gens ins Genom der *C. albicans*-SS-Klone zu integrieren schlug an der mangelnden Selektionierbarkeit möglicher Transformanten fehl. Zur Konstruktion homozygoter Mutanten musste also der *MPA^R*-Marker nach der ersten Transformationsrunde zunächst wieder deletiert werden, bevor das zweite Allel ausgeschaltet werden konnte. Hierfür wurde auf das Prinzip der *URA3*-Blaster-Strategie zurückgegriffen und der „*MPA^R*-Blaster“ entwickelt. Zwischen den *S. typhimurium hisG*-Wiederholungen und den angrenzenden *caMLT1*-Sequenzen der Mutagenesekassette wurde dabei anstelle von *caURA3* das *MPA^R*-Gen kloniert. Wie in Abb. 17 schematisch dargestellt, wurden beide *caMLT1*-Allele des wildtypischen Stamms SC5314 mit zwei unterschiedlich klonierten *MPA^R*-Mutagenesekassetten inaktiviert. Die Herstellung der *MLT1*-*MPA^R*-Blaster-Kassetten ist in Kapitel IV 7.4.5 näher beschrieben. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Wachstum auf Agarplatten mit 10 µg/ml MPA mit anschließenden Kontrollausstrichen auf 1 µg/ml MPA (siehe auch Kapitel IV 7.5.3.3).

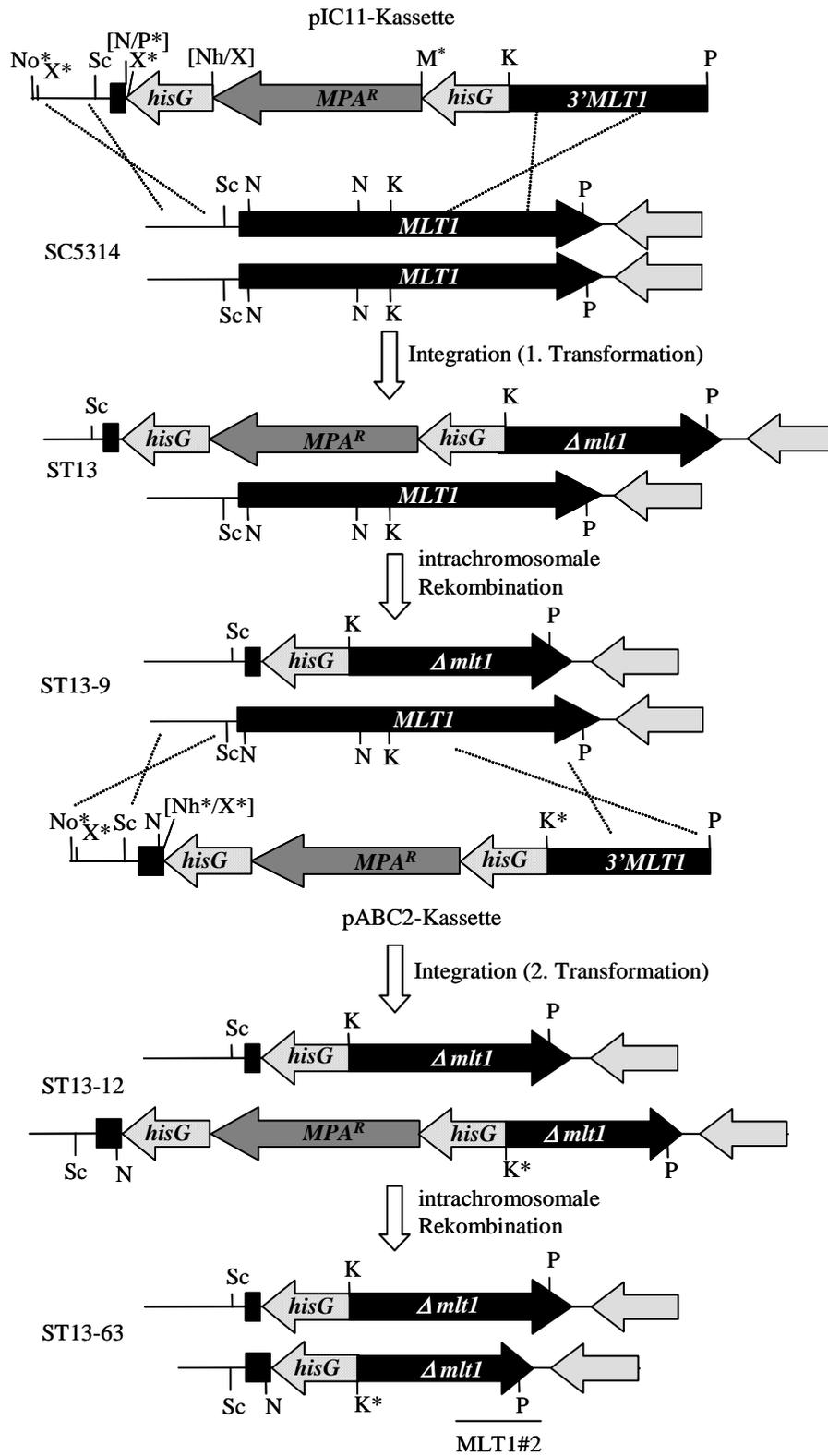


Abbildung 17: **Mutagenese des Gens *caMLT1* im Stamm SC5314 mittels Integration des dominanten Selektionsmarkers *MPA^R*.** (a) Schematische Darstellung der Mutagenese beider *caMLT1*-Allele unter Verwendung zwei unterschiedlicher Mutagenesekassetten (pIC11- und pABC2-Kassette). Angegeben sind die für die Konstruktion relevanten Schnittstellen, wobei mit * markierte Schnittstellen Primer oder Vektor generiert sind: K (*KpnI*), Sc (*ScaI*), M (*MluI*), N (*NsiI*), Nh (*NheI*), No (*NotI*), P (*PstI*), X (*XbaI*). In die Grafik wurden links die Stammbezeichnungen eingefügt und die Position der in den Southern- und Northernblothybridisierungen (Abb. 19) eingesetzten Sonde MLT1#2 unten eingezeichnet. Die graue Pfeilfläche stellt ein angrenzendes ORF dar.

Nach Inaktivierung des ersten *caMLT1*-Allels musste der Selektionsmarker wieder aus dem Genom des für das *caMLT1*-Gen heterozygoten Stamms ST13 entfernt werden um Doppelnulmutanten generieren zu können. *MPA*-sensitive Zellen, die den Marker durch intrachromosomale Rekombination der *hisG*-Wiederholungen aus ihrem Genom spontan wieder verloren hatten, konnten auf SD-Platten mit geringer *MPA*-Konzentration (1 µg/ml) von den ansonsten *MPA^R*-positiven Klonen unterschieden werden: Zwischen den großen, *MPA*-resistenten Kolonien konnten die wenigen, langsamer wachsenden und deshalb kleineren, *MPA*-sensitiven Klone gut detektiert werden (Abb. 18).

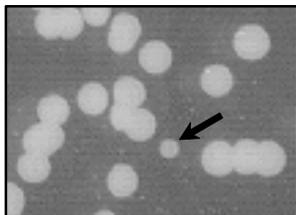


Abbildung 18: **Selektion *MPA*-sensitiver *camlt1*-Mutanten.** Bei geringer *MPA*-Konzentration ist eine Differenzierung *MPA*-sensitiver (kleine Kolonie im Bild) und *MPA*-resistenter Zellen anhand der gebildeten Koloniegröße möglich.

Die so gewonnene *MPA*-sensitive und für *caMLT1* heterozygote Mutante ST13-9 wurde in einer zweiten Gendelektionsrunde mit der pABC2-Mutagenesekassette transformiert, was zur Konstruktion der homozygoten Mutanten ST13-12 (*MPA*-resistent) und ST13-63 (*MPA*-sensitiv) führte. Die Verwendung unterschiedlicher Mutagenesekassetten für die Herstellung heterozygoter und homozygoter Mutanten ermöglichte die Identifikation und den Ausschluss homozygoter Mutanten, die durch mitotisches *Crossover* oder durch Chromosomenverlust bzw. Chromosomenverdopplung entstanden waren. So konnten die erwarteten Unterschiede in den Restriktionsfragmentlängen der inaktivierten *caMLT1*-Allele mittels Southernblothybridisierungen detektiert werden.

Abbildung 19 a zeigt ein Beispiel *ScaI*-verdauter chromosomaler DNAs, hybridisiert mit einer *caMLT1*-spezifischen und einer *caIMH3/MPA^R*-spezifischen DNA-Sonde. Northernblothybridisierungen isolierter RNAs ergaben bei den *camlt1/camlt1*-Mutanten ST13-12 und ST13-63

keine spezifische *caMLT1*-Transkriptbande mehr (Abb. 19 b, mRNA). Die beiden Blots zeigen weiterhin die Komplementation der *camlt1*-Nullmutante ST13-63 durch genomische Reintegration eines wildtypischen *caMLT1*-Allels. Auf die Konstruktion der Komplementantenstämme ST13-K1 und ST13-K2 wird in Kapitel V 2.7.3 näher eingegangen.

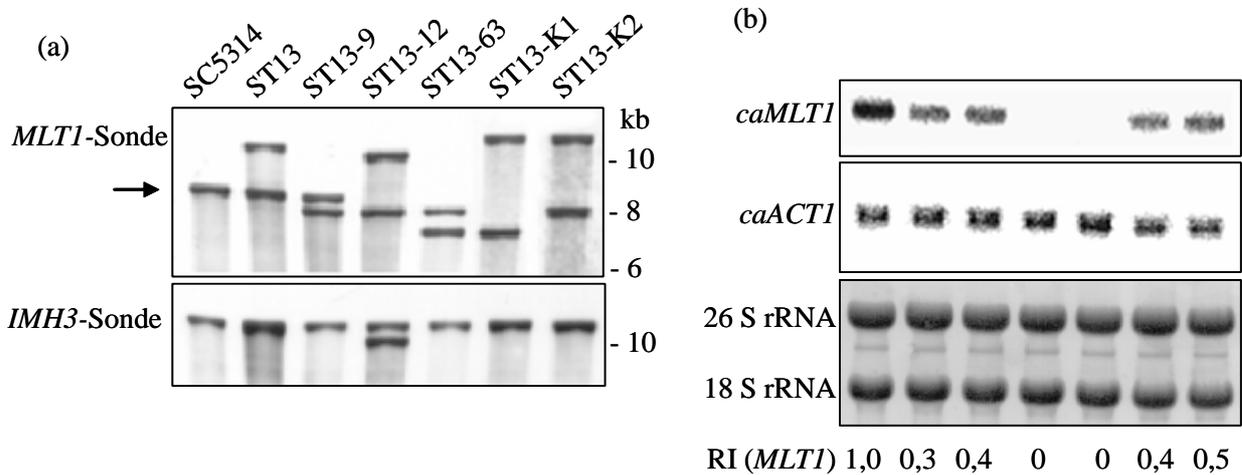


Abbildung 19: **Blotanalysen der konstruierten SC5314-Mutanten und Komplementanten.** (a) Southernblots: Die *ScaI*-verdauten DNAs wurden mit der *caMLT1*-spezifischen Sonde MLT1#2 sowie mit der *caIMH3/MPA^R*-spezifischen Sonde IMH3#2 hybridisiert. Die wildtypische *MLT1/MLT1*-Bande ist mit einem Pfeil markiert, wobei eine *ScaI*-Erkennungssequenz in der *caMLT1*-Promotorregion liegt (siehe auch Abb. 17) und eine weitere etwa 8,5 kb in 3'-Richtung. (b) Northernblots: Die Gesamt-RNAs wurden nach 16 h Wachstum in YPD-Medium isoliert. Die Hybridisierungen erfolgten mit der Sonde MLT1#2 sowie mit der Aktin-spezifischen Sonde ACT#1. Die *caMLT1*-mRNA-Expressionsmengen sind durch Berechnung der relativen Bandenintensitäten (RI (*MLT1*)) ebenfalls angegeben. Die RIs wurden mittels Aktin-Kontrollen standardisiert und auf die *caMLT1*-Expressionsmenge im SC5314-Stamm normalisiert. Stammcharakterisierungen: SC5314 (*MLT1/MLT1*), ST13 (Δ *mlt1::hisG-MPA^R-hisG/MLT1*), ST13-9 (Δ *mlt1::hisG/MLT1*), ST13-12 (Δ *mlt1::hisG/\Delta**mlt1::hisG-MPA^R-hisG*), ST13-63 (Δ *mlt1::hisG/\Delta**mlt1::hisG*), ST13-K1 (*MLT1::MPA^R/\Delta**mlt1::hisG*), ST13-K2 (*\Delta**mlt1::hisG/MLT1::MPA^R*)

Die *MPA^R*-Blaster-Technik ermöglichte so die Generierung von *camlt1*-Nullmutanten und *camlt1*-Revertanten, deren Genotyp ansonsten isogen zum prototrophen Wildstamm SC5314 ist.

2.6.4 Phänotypische Charakterisierung der *camlt1*-Mutanten im Stamm SC5314 *in vitro*

Ebenso wie die im Stamm CAI4 konstruierten *camlt1*-Mutanten wurden auch die mittels *MPA^R*-Blaster im Wildtyp SC5314 hergestellten Mutanten zunächst *in vitro* phänotypisch charakterisiert. Auch hier ließen sich im Vergleich zum Elternstamm SC5314 weder morphologische Veränderungen mikroskopisch feststellen, noch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten im YPD- oder SD-Medium detektieren (Plattenausstriche und Messungen der OD_{600 nm} bei Wachstum in Flüssigmedium). Die *camlt1*-Nullmutante ST13-63 verhielt sich auch bei Wachstum bei 37°C in

den Medien RPMI 1640, Lee's pH 6,8, Spider und 10 % Serum wildtypisch und bildete Keimschläuche sowie Hyphen aus. Mikroskopische Messungen nach Wachstum in 10%igem Serum ergaben beim Stamm SC5314 eine durchschnittliche Keimschlauchlänge von 8,7 +/- 2,2 μm (nach 45 min Inkubation) und 24,2 +/- 11,7 μm (nach 2 h Inkubation), beim Stamm ST13-63 entsprechend 7,9 +/- 3,3 μm und 24,1 +/- 12,7 μm .

Sensitivitätstests

Die Inaktivierung des caMlt1-Transporters im Stamm C10-11 hatte in den zuvor verwendeten Testsystemen (Plattenausstrich sowie Mikroverdünnungsreihe; siehe Kapitel V 2.5.1) zu keiner ersichtlichen Veränderung im Wachstumsverhalten gegenüber inhibitorischen Konzentrationen an Cadmiumionen geführt. Eine mögliche Hypersensitivität der *camlt1*-Nullmutanten gegenüber Substraten des Ycf1-Transporters von *S. cerevisiae* könnte aber das caMlt1-Protein als mögliches funktionales Ortholog von scYcf1p identifizieren. Aus diesem Grund wurde überprüft, inwieweit die Deletion des caMlt1-Transporters im Stamm ST13-63 die Sensitivität gegenüber CdCl_2 und gegenüber CDNB (ein weiteres zytotoxisches Substrat des scYcf1-Transporters das die Transkription von *caMLT1* induziert, siehe Kapitel V 2.4.1) beeinflusst. Um das Wachstumsverhalten besser analysieren zu können wurden die Stämme SC5314 und ST13-63 diesmal in Makroverdünnungsreihen eingesetzt und die $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 20). Inhibitorische Konzentrationen an CdCl_2 resultierten bei beiden Stämmen in einem langsameren, linearen Wachstum (Abb. 20 a und b) mit gleicher prozentualer Abnahme der optischen Dichte nach 26 h Inkubation (SC5314: 46, 66 und 79 % und ST13-63: 51, 70 und 80 % bei 100, 200 und 400 μM CdCl_2). Steigende Konzentrationen an CDNB führten ebenfalls zu einem verlangsamten Wachstum beider Stämme, wobei der sigmoide Kurvenverlauf nach einer verlängerten lag-Phase erhalten blieb (Abb. 20 c und d). Beide Stämme zeigten auch hier einen vergleichbaren Wachstumsphänotyp mit einer prozentualen Abnahme der optischen Dichte nach 24 h bei SC5314-Zellen von 7, 17, 20 und 99 % und bei ST13-63-Zellen von 2, 16, 39 und 99 % bei 20, 40, 80 und 160 μM CDNB. Eine leichte Wachstumsverzögerung könnte sich bei 80 μM CDNB-Zugabe bei St13-63-Zellen bemerkbar machen; allerdings hob sich diese Verzögerung bei einer längeren Messdauer (bis 48 h) wieder auf (Daten hier nicht dargestellt). Im Vergleich dazu beschrieben Li und Mitarbeiter (160) für die *S. cerevisiae* *ycf1*-Mutante DTY167 bereits bei Zugabe von 40 μM CDNB zum Kulturmedium eine starke Wachstumsabnahme von 65 % (beim isogenen Wildtypstamm DTY165 von 14 %).

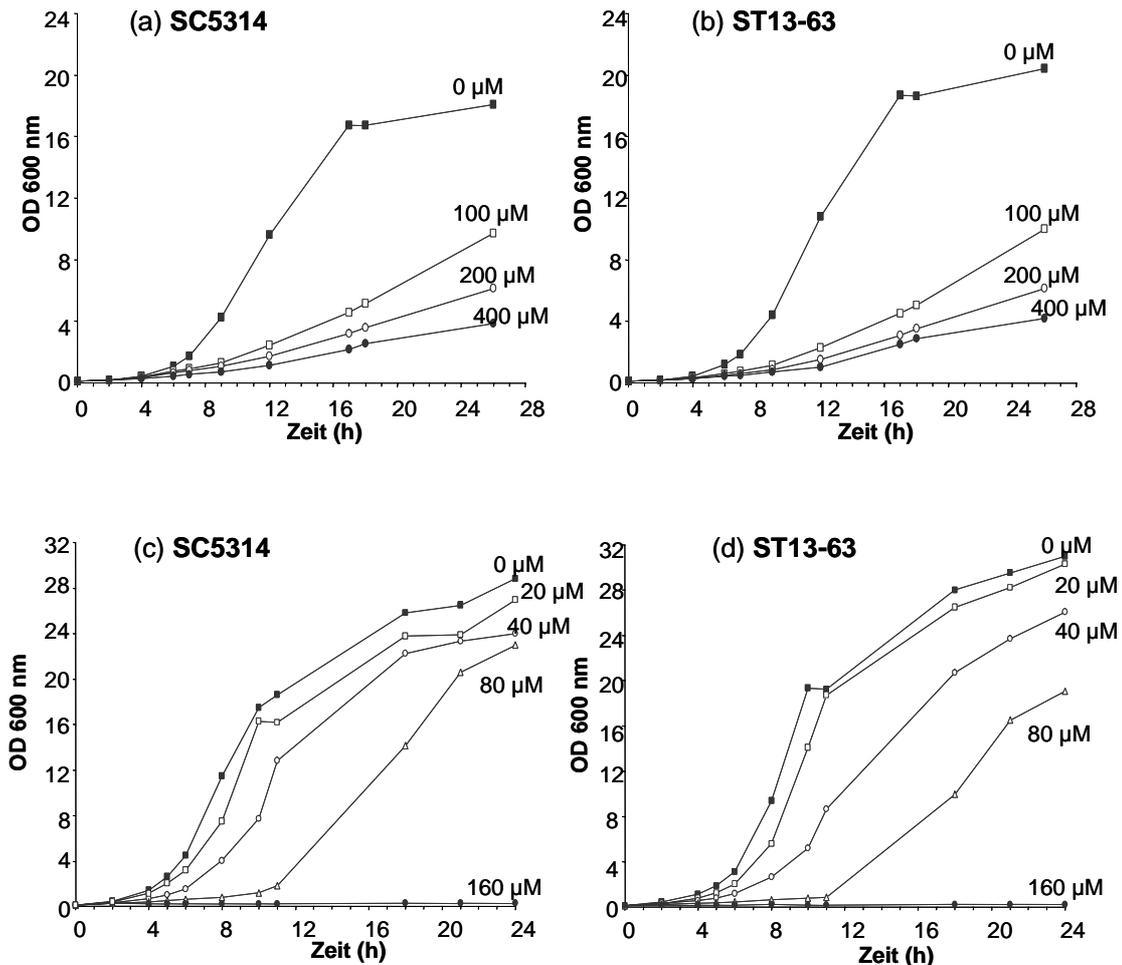


Abbildung 20: Sensitivitätstests der Stämme ST13-63 (*camt1*-Nullmutante) und SC5314 (isogener Wildtyp) gegenüber inhibitorischen Konzentrationen an CdCl₂ und CDNB. Die Zellen wurden bei 30°C über Nacht in YPD-Medium angezogen und im entsprechenden Versuchsmedium (SD-Medium bzw. YPD-Medium) auf eine OD_{600 nm} von 0,1 eingestellt. Nach Zugabe von 0, 100, 200 und 400 µM CdCl₂ bzw. von 0, 20, 40, 80 und 160 µM CDNB zum Kulturmedium erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation die Messung der Zelldichte bei OD_{600 nm}.

Monochlorobiman

Die nicht fluoreszente, membrangängige Verbindung Monochlorobiman ist ein weiteres Substrat für die Konjugation an Glutathion-SH durch zytosolische Glutathion-S-Transferasen, wobei eine membranimpermeable Monochlorobiman-GS-Verbindung entsteht. In *S. cerevisiae*-Zellen wird dieses fluoreszente S-Konjugat durch die GS-X-Pumpe Ycf1p in die Vakuole transportiert und dort gespeichert. So zeigt die *S. cerevisiae* *ycf1*-Mutante DTY167 in der Vakuole eine starke Reduktion der Fluoreszenz nach Inkubation mit Monochlorobiman (160). Nach Wachstum der *C. albicans* Stämme SC5314 und ST13-63 unter Anwesenheit von Monochlorobiman im Kulturmedium konnte im Fluoreszenz-Lasermikroskop ebenfalls die Aufnahme des fluoreszenten Monochlorobiman-GS-Konjugats in die Zellvakuole beobachtet werden. Allerdings konnte kein Unterschied in der

Fluoreszenzintensität detektiert werden. Wie Abb. 21 zeigt, zentriert sich bereits nach 2 h Inkubation innerhalb der Zellen beider Stämme eine intensive Fluoreszenz im Bereich der Vakuolen. Nach 6 und 16 h Inkubation zeigte sich ein ähnliches Bild (hier nicht dargestellt).

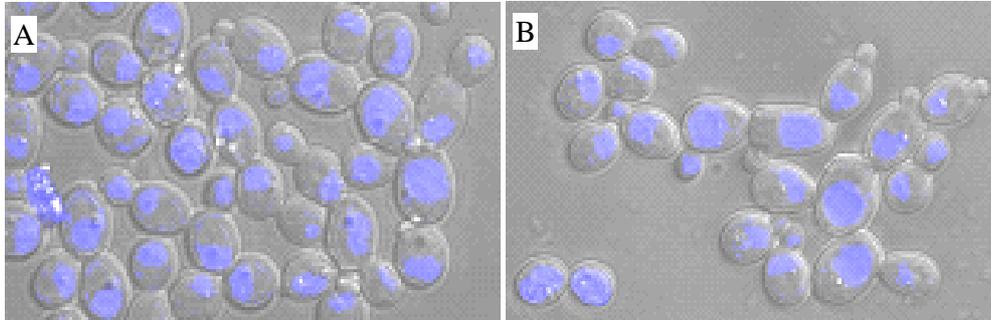


Abbildung 21: **Mikroskopische Aufnahmen von ST13-63 (A) und SC5314 (B) nach Inkubation mit Monochlorobiman.** Zellen einer YPD-Vorkultur wurden in frisches YPD-Medium mit 100 μ M Monochlorobiman überführt. Nach Inkubation bei 30°C für 2 h wurde je ein Aliquot entnommen, gewaschen und unter dem Lasermikroskop betrachtet. Vakuolen konnten mittels DIC-Darstellung sichtbar gemacht werden. Laser-Aufnahmeparameter wurden für Monochlorobiman entsprechend eingestellt. Darstellungen (A) und (B) zeigen die Überlagerung der Fluoreszenz- und DIC-Aufnahmen zur Darstellung der Co-Lokalisation.

2.7 *In vivo* Analyse der *camlt1*-Mutation im Mausmodell

Obwohl die *camlt1*-Nullmutanten keinen offensichtlichen Phänotyp *in vitro* zeigten, blieb dennoch zu untersuchen, ob möglicherweise das Virulenzverhalten *in vivo* durch die Mutagenese des ABC-Transporters beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden die zum Stamm SC5314 isogenen *camlt1*-Deletionsmutanten im experimentellen Tiermodell eingesetzt.

Zur Bestimmung der Virulenz der *C.-albicans*-Stämme wurden zwei Infektionswege mit dissimulierendem Verlauf gewählt: Bei intravenöser (i. v.) Infektion gelangen die Erreger direkt in den Blutkreislauf, wo sie sich systemisch über den ganzen Organismus ausbreiten und die Organe besiedeln können. Hierbei charakterisieren die gemessenen Keimzahlen in den Organen die Virulenz eines Pilzstammes. Bei intraperitonealer (i. p.) Infektion adhärieren die Pilzzellen an die parenchymalen Organe, wie z. B. Leber, Milz und Pankreas, invadieren diese und gelangen erst im weiteren Verlauf der Infektion in den Blutkreislauf. Über letzteren können die Erreger dann zu weiteren Organen, wie z. B. Gehirn und Nieren, vordringen. Bei diesem murinen Peritonitismodell kann der entstandene Schaden an Leber (und Pankreas) in direkten Bezug mit der Virulenz des eingesetzten *C.-albicans*-Stammes gebracht werden. Als Maß für die Invasion der Pilzzellen in die Leber dient dabei die ins Blut freigesetzte Alanin-Aminotransferase-(ALT)-Aktivität (144, 146). ALT ist ein lösliches Enzym, das im Zytoplasma von Hepatozyten lokalisiert ist und dessen

Aktivität bei Schädigung der zytoplasmatischen Membran im Blutplasma detektiert und gemessen werden kann.

2.7.1 Intravenöse Infektion

Jeweils 11 Balb/c-Mäuse wurden sublethal mit Zellen der *camlt1*-Nullmutante ST13-63 und des dazu isogenen Wildtyps SC5314 i. v. infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Infektionsverlaufs bzw. aus verschiedenen Organen der Tiere wurden Pilzzellen reisoliert und die Anzahl koloniebildender Einheiten (*colony forming units*, CFU) bestimmt. Um das Ausmaß des

(a)

Stamm	Tag p. i.	CFU/Organ				
		Leber	Milz	Nierenpool	Hirn	Herz
SC5314	1	2000	500	11600	950	60
ST13-63	1	910	510	20400	420	20
SC5314	2	1250	250	84000	<50	<50
ST13-63	2	400	<50	2150	<50	<50

(b)

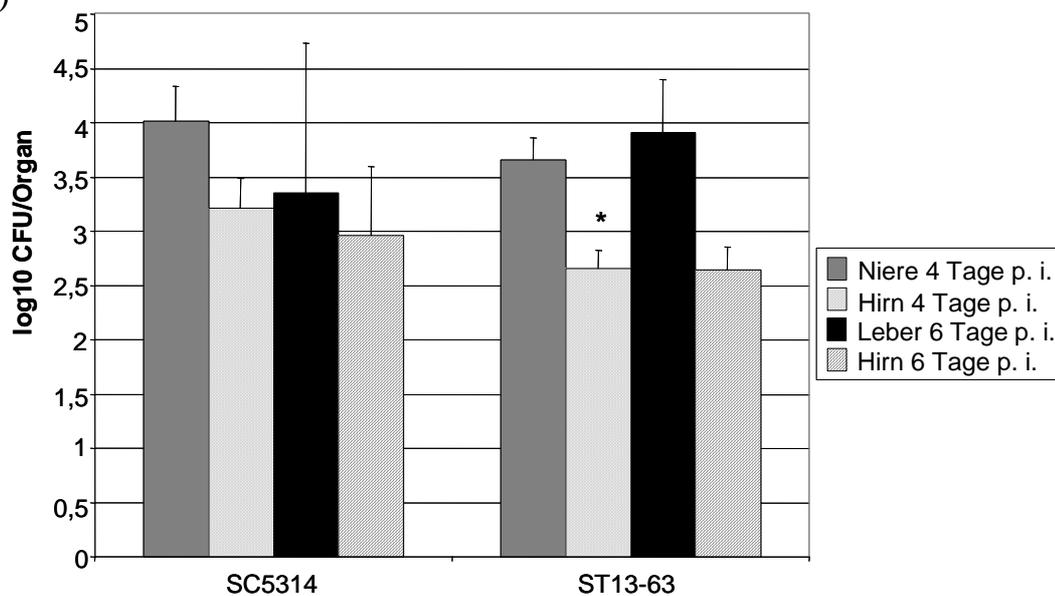


Abbildung 22: **Bestimmung der Keimzahlen bei sublethaler i. v. Infektion.** Gruppen von BALB/c Mäusen wurden i. v. mit je 2×10^5 Zellen der Stämme SC5314 und ST13-63 infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden nach Entnahme, Homogenisieren und Ausplattieren der angegebenen Organe die CFU bestimmt. In (a) sind die CFU/Organ nach ein und zwei Tagen p. i. tabellarisch dargestellt, in (b) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der \log_{10} CFU/Organ nach vier und 6 Tagen p. i. grafisch dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede im Organbefall des Wildtyps SC5314 und der *camlt1*-Nullmutanten ST13-63 am vierten und sechsten Tag des Krankheitsverlaufs wurde mittels Students t-test kalkuliert (einseitiger Test; zwei Stichproben, gleiche Varianz (homoskedastisch)). Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) wurden dabei mit einem roten Stern markiert: Tag 4 p. i.: Nierenpool $p = 0,055$, Gehirn $p = 0,007$, Tag 6 p. i.: Leber $p = 0,211$, Gehirn $p = 0,185$.

Organbefalls durch beide Stämme erfassen zu können wurden an Tag 1 nach Infektion (*post infection*, p. i.) und Tag 2 p. i. je ein Tier getötet und die CFU-Werte bestimmt (Abb. 22 a). Dabei wurden die Organe Leber, Milz, Nieren, Gehirn und Herz getrennt behandelt. Die Daten deuteten an, dass das Ausmaß der Infektion bei den beiden eingesetzten *C.-albicans*-Stämmen vergleichbar ist. Auch die Untersuchung von Gehirn und Nieren bzw. Gehirn und Leber nach vier- und sechstägigem Krankheitsverlauf zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Pilzbesiedlung (Abb. 22 b). Ausnahme war lediglich der Pilzbefall des Gehirns am vierten Tag des Krankheitsverlaufs, wo sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) abzuzeichnen schien. Dem jedoch widersprach der CFU-Befund am Tag 6 p. i. (ebenso wie an den Tagen 1 und 2 p. i.), der keinen signifikanten Unterschied in den CFU-Werten im Gehirn des Wildtyps und der *camlt1*-Nullmutanten aufzeigte.

2.7.2 Intraperitoneale Infektion

Während sich bei i. v. Infektion von BALB/c-Mäusen keine deutlichen Unterschiede im Organbefall finden ließen, hatte der Verlust des *caMLT1*-Gens bei i. p. Infektion einen starken Einfluss auf das Krankheitsbild. Im Versuchsansatz wurden Gruppen von BALB/c-Mäusen mit den heterozygoten Mutantenstämmen ST13 und ST13-9, der homozygoten Mutante ST13-63 sowie dem Wildtyp SC5314 sublethal i. p. infiziert. Die durch Zerstörung der Leberzellen freigesetzte Aktivität des ALT-Enzyms wurde nach einem Krankheitsverlauf von 24 Stunden im Blutplasma der Versuchstiere gemessen. Im Vergleich zum hoch virulenten Wildtypstamm SC5314 war die gemessene durchschnittliche ALT-Aktivität im Blut der Mäuse, die mit den heterozygoten Mutanten beimpft worden waren, signifikant reduziert ($p < 0,0001$). Noch weniger ALT-Aktivität wurde nach Infektion der Mäuse mit Zellen der *camlt1*-Nullmutante ST13-63 gemessen (Abb. 23 a). Diese Daten deuten darauf hin, dass es durch den Verlust des *caMLT1*-Gens zu einer wesentlich geringeren Schädigung der Leberzellen kommt. Dieses Ergebnis ließ sich auch durch histopathologische Untersuchungen bestätigen. In Abb. 23 b zeigen die Bilder A und B Leberschnitte, die repräsentativ für sechs Versuchstiere, das typische Verhalten der Stämme SC5314 und ST13-63 nach 24 h p. i. widerspiegeln: Während die Keimschlauch-bildenden Zellen des Stamms SC5314 unter Zerstörung von Hepatozyten (pyknotische Leberzellkerne) tief in die Leber eindringen, zeigt sich der Stamm ST13-63 kaum invasiv. Die Zellen des *caMlt1p*-negativen Stammes verbleiben an der Leberoberfläche und zeigen nur eine punktuelle, geringgradige Invasion. Das gleiche Bild zeigte sich auch an Schnitten des Pankreas (hier nicht dargestellt).

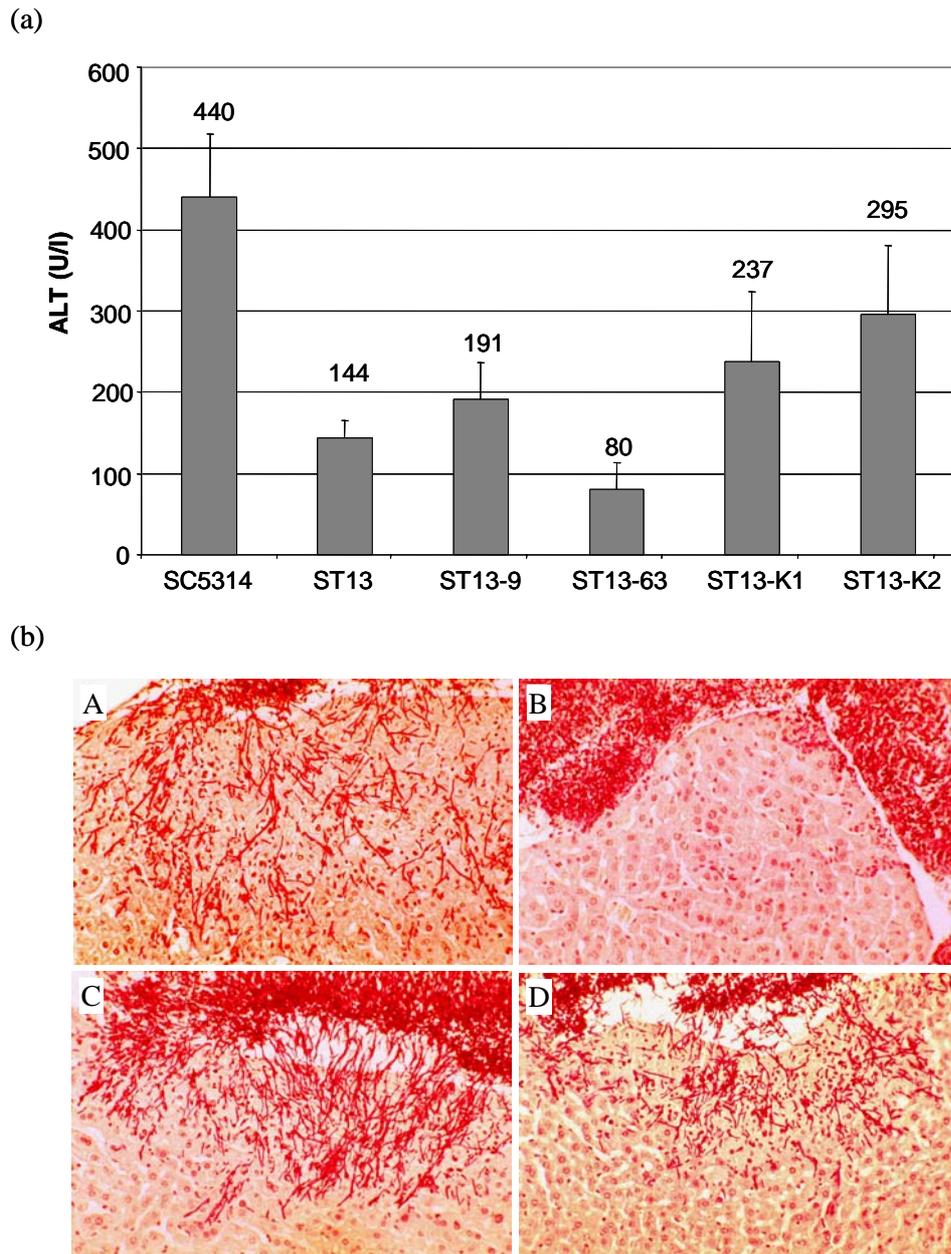


Abbildung 23: **Effekt der *camlt1*-Deletion auf die Virulenz im murinen Peritonitismodell.** (a) 24 h nach Infektion von Mäusen mit den Stämmen SC5314, ST13, ST13-9 und ST13-63 wurden die ALT-Aktivitäten im Blutplasma gemessen. Grafisch dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der ALT-Aktivitäten gemessen bei 4 (ST13), 6 (SC5314, ST13-9 und ST13-K2), 7 (ST13-K1) und 9 Mäusen (ST13-63). Die Stämme ST13-K1 und ST13-K2 sind Komplementanten des Stammes ST13-63 (siehe Kapitel V 2.7.3). (b) Histopathologische Untersuchungen 24 h nach i. p. Infektion mit den Stämmen SC5314 [A], ST13-63 [B] sowie den beiden Komplementantenstämmen ST13-K1 [C] und ST13-K2 [D]. Die Bilder zeigen Schnitte an der Organoberfläche der Leber. Die Sektionen wurden mit PAS Reaktion behandelt und mit Mayer's Hemalum Lösung gegengefärbt. Die gemessenen Enzymaktivitäten bei diesen Mäusen betragen für ALT: 397 U/l [A], 77 U/l [B], 255 U/l [C] und 282 U/l [D]. Die Bilder wurden mit 160-facher Vergrößerung aufgenommen.

Diese stark reduzierte Invasivität des Stammes ST13-63 kann nicht auf eine mangelnde Fähigkeit zur *in vivo* Keimschlauchbildung zurückgeführt werden, da in den histologischen Sektionen Keimschläuche leicht aufzufinden waren (persönliche Information von M. Kretschmar). Die Abbildung zeigt zusätzlich die Stämme ST13-K1 und ST13-K2, die als *caMLT1*-positive Revertanten in die Tieranalysen mit einbezogen wurden (siehe Kapitel V 2.7.3). Die beiden Stämme tragen eine funktionale *caMLT1*-Genkopie im jeweils anderen Allellokus.

2.7.3 Komplementation des *caMlt1p*-negativen Phänotyps des Stammes ST13-63 nach intraperitonealer Infektion

Der beste Beweis, dass ein bestimmter Phänotyp auf den Verlust eines bestimmten Gens zurückzuführen ist, lässt sich erbringen durch Komplementation des Mutantenphänotyps mittels Reintegration einer intakten Genkopie. Nachdem sich die im *caMLT1*-Gen mutierten *C. albicans*-Stämme im murinen Peritonitismodell stark attenuiert zeigten und das Lebergewebe nicht mehr invadieren konnten, sollte die *camlt1*-Nullmutation im Stamm ST13-63 komplementiert werden. ST13-63-Zellen wurden hierfür mit einer Genkassette transformiert, die neben einer funktionalen *caMLT1*-Genkopie auch den *MPA^R*-Marker zur Selektion enthielt (schematische Darstellung in Abb. 24). Die Konstruktion der transformierten Genkassette wurde in Kapitel IV 7.4.6 dargelegt. Wie bereits beschrieben und in Abb. 19 gut erkennbar, konnten die beiden *camlt1*-Allele im Southernblot anhand ihrer unterschiedlichen Restriktionsfragmentgrößen voneinander unterschieden werden. So war es möglich nach erfolgter Transformation zwei *C. albicans* Klone zu isolieren, ST13-K1 und ST13-K2, die die intakte *caMLT1*-Kopie an der jeweils anderen Allelposition integriert hatten. Das Expressionsniveau der *caMLT1*-mRNA dieser beiden Transformanten erwies sich als vergleichbar mit dem der heterozygoten *camlt1/caMLT1*-Mutantenstämme ST13 und ST13-9 (Abb. 19, mRNA).

Beide Revertanten, ST13-K1 und ST13-K2, wurden im murinen Peritonitismodell eingesetzt. Vierundzwanzig Stunden nach erfolgter i. p. Infektion wurden die ALT-Werte im Blutplasma der Versuchstiere gemessen. Wie in Abb. 23 a dargestellt zeigte sich eine signifikante Steigerung der ALT-Aktivitäten bei beiden *caMLT1*-komplementierten Stämmen im Vergleich zur Nullmutante ST13-63. Auch konnte der wildtypische Phänotyp – nach i. p. Infektion die Leber zu invadieren – wieder weitgehend hergestellt werden (Abb. 23 b, Bild C und D).

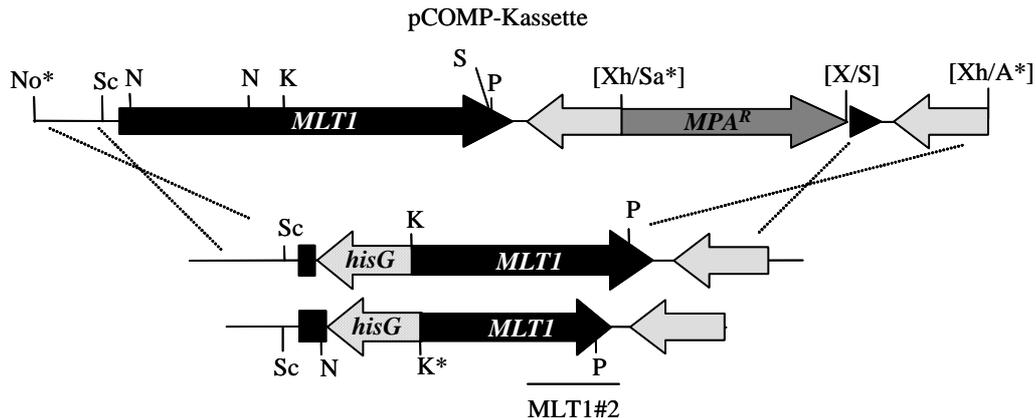


Abbildung 24: **Genomische Reintegration einer funktionalen *caMLT1*-Genkopie in den Stamm ST13-63.** Schematische Darstellung der pCOMP-Komplementationskassette und Integration in eines der beiden mutierten *camlt1*-Allele. Abgebildet ist die Entstehung von Stamm ST13-K1 (*MLT1::MPA^R/Δmlt1::hisG*). In Stamm ST13-K2 rekombinierte das Komplementationskonstrukt mit dem anderen *camlt1*-Allel. Angegeben sind die für die Konstruktion relevanten Schnittstellen, wobei mit * markierte Schnittstellen Primer oder Vektor generiert sind: A (*Apa*I), K (*Kpn*I), N (*Nsi*I), No (*Not*I), P (*Pst*I), S (*Spe*I), Sa (*Sal*I), Sc (*Sca*I), X (*Xba*I), Xh (*Xho*I). MLT1#2 stellt den Fragmentabschnitt dar, der in den Southern- und Northernblot hybridisierungen (siehe Abb. 19) als Sonde eingesetzt wurde. Die graue Pfeilfläche stellt ein angrenzendes ORF dar.

2.7.4 Gallensäure-Toleranztest

Neben wichtigen Aufgaben im Stoffwechsel ist die Leber verantwortlich für die Produktion von Galle (ca. 0,7 l/Tag), die in den Leberzellen gebildet und aktiv in die Gallenkanälchen sezerniert wird. Eine einfache und denkbare Erklärung für das Unvermögen der *camlt1*-Nullmutante die Leber zu invadieren, könnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem hoch reaktiven Lebersekret Galle sein, verursacht durch den Verlust des vakuolären ATP-Transporters caMlt1p. Ein Transport z. B. von Gallensalzen (polare Derivate von Cholesterin) oder potentiell toxischer, tetrapyrrolier Abbauprodukte von Chlorophyll oder Häm (z. B. Billirubin) über ATP-abhängige Transportsysteme konnte schon in Pflanzenvakuolen (120, 123) und in Hefen (205, 206) beobachtet werden.

In Mikroverdünnungsreihen wurde die Sensitivität der Stämme ST13-63 und SC5314 gegenüber Galle sowie dem Gallensalz Deoxycholat getestet. Beide Stämme wiesen eine hohe Resistenz gegenüber Galle auf (Tab.11), wobei die Empfindlichkeit der *camlt1*-Nullmutante gegenüber Galle und dem Gallensalz Deoxycholat dem des Wildtyps entsprach.

Tabelle 11: Toleranz der Stämme SC5314 und ST13-63 gegenüber Lebersekret.

Substanz	MHKI Galle		MHKI Deoxycholat
	SD	SD + 0,5 M NaCl	SD
nach 24 h	20 %	10 %	0,059 %
nach 48 h	> 20 %	15 %	0,235 %

¹ Die Bestimmung der MHK von Galle und Deoxycholat in % für die Stämme SC5314 und ST13-63 wurde in Mikroverdünnungsreihen ermittelt (siehe auch Kapitel IV 6.4.2). Die Ablesung erfolgte visuell nach 24 h und 48 h Inkubation mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen. Die Empfindlichkeit der Pilzzellen gegenüber Galle konnte durch NaCl-Zugabe zum Medium erhöht werden (Erhöhung der Osmolarität), wodurch das Ablesen der Sensitivität im verwendeten und pipettierbaren Konzentrationsbereich besser möglich war.

3. Charakterisierung der Phospholipase caPlb5p

Die Sequenzbestimmung eines 10 kb umfassenden *PstI-PstI*-Fragment aus einer genomischen Lambda FixII Genbank (siehe *Vorausgegangene Forschungsarbeiten*) hatte neben der nahezu ganzen kodierenden Region des *caMLT1*-Gens am gegenüberliegenden Fragmentende Teile eines weiteren ORFs aufgezeigt, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeiten zu Typ B Phospholipasen aus Pilzen zeigte. Die Isolierung und Sequenzierung des Fosmidklons 9D6 (isoliert mittels Kolonieblot aus einer genomischen *C.-albicans*-DNA Fosmidgenbank, siehe Kapitel V 1.1) ermöglichte die weitere Sequenzbestimmung dieses Phospholipase-B-Gens (*caPLB5*) sowie dessen angrenzende Bereiche. So konnte aus isolierter genomischer *C. albicans* DNA mit dem Primerpaar AMPLI1 und AMPLI3 ein 3,66 kb großes Fragment, das die *caPLB5* kodierende Region (2265 bp) sowie 1,1 kb der 5'-flankierenden Region und 0,4 kb der 3'-flankierenden Region umfasst, amplifiziert, kloniert und sequenziert werden.

3.1 Analyse der *caPLB5*-Sequenzdaten

3.1.1 Identifizierung von Allel-Sequenzdifferenzen

Direktsequenzierungen der [AMPLI1-AMPLI3]-Amplifikate der *caPLB5*-Genregion hatten bei den Stämmen CAI4 und ATCC44808 an einzelnen Basenpaarpositionen Variationen in der Genkodierenden Region aufgezeigt. Eine genauere Differenzierung dieser Variationen konnte durch PCR-Amplifikation und Sequenzierung des jeweils intakten *caPLB5*-Allels von heterozygoten *caplb5/caPLB5*-Mutanten beider Stämme (PK3, PG9 und KH44, siehe Kapitel V 3.3) erfolgen. Es zeigte sich, dass in CAI4 und ATCC44808 zwei unterschiedliche *caPLB5*-Allele existieren, die sich abgesehen von wenigen stillen Nukleotidaustauschen vor allem in zwei Positionen ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. So führt an Position 57 eine C/T-Transition zu einem

Austausch von Serin (S₅₇) zu Leucin (L₅₇) und eine T/G-Transversion an Position 208 zu einem Austausch von Asparagin (N₂₀₈) zu Lysin (K₂₀₈). Vergleiche mit den veröffentlichten Sequenzdaten des *C. albicans* Genomsequenzierprojekts (Assembly 6 und 19, *Stanford-Genome-Technology-Center*) zeigten, dass auch im CAI4-Ausgangsstamm, dem sequenzierten Stamm SC5314, dieselben Alleldifferenzen präsent sind. So stimmen in Contig6-2306 ORF6.4037 und in Contig6-2454 der partiale ORF6.6348 (NH₂-terminale 305 Aminosäuren) nahezu 100%ig mit der caPlb5p-Proteinsequenz überein, wobei ORF6.4037 die L/K-Variation und ORF6.6348 die S/N-Variation aufweisen. Zusätzlich beinhaltet ORF6.4037 eine Mutation an der AS-Position 709, wo durch eine G/T-Variation zum Austausch von Alanin zu Serin kommt. Die im Anhang abgebildete caPLB5-Sequenz mit umliegenden Bereichen zeigt die Sequenz des Allels S₅₇N₂₀₈ des *C.-albicans*-Stammes ATCC44808, wobei Allel-abhängige und, im Vergleich zu SC5314, Stamm-abhängige Unterschiede in der AS-Sequenz markiert sind.

Weitere Allel-Polymorphismen finden sich auch bei Vergleich der anderen Phospholipasen B Sequenzen (Assembly 19) in caPlb1p (D₅₇₇/N₅₇₇) und im N-terminalen Teil des diskontinuierlichen ORFs caPlp3p-N (ORF6.795, s. u.; S₃₄₆/L₃₄₆).

3.1.2 Charakterisierung der von caPLB5 abgeleiteten Proteinsequenz

Das ununterbrochene caPLB5-Leseraster kodiert für ein 754 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von Mr 81.373 und einem isoelektrischen Punkt von pI 4,58. Mittels 5'-RACE ließen sich zwei Startpunkte für die Transkription ermitteln, die sich an den Positionen -137 und -90 der im Anhang abgebildeten caPLB5-Nukleotidsequenz befinden. Das zu den beiden Transkriptionsstarts stromabwärts gelegene erste ATG-Codon an Position +1 wurde auch mittels FramePlot 2.3.2 als Translationsinitiator-ATG-Codon identifiziert. Weiterhin befindet sich an Position -3 ein Purinrest (Adenosin), was nach Kozak für ein Initiator-Codon spricht (142). Mittels 3'-RACE konnte 39 bp nach der Gen kodierenden Sequenz an Position +2300 eine putative Polyadenylierungsstelle bestimmt werden, wobei nur 97 bp nach dem caPLB5 TAG-Stop-Codon das offene Leseraster eines möglichen caCCR4-Gens endet.

Der 5' zu caPLB5 angrenzende Bereich umfasst rund 500 bp und wird durch das ORF-Ende eines zu scPMU5 homologen Gens begrenzt. Die Sequenzanalyse dieser putativen Promotorregion zeigte neben einigen TATA-Elementen auch insgesamt sechs 5'-GATA(A)-3' Einheiten auf, die in der caPLB5-Sequenz im Anhang markiert wurden. Die GATA-Promotormodule sind in die Nitrogen-Katabolit-Repression involviert, wobei sie meist zu mehreren angeordnet in beiden Orientierungen aktiv sein können (47).

3.1.3 caPlb5p-Homologierecherche

Homologierecherchen, die mittels GCG-Programmpaket durchgeführt wurden, zeigten, dass die von *caPLB5* abgeleitete AS-Sequenz höchste Ähnlichkeiten zu bekannten Typ B Phospholipasen verschiedener Pilze aufweist. Vergleiche, die über die ganze Sequenzlänge durchgeführt wurden, resultierten in 48 % Identität und 55 % Ähnlichkeit zu klPlb1p von *Kluyveromyces lactis* (AN: BAA28619), 47 % Identität und 53 % Ähnlichkeit zu tdPlb1p von *Torulaspora delbrueckii* (AN: Q11121) sowie 44 %, 45 % und 45 % Identität (49, 52 und 51 % Ähnlichkeit) zu scPlb1p (AN:AAA61611), scPlb2p (AN: Q03674) und scPlb3p (AN: Q08108) von *S. cerevisiae*. Mit den Sequenzen der bereits bekannten Phospholipasen B von *C. albicans*, caPlb1p (AN: AAC61890,(122, 158)) und caPlb2p (AN: BAA36162, (278)), zeigte sich caPlb5p zu 45 % (caPlb1p) und 47 % (caPlb2p) identisch mit Ähnlichkeiten von entsprechend 53 % und 55 %. Interessanterweise befinden sich in den veröffentlichten Genomsequenzdaten von *C. albicans* SC5314 (Assembly 6, *Stanford-Genome-Technology-Center*) fünf weitere zu caPlb5p ähnliche ORFs (Contig6-1609 ORF6.553, Contig6-2359 ORF6.5227, Contig6-2449 ORF6.6206, Contig6-1707 ORF6.795 und 6.796), die bislang in der Literatur nicht beschrieben wurden. ORF6.6206 weist nach BLAST-Recherche mit 52 % Identität und 70 % Ähnlichkeit die insgesamt meisten Sequenzübereinstimmungen zu caPlb5p auf und stellt vermutlich eine vierte Phospholipase B im *C. albicans* Genom dar (benannt mit caPlb4p nach dem *C. albicans* Genom Annotations Konsortium). Die partiellen ORFs 6.795 und 6.796 kodieren möglicherweise für den NH₂-terminalen (394 As) und COOH-terminalen (304 As) Teil einer fünften Phospholipase B, die aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft mit caPlb1p und caPlb2p (siehe Abb. 27) als caPlb3p-N bzw. caPlb3p-C betitelt wurde. Das unterbrochene Leseraster könnte entweder auf Sequenzierfehler zurückgeführt werden oder auf die Existenz als Pseudogen hindeuten (ein Intron mit typischen *Splice*-Sequenzen konnte nicht identifiziert werden). Die Homologie zu caPlb5p liegt hier bei 42 % Identität und 62 % Ähnlichkeit. Die ORFs 6.6553 und 6.5227 verfügen über eine typische Lysophospholipase- / Phospholipase-B-Domäne, finden aber ansonst in ihrer Gesamtstruktur nur wenig Übereinstimmung mit Phospholipase-B-Proteinen aus Pilzen. Beide ORFs erscheinen als Homolog zu scSpoIp, einem Protein, das in die Meiose von *S. cerevisiae* involviert ist.

(a)

```

75 FD--VDSFLAH-----SNPITIGLAFSGGGYRAMLIGAGEISSLDLRSRTKNTTP-----VLACILQASSYTAGLSGGSWLVGSLASNNLNLSVDDMLSQ--G--LWELTHS-----166
75 FD--VDGFIN-----SNPITIGLAFSGGGYRAMLAGAGELLALDRL--ATNPS-----VLGHLQSSSYIVGLSGGSLVGSLSASNDLIPVDQLLRE--DK--LWDIQNS-----165
89 FN--PQNFIDAK--DYGGINIGLAFSGGGYRAMINGAGOLMALLDRSSSPESGSGSGLGGLLQSANVIGLSCSSWLVGLSASNDLIPVDQLLRE--DK--LWDIQNS-----201
79 FD--PESFING--LNRSIKIGLSFGGGYRAMINGAGOLMALLDRNRTRGFEIS-----GLGGLLOASTYIVGLSGGNWVGTIAYNNETSVQHIID--OD--SIWDLGHS-----174
160 FD--AKSFINDN--APNHNITIGLSFGGGYRAMLAGAGOLGLDGRYEDANNH-----GLGGLLDSSSTYVGLSGGNWLVGSLALNDLWLVGDIIVNG--KS--TIWQLQDS-----258
82 TS--LSTLFG--S--NSSIMPKIAVACSGGGYRAMISGAGMLAAVDRNRDGANEH-----GLGGLLQCAFYVAGLSGGNWLITSFLAMNNWTSVQAIVDNTTESNSIWDLHSHS-----183
84 TS--LSTLFS--S--NSSIVPKIGIACSGGGYRAMIGAGMIAAVDRNRDGANEH-----GLGGLLOSSTYVGLSGGNWLVGSLAMNNWTSVQAIVDHMTSESDSIWNITKS-----185
86 SSEVLSKLFNDG--NSELTPKIAVAVSGGGYRSMITGAGVLAADVNRDTEGAYEH-----GLGGLLOSTIYVLSGASGGNWLVEGLLALANNWTSVQDILNNMQDDSIWDLGDS-----189

```

*

```

371 AISCKNLVLDGGEDGQNIPLIHRN--VSAIFAFDNSND-VLWMPDGLSIKTYE-----426
370 -KIACSRITLVLDGGEDGQNVPLIHRK--VSAIFAFDQSDAP-KNNWPDGSALIKTFE-----425
416 -NITSDTLVLDGGEDGQNVPLIHRK--VSAIFAFDSDIN-KTNWPDGSALISSEY-----475
380 -SIASNDTLVLDGGEDGQNVPLIQEQRQVDVIFAVDNSADINQWPNGASVAVSYO-----438
466 -SIFTDTLVLDGGEDGQNVPLIQEQRQVDVIFAFDNSADINSSWPNGISIQETFK-----524
391 SSIETSYLFLVDGGEDGQNVPLIQEQRQVDVIFALDNSADIDDDYMPDGSALINITYO-----450
393 SSIYDADLFLVDGGEDGQNVPLIKKRRDLDMVFDLSDNIDESWPSGVCMTNITYE-----452
397 TSIYVSDSLFLVDGGEDGQNVPLIQEQRQVDLIFAVDNSADMRLLAWPDGSSLVHITYE-----457

```

(b)

NH₂-terminale Signalsequenz

```

1 --MLFH--HLLLLIINYCVAT-----SPT-NG-----YAPGVVSC-----31
1 --MFW--QSHLFLMGVLSK-----SPT-ML-----YTPGVVQC-----31
1 --MHL--ISLILISLVIGS-----SPS-CG-----YAPGVVQC-----31
1 --MEL--INIVLVFLSIYINPIIAW-----SPT-DS-----YAPGVVQC-----35
1 --MKN--LKLIGSILISOQAIIWPFEDSSGSSSSSDSSPSETGSGGTFPDLFGSGSSSTQSSSAQASSTKSTSDSASST-DSLFLSSNSGSSWYQTFLLDGDSDQKTDYAPFNITC-----115
1 --MKLQS--LIVSAAVLISLTENVNAM-----SPN-NS-----YVPAVNTC-----36
1 --MQRN--IQASSLISGLSLADSS-----STIGG-----YAFSTIPC-----37
1 MIRELCSKILISYIFAIQFLLAANAW-----SPT-DS-----YVPGIVSC-----40

```

Abbildung 25: **CaPlb5p-Sequenz im Vergleich mit homologen Phospholipasen.** Der AS-Sequenzvergleich wurde durchgeführt mittels CLUSTALX, Version 1.8. Im Vergleich dargestellt sind die Phospholipasen B scPlb1-3 von *S. cerevisiae*, caPlb1p, caPlb2p, caPlb4p und caPlb5p von *C. albicans* sowie die AS-Sequenzen der inkompletten ORFs caPlb3p-N und caPlb3p-C. (a) zeigt die Region um die drei katalytischen Einheiten (gestrichelte Linien) mit den für die Phospholipaseaktivität essentiellen Aminosäuren ¹⁸⁷R, ²²⁵S und ⁴⁷⁷D (*). Gleiche Aminosäuren sind schwarz hinterlegt und ähnliche grau. (b) zeigt einen Vergleich der NH₂-terminalen Regionen, wobei putative Signalsequenzen (Einrahmungen) aus veröffentlichten Sequenzdaten übernommen (caPlb1p [Leidich, 1998 #67]; scPlb1-3 (*Saccharomyces*-Genomdatenbank SGD, <http://db.yeastgenome.org>)) oder mittels iPSORT identifiziert wurden.

3.1.4 Analyse der caPlb5p Proteinsequenz und Vergleich mit anderen homologen Phospholipasen B Proteinen aus Pilzen

Die von *caPLB5* abgeleitete Aminosäuresequenz weist von AS 177 bis AS 669 eine für Lysophospholipase / Phospholipase B (EC 3.1.1.5) und cytosolische Phospholipase A2 (cPLA2, EC 3.1.4) typische katalytische Domäne (pfam01735) auf. Charakteristisch für diese Domäne sind drei hoch konservierte Motive mit den für die Phospholipaseaktivität essentiellen Aminosäuren Serin (S), Aspartat (D) und Arginin (R) (211). Sequenzvergleiche mit Lysophospholipasen aus Pilzen zeigten, dass auch caPlb5p mit den AS-Sequenzabfolgen SGGGY¹⁸⁷RAM, GL²²⁵SGG und ⁴⁷⁷DGGEDLQN über diese drei katalytischen Einheiten verfügt (Abb. 25 a).

Weiterhin besitzt caPlb5p zwei putative Signalpeptide, die für den Transportweg des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) bestimmend sind: So befindet sich am NH₂-Terminus ein typisches hydrophobes Signalpeptid, das nach Leitung des Proteins zum sekretorischen Transportweg im ER vermutlich nach der Aminosäureposition 19 (nach iPSORT-Analyse) abgespaltet wird (Abb. 25 b). Eine weitere hydrophobe Signalsequenz befindet sich am COOH-Terminus, was, gemeinsam mit dem NH₂-terminalen Signalpeptid auf die Anwesenheit eines GPI-Ankers hindeutet (Abb. 26). Mittels DGPI-Analyse konnte eine potentielle Omega-Spaltstelle an Position 720 - 722 (ω , $\omega+1$, $\omega+2$) identifiziert werden, wobei die GPI-Verankerung a Position ⁷²⁰S (die ω -Stelle) erfolgt. An Position 722 ($\omega+2$) befindet sich ebenfalls ein Serin, was nach der ω - $\omega+2$ -Regel für eine potentielle Spaltstelle zwischen den AS-Positionen 720 und 721 spricht (101). Wie in Abbildung 25 b und 26 dargestellt zeigen Sequenzanalysen der vier weiteren Phospholipase-B-Proteine (inklusive der diskontinuierlichen Phospholipase caPlb3p-N, -C) von *C. albicans* sowie der drei Phospholipasen scPlb1-3p von *S. cerevisiae*, dass auch sie über eine putative NH₂-terminale Signalsequenz verfügen und, mit Ausnahme von caPlb1p und caPlb2p, über eine Phosphatidylinositol-Glycan-Einheit mit der Plasmamembran oder der Zellwand verankert sein könnten (nach DGPI Analyse).

			putative Spaltstelle		COOH-terminales Signalpeptid	
			ω	ω	ω	
			+1	+2		
CaPlb3p-C	664	KEEFIGVVRE	S	N	S	<u>DSLKLSKYLTIASLFALYLVIM</u> 698
CaPlb4p	597	TTNDESMKV	N	S	G	<u>VLTSVSWSLWAMMLAALSVFILG</u> 632
CaPlb5p	710	NGGSSSTGSS	S	S	S	<u>KKKNGGDLVNGGVPSSIFLVFNSSLGLIIAYL</u> 754
ScPlb1p	624	SAGSSTHKK	N	A	G	<u>NALVNYSNLNTNTFIGVLSVISAVFGLI</u> 664
Scplb2p	670	RSSSSTANKA	N	A	A	<u>AISYANTNTLMSLLGAILFGLI</u> 706
ScPLB3p	649	TATLEKKAAT	N	S	G	<u>SHLSGISVKFSAMIMLTLLMFTGAV</u> 686

Abbildung 26: **Putative COOH-terminale Signalpeptide GPI-verankerter Phospholipasen B aus Pilzen.** Die Sequenzanalysen wurden mittels DGPI-Programm (Buloz und Kronegg, Universität von Genf, CH) durchgeführt. Putative GPI-Ankerpositionen wurden für scPlb1-3p aus veröffentlichten Sequenzdaten übernommen (SGD, (114, 177)). Dargestellt sind die wahrscheinliche Spaltstelle in Fettdruck (ω , $\omega+1$, $\omega+2$) und das COOH-terminale Signalpeptid, wobei der hydrophobe AS-Bereich unterstrichen ist. Hier muss angemerkt werden, dass Sequenzanalysen mit anderen Programmen (z. B. PSORT und Big-PI-Predictor) durch die Verwendung unterschiedlicher Algorithmen zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich GPI-Verankerung und potentieller Omega-Stelle führen können.

Kurz vor der ω -Stelle (ω -Minus-Region) befindet sich bei caPlb5p eine Serin/Threonin-reiche Sequenzabfolge von Position 674 bis 719, wie sie ähnlich auch in anderen Phospholipasen B, wie z. B. scPlb2p und scPlb3p, vorkommt. In *S. cerevisiae* scheint die Aminosäurekomposition dieser ω -Minus-Region bei GPI-verankerten Proteinen deren bevorzugte zelluläre Lokalisation (Plasmamembran oder Zellwand) entscheidend mitzubestimmen (113, 114). Nach PSORTII-Analyse könnte caPlb5p theoretisch zu 56 % in der Zellwand und zu 44 % in der Plasmamembran verankert sein.

Diese Sequenzvergleiche sowie weitere Vergleiche mit verwandten Lysophospholipase- / Phospholipase-B-Proteinen waren Grundlage für die Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaums mittels Distanz-(*minimal evolution*)-Algorithmus in PAUPSEARCH / PAUPDISPLAY (GCG-Programmpaket). Nach dieser Analyse bilden die *C. albicans* Phospholipasen B eine eigene Gruppe, die sich von den Phospholipasen anderer Pilze abgrenzt (Abb. 27). Die Proteine caPlb4p und caPlb5p scheinen jedoch noch näher verwandt mit PLB-Enzymen anderer Pilze, wie z. B. *C. glabrata*, *S. cerevisiae* oder *K. lactis*, zu sein und bilden neben caPlb1p, caPlb2p und caPlb3p (das trotz diskontinuierlicher Sequenz mit in die Analyse einbezogen wurde) ein eigenes Cluster.

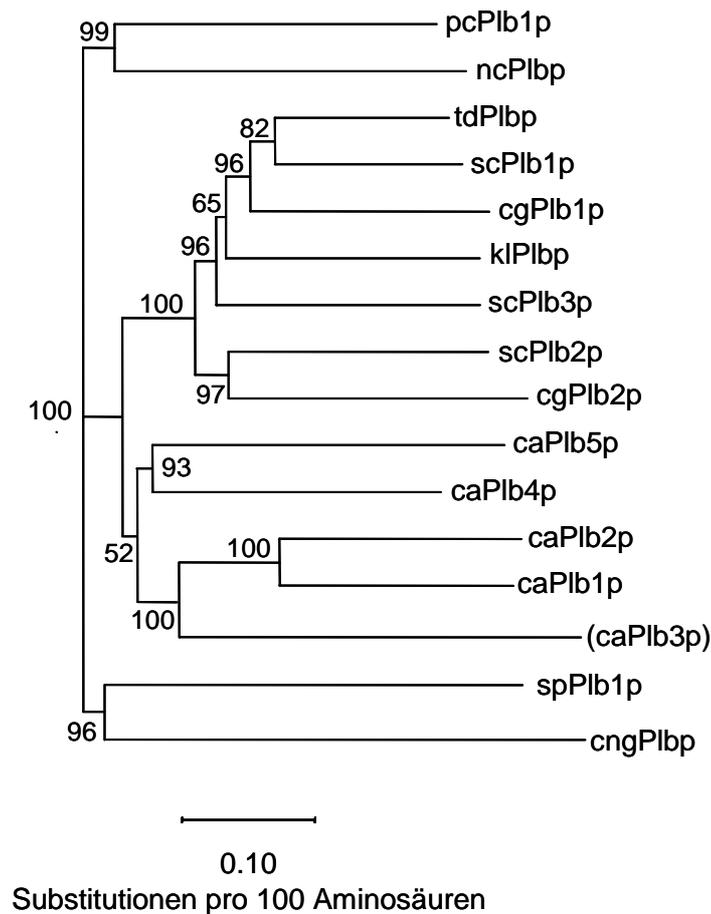


Abbildung 27: **phylogenetischer Stammbaum ohne Ursprung.** Die Berechnung erfolgte mittels Distanz- (*minimum evolution*)-Algorithmus in PAUPSEARCH des GCG-Wisconsin-Programmpakets Version 10.3 und wurde mit PAUPDISPLAY grafisch dargestellt. Mit in die Analyse einbezogen wurden Phospholipasen B der Stämme *C. albicans* (*caPlb1p* (AAC61890), *caPlb2p* (BAA36162), *caPlb3p* (orf6.795/796), *caPlb4p* (orf6.6206), *caPlb5p* (AAF08980)), *C. glabrata* (*cgPlb1p* (AAM16160), *cgPlb2p* (AAM19335)), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (*cngPlbp* (AAF65220)), *Kluyveromyces lactis* (*klPlbp* (BAA28619)), *Neurospora crassa* (*ncPlbp* (AAC03052)), *Penicillium chrysogenum* (*pcPlb1p* (P39457)), *S. cerevisiae* (*scPlb1p* (NP_013721), *scPlb2p* (NP_013719), *scPlb3p* (NP_014632)), *Schizosaccharomyces pombe* (*spPlb1p* (NP_593194)) und *Torulaspora delbrueckii* (*tdPlbp* (Q11121)). Die an den Verzweigungen angegebenen *Bootstrapping values* ergaben sich nach 1000-facher Iteration. Hierbei gilt, je höher der angegebene Wert, desto sicherer ist eine bestimmte Verzweigung (*Bootstrap*-Wert 100 entspricht 100 %).

Auffallend in der von *caPLB5* abgeleiteten AS-Sequenz ist ein Serin-reicher AS-Sequenzeinschub, der sich direkt an die NH₂-terminale Signalsequenz anschließt (Pos. 25 bis 91, Abb. 25 b) und so in anderen untersuchten Phospholipasen B nicht vorkommt. Viele eukaryotische exportierte Proteine werden als inaktive Vorläufer synthetisiert und erst durch endoproteolytische Spaltung an dibasischen Aminosäureresten durch Mitglieder der Kexin Superfamilie aktiviert. Für *scKex2p* aus *S. cerevisiae* konnte eine bevorzugte Spaltsequenz identifiziert werden, wobei an Position 2 Arg oder Lys und an Position 1 Arg liegen (228). Ähnliche bevorzugte Spaltsequenzen werden auch für

caKex2p angenommen (194). So befinden sich zwei mögliche Kex2 Proteinase Spaltstellen C-terminal der Serin-reichen NH₂-Sequenz (K₁₃₈R₁₃₉↓ und K₁₅₃R₁₅₄↓), die auf eine potentielle Prepropeptidkonfiguration des caPlb5p-Proteins hindeuten könnten.

Mittels PROSITE Motivfinder ließen sich zudem 16 potentielle N-Glycosylierungsstellen mit dem Sequenzmotiv „Asn-X-Ser/Thr“ in der von *caPLB5* abgeleiteten Aminosäuresequenz finden. Auch mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, darunter eine mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (Pos. 373 - 380: KSFSDIQY), sowie eine ATP/GTP-Bindungsstelle (Motiv A, P-loop, Pos. 243 - 250: GDIVNGKS) konnten identifiziert werden.

3.2 Studien zur Phospholipasen Expression *in vitro*

3.2.1 Wachstumskinetik in YPD

Im Folgenden wurde die Expression der *caPLB5*-mRNA während des Wachstums wildtypischer *C. albicans*-Zellen im reichhaltigen Medium mittels Northernblotanalyse untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Stamm SC5314 in YDP-Flüssigmedium bei 30°C angezogen und eine Wachstumskurve erstellt (Abb. 28 a). Zu verschiedenen Zeitpunkten während der frühen logarithmischen bis zur späten stationären Wachstumsphase (maximal 72 Stunden) erfolgte eine Probeentnahme zur Gewinnung von RNA. Nach Hybridisierung der RNA-Proben mit einer Gen-spezifischen DNA-Sonde konnte zu jedem Zeitpunkt bis 48 Stunden ein *caPLB5*-spezifisches Transkript von 2,3 kb detektiert werden (Abb. 28 b). Semiquantitative Messungen der relativen Signalintensitäten (RI), wobei das *caACT1*-Transkript als interner Standard herangezogen wurde, zeigten während des exponentiellen Wachstums eine stete Erhöhung der Transkriptmenge mit RI-Werten von 0,27 (4 h) bis 0,9 (10 h). Dieses um das Dreifache erhöhte Transkriptionsniveau blieb während der späten logarithmischen Phase bis in die stationäre Phase hinein (10 - 24 h) erhalten. Auch nach 48 Stunden ließ sich trotz schwer zu isolierender intakter Zell-RNA noch eine schwache *caPLB5*-spezifische mRNA-Bande nachweisen.

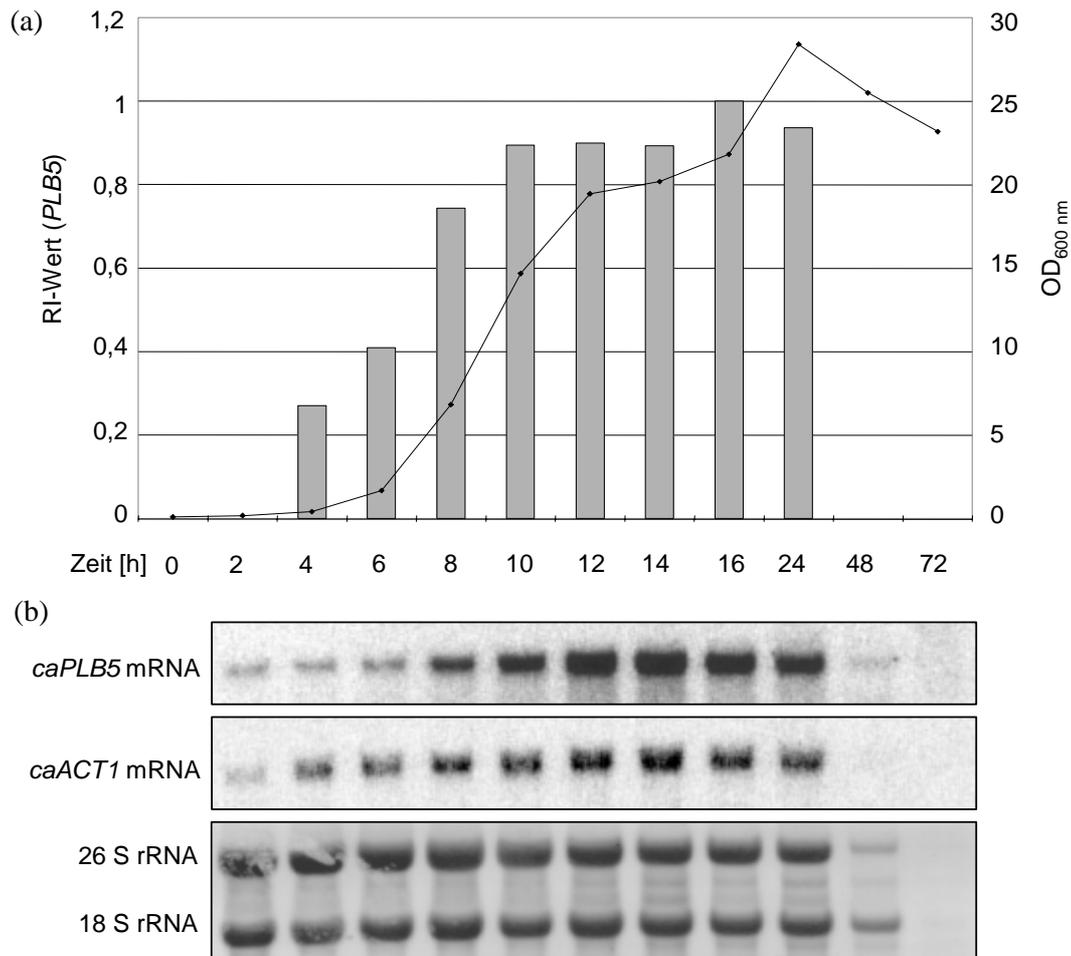


Abbildung 28: Analyse der *caPLB5*-mRNA-Expression während des Zellwachstums in YPD. SC5314 wurde aus einer YPD-ÜN-Kultur in frischem YPD-Medium auf eine OD_{600nm} 0,1 verdünnt und bei 30°C geschüttelt.

(a) graphische Darstellung der zu den angegebenen Zeitpunkten (0 - 72 h) gemessenen Zelldichten (Kurve) sowie der RI-Werte der korrespondierenden, mittels Northernblothybridisierung ermittelten *caPLB5*-Transkriptsignale (Säulen). (b) Northernblotanalysen der korrespondierenden *caPLB5*-mRNAs, wobei die Hybridisierung mit der PLB5#3-Sonde erfolgte. Qualitäts- und Ladungskontrolle erfolgte durch Methylenblaufärbung (rRNA-Banden) und durch Rehybridisierung mit einer *caACT1*-spezifischen Sond (ACT1#1) (308). Die *caPLB5*-Transkriptsignale nach 4 – 24 h Wachstum wurden mit dem entsprechenden *caACT1*-Transkriptsignal standardisiert und auf den Wert der höchsten Intensität normalisiert, der den RI-Wert 1 erhielt (hier der 16-h-Wert).

3.2.2 Expression der *caPLB5*-mRNA unter verschiedenen Wachstumskonditionen in den Stämmen CAI4, SC3514 und ATCC44808

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das höchste Expressionsniveau der *caPLB5*-mRNA in *C. albicans* im reichhaltigem Medium mit Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht ist, sollte nun die Regulation der *caPLB5*-Expression während des morphologischen Transition von der hefeförmigen Zelle zur Hyphe untersucht werden.

C. albicans-Zellen wurden nach einem Waschschrift aus einer Übernachtskultur (YPD-Medium) heraus 1:100 in Lee's Medium (154) angeimpft. Die Kulturen wurden für zwei Stunden bei pH 4,5 und 25°C für hefeförmiges Wachstum und bei pH 6,8 und 37°C für filamentöses Wachstum inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Inkubation der Zellen unter intermediären Wachstumsbedingungen bei pH 4,5 und 37°C und bei pH 6,8 und 25°C. Wie die mikroskopische Kontrolle ergab, wächst *C. albicans* unter letzt genannter Bedingung vorwiegend als Blastokonidie, während bei pH 4,5 / 37°C ein großer Anteil an pseudohyphenförmigen Zellen in der Kultur zu erkennen ist.

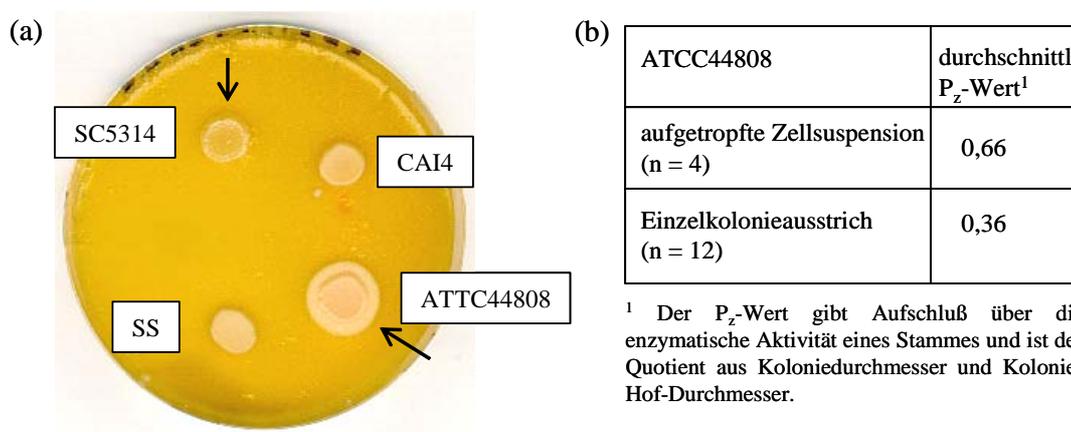


Abbildung 29: **Wachstum verschiedener *C. albicans* Stämme auf Eigelbagarplatten.** (a) Je 10 µl einer Zellsuspension (1×10^7 Zellen/ml) der angegebenen Stämme wurde auf Eigelb-haltige SD-Platten (223) aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Nach 3 – 5 Tagen bildete sich unter den Zellen bzw. um die Zellen ein weißliches Präzipitat (Pfeile). Die in diesem Versuch ermittelten P_z-Werte¹ betragen: 1 (CAI4, SS), 0,9 (SC5314) und 0,6 (ATCC44808). (b) Die Tabelle zeigt den aus mehreren Versuchen (Anzahl n) ermittelten durchschnittlichen P_z-Wert¹ nach Inkubation von entweder aufgetropften Zellen oder Einzelkoloniausstrichen des Stamms ATCC44808 auf Eigelbagarplatten.

Untersucht wurde die *caPLB5*-Expression in den Stämmen CAI4, dessen Ausgangsstamm SC5314 sowie dem ATCC-Stamm 44808. Wachstumstests mit verschiedenen *C.-albicans*-Isolaten auf Eigelbagarplatten hatten gezeigt, dass sich beim Stamm ATCC44808 um einzelne Kolonien bzw. um aufgetropfte Zellen (Abb. 29 a) eine deutliche Präzipitatzone bildet. Im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen SC5314, CAI4 und SS, bei denen das Präzipitat hauptsächlich unter den Zellen auftrat, weist der deutlich hervortretende weiße Hof auf eine hohe lipolytische Aktivität mit durchschnittlichen P_z-Werten von 0,36 (bei Einzelkoloniausstrich) bzw. 0,66 (bei auftropfen einer Zellsuspension) im Stamm ATCC44808 hin (Abb. 29 b). Aus diesem Grund und da es sich um ein Patientenisolat aus Blut handelte wurde dieser ATCC-Stamm in die Untersuchungen mit einbezogen.

Nach Inkubation der *C.-albicans*-Kulturansätze unter den oben beschriebenen Wachstumsbedingungen in Lee's Medium wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels Northernblothybridisierung die *caPLB5*-spezifische mRNA-Bande im Gel detektiert (Abb. 30). In allen drei Stämmen (ATCC44808, SC5314 und CAI4) zeigte sich ein identisches *caPLB5*-mRNA-Expressionsmuster, wobei unter Hyphen induzierenden Bedingung bei 37°C das höchste Expressionsniveau bei pH 6,8 (RI-Wert 1) und ein um die Hälfte abgeschwächtes Transkriptsignal bei pH 4,5 erreicht wurde. Im Vergleich dazu konnte bei den als Hefen wachsenden Zellen bei 25°C nur noch ein schwaches *caPLB5*-Transkriptsignal detektiert werden mit der geringsten Signalstärke bei pH 6,8.

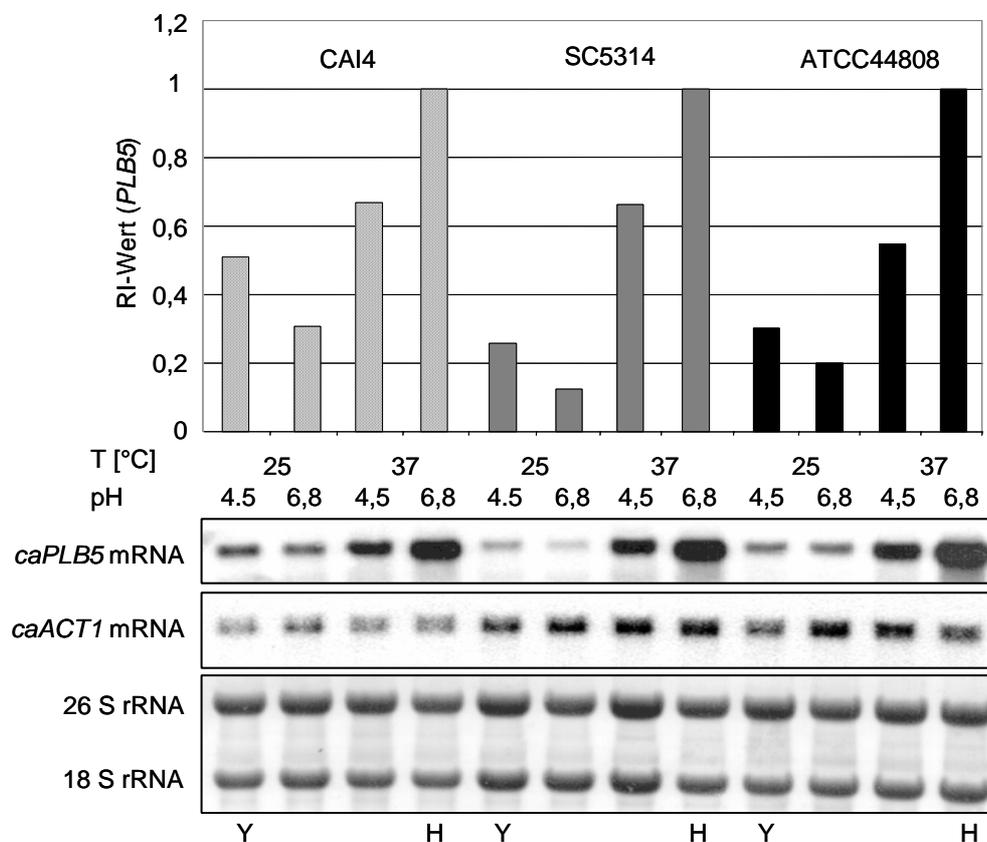


Abbildung 30: **Expression der *caPLB5*-mRNA in Lee's Medium.** Nach zweistündiger Inkubation wurde aus *C.-albicans*-Zellen, die in Lee's Medium bei unterschiedlichen pH-Werten (4,5 und 6,8) und Temperaturen (25°C und 37°C) inkubiert worden waren, Gesamt-RNA isoliert und mittels Northernblothybridisierung analysiert. Mit den Sonden PLB5#3 und ACT1#1 ließ sich ein *caPLB5*-spezifisches Transkript (*caPLB5*-mRNA) und entsprechend ein *caACT1*-spezifisches Transkript (*caACT1*-mRNA) detektieren. Methylenblau-gefärbte rRNA-Banden dienten zusätzlich als Ladungskontrolle. Zur Ermittlung der RI-Werte wurde die Expression der *caPLB5*-mRNA gegen das entsprechende Actin-mRNA-Signal normalisiert und der höchste *caPLB5*-mRNA-Expressionswert willkürlich gleich 1 gesetzt. Eindeutige Zellmorphologien wurden mit Y (*Yeast*) für Hefe und H für Hyphen angegeben.

3.2.3 Vergleich des *caPLB1*-, *caPLB2*- und *caPLB5*-Transkriptionsprofils im Hyphen-induzierenden Lee's Medium

Die Tatsache, dass *C. albicans* neben *caPlb5p* noch weitere nah verwandte Phospholipasen des Typs B besitzt legte die Frage einer möglichen differentiellen Regulation nahe, ähnlich wie es bei den gut untersuchten sauren Proteasen (Saps) der Fall ist. So zeigen sich einzelne Sap-Isoenzyme *in vitro* in Abhängigkeit vieler Faktoren, wie z. B. der Zellmorphologie, des Mediums, des pH-Werts und der Temperatur, unterschiedlich reguliert (Übersicht in (125)).

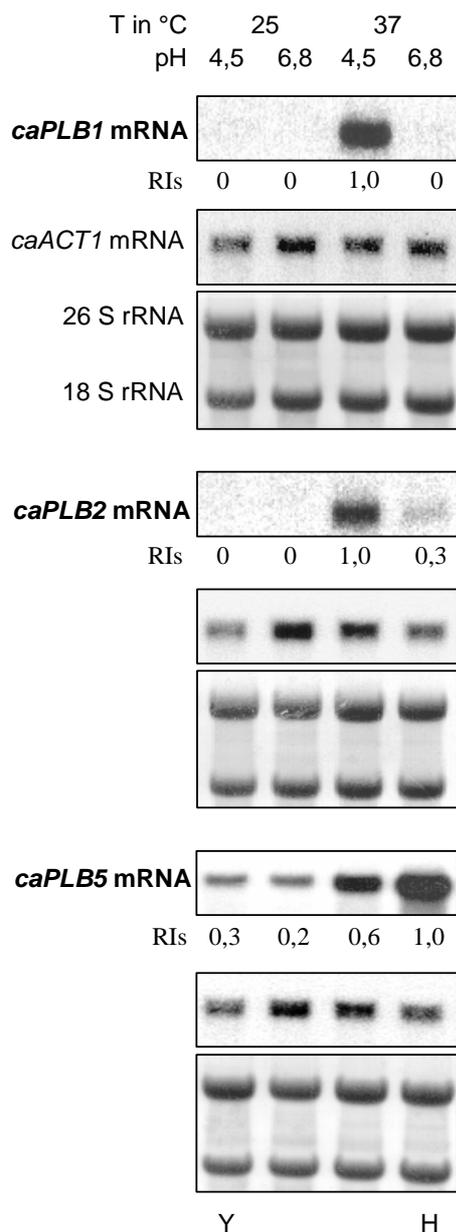


Abbildung 31: **Differentielle Expression der Phospholipasen *caPLB1*, *caPLB2* und *caPLB5* in Lee's Medium.** Die Zellen wurden in Lee's Medium zur Induktion von Hyphen bei 37°C / pH 4,5, zur Induktion von Hefen bei 25°C / pH 4,5 und für Ausbildung von Mischformen bei 25°C / pH 6,8 (vorwiegend Hefen) bzw. 37°C / pH 4,5 (vorwiegend Pseudohyphen) inkubiert. Nach 2 h Wachstum wurde Gesamt-RNA isoliert und mit den Gen-spezifischen Sonden PLB1#1 (*caPLB1*-mRNA), PLB2#1 (*caPLB2*-mRNA) und PLB5#3 (*caPLB5*-mRNA) unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Methylenblau-gefärbte rRNA-Banden dienten als Ladungskontrolle. Nach Rehybridisierung der Blots mit der ACT1#1-Sonde wurde zur Ermittlung der RI-Werte die Expression der *caPLB5*-mRNA gegen das entsprechende Actin-mRNA-Signal normalisiert und das *caPLB5*-mRNA-Signal mit der höchsten Intensität gleich 1 gesetzt. H (Hefe), Y (*Yeast*, Hyphe)

In Abbildung 31 ist ein Vergleich des *caPLB5*-Transkriptionsmusters mit den Genen *caPLB1* und *caPLB2* dargestellt. Hierfür wurden Zellen des ATCC-Stamms 44808 in Lee's Medium aus der stationären Phase heraus angeimpft und, wie bereits oben beschrieben, für zwei Stunden bei

unterschiedlichen Temperaturen (25°C und 37°C) und pH-Werten (4,5 und 6,8) inkubiert. Nach Isolierung der Gesamt-Zell-RNA wurden Northernblotanalysen mit spezifischen Gen-Sonden durchgeführt. Hierbei zeigte sich tatsächlich eine differentielle Regulation dieser drei Phospholipase-B-Gene: Während unter allen getesteten Bedingungen in Lee's Medium ein *caPLB5*-Transkript nachgewiesen werden konnte (mit höchster Expression unter Hyphen induzierenden Bedingungen) zeigte sich *caPLB1* ausschließlich bei 37°C und einem pH-Wert von 4,5 transkribiert, wobei die Zellen unter diesen Bedingungen vorwiegend als Pseudohyphen wuchsen. Mit einer *caPLB2*-spezifischen Sonde ließ sich im Northernblot nur nach verlängerter Exposition mittels Phosphorimager ein Signal bei 37°C und pH 4,5 detektieren und ein wesentlich schwächeres bei 37°C und pH 6,8.

3.3 Herstellung von *caplb5*-Mutantenstämmen

Nach den Untersuchungen zur Expression des *caPLB5*-Gens in Abhängigkeit verschiedener *in vitro* Wachstumsbedingungen sollte nun die biologische Funktion von caPlb5p näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden *caplb5*-negative Mutanten im Uridin-auxotrophen Stamm CAI4 sowie im wildtypischen Isolat ATCC44808 konstruiert.

3.3.1 Inaktivierung des *caPLB5*-Gens mittels *URA3*-Blaster im Stamm CAI4

Beide Allele des Phospholipase-B-Gens *caPLB5* wurden in *C. albicans* CAI4 durch sequentielle Genmutagenese ausgeschaltet. In Abbildung 32 a ist die Konstruktion der Deletionsmutanten schematisch dargestellt. Hierfür wurde eine Mutagenesekassette konstruiert, die aus dem Selektionsmarkergen *URA3* besteht, das mit direkten *hisG*-Sequenzwiederholungen und *caPLB5*-spezifischen Sequenzen flankiert wurde (siehe Kapitel IV 7.4.7). Durch homologe Rekombination der *PLB5-URA3*-Blaster-Kassette mit der *caPLB5*-Genregion entstanden zwei unabhängige heterozygote Mutanten, die im ersten jeweils anderen *caPLB5*-Allel (*caPLB5*^{SN} (Stamm PG9) und *caPLB5*^{LK} (Stamm PK3)) eine Deletion von 1100 bp (Pos. +281 bis +1381) aufweisen. Die beiden *caPLB5*-Allele können nach *EcoRI*-Restriktionsverdau isolierter chromosomaler DNA aufgrund eines Restriktionslängenpolymorphismus im Agarosegel differenziert werden. So zeigt Abbildung 32 b eine Southernblotanalyse des Ausgangsstamms CAI4 und der konstruierten Mutanten.

Zur Herstellung der *caplb5*-Nullmutanten wurden beide heterozygoten Stämme auf Verlust des Selektionsmarkers durch intrachromosomale Rekombination der *hisG*-Sequenzwiederholungen auf FOA-Agarplatten selektioniert (87). In den isolierten *ura3*-negativen Mutanten PK3-3 und PG9-3 wurde das noch intakte zweite *caPLB5*-Allel in einer weiteren Disruptionsrunde inaktiviert.

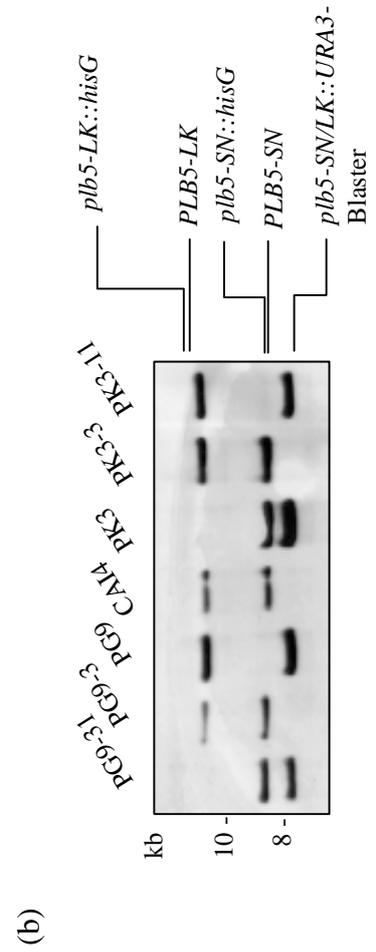
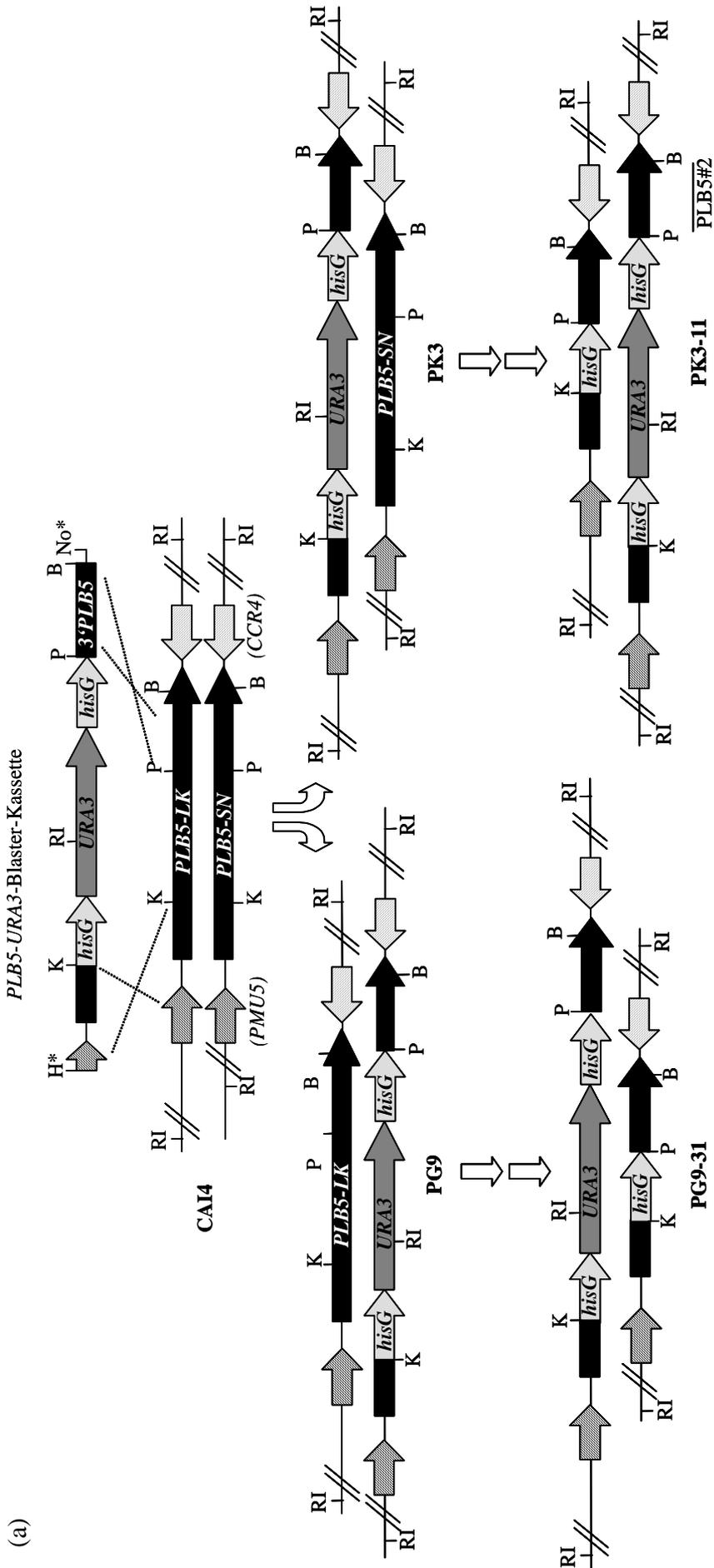


Abbildung 32: ***caPLB5*-Mutagenesestrategie mittels *PLB5-URA3*-Blaster und Southernblotanalyse.** (a) schematische Darstellung der *caPLB5*-Genregion in den Stämmen CAI4, PG9, PK3, PG9-31 und PK3-11 mit den angrenzenden Genen *caPMU5* und *caCCR4* (gestreifte Blockpfeile). Angegeben ist auch die Lage der Sonde PLB5#2, die in der Southernblothybridisierung zum Einsatz kam. Abkürzungen: B (*Bam*HI), H (*Hind*III), K (*Kpn*I), No (*Not*I), P (*Pst*I), RI (*Eco*RI), * (Primer- oder Vektor-generiert). (b) Southernblotanalyse *Eco*RI-verdauter chromosomaler DNAs der *caplb5*-Deletionsmutanten. Nach Insertion der *PLB5-URA3*-Blasterkassette in ein *caPLB5*-Allel verkleinert sich die Bandengröße im Agarosegel aufgrund einer *Eco*RI-Schnittstelle im *URA3*-Gen von ca. 11,4 kb (Allel *PLB5-LK*) bzw. ca. 8,5 kb (Allel *PLB5-SN*) auf 6,7 kb (*plb5-SN/LK::URA3*-Blaster). Nach intrachromosomaler Rekombination der *hisG*-Wiederholungen verbleibt eine *hisG*-Sequenz (1160 bp) im inaktivierten *caPLB5*-Allel (1100 bp wurden deletiert), so dass dessen Bande (*plb5-SN::hisG* bzw. *plb3-LK::hisG*) nur leicht höher als die jeweils wildtypische Bande läuft.

Die entstandenen Mutanten PK3-11 und PG9-31 tragen je ein *URA3*-Gen inseriert in die Genregion des jeweils zweiten *caplb5*-Allels und sind somit auch ohne Zugabe von Uridin (oder Uracil) wachstumsfähig. So wuchsen die Ura-positiven CAI4-Mutantenstämme in SD-Medium ohne Zugabe von Uridin oder Uracil mit derselben Wachstumsrate wie der für den *URA3*-Genloкус heterozygote CAI4-Ausgangsstamm CAF2-1 (Δ *ura3-1::imm434/URA3*, (87)) (Abb. 33 a). Bei den Nullmutanten PK3-11 und PG9-31 ließ sich im Northernblot nach Hybridisierung mit einer Gen-spezifischen Sonde kein *caPLB5*-Transkript mehr nachweisen (Abb. 33 b). Im Gegensatz dazu zeigten die heterozygoten Mutanten PK3 und PG9 eine jeweils für das andere *caPLB5*-Allel spezifische Transkriptbande mit ähnlichen RI-Werten.

3.3.2 Inaktivierung des *caPLB5*-Gens mittels *MPA^R*-Flipper im Stamm ATCC44808

Die Konstruktion homozygoter *caplb5*-Mutanten im wildtypischen Isolat ATCC44808 erfolgte unter Verwendung des sogenannten „*MPA^R*-Flippers“, der den dominanten Selektionsmarker *MPA^R* mit einem induzierbaren FLP-Rekombinasesystem kombiniert (312). Die Selektionierbarkeit positiver Transformanten von *C. albicans* Wildtypstämmen, die den *MPA^R*-Marker spezifisch ins Genom inseriert hatten, konnte in dieser Arbeit bereits erfolgreich gezeigt werden, ebenso wie die Verwendung des *MPA^R*-Blasters zur Genmutagenese (siehe Kapitel V 2.6). Bei Einsatz der Standard-Blaster-Strategie muss zur Gewinnung homozygoter Mutanten nach erfolgter Insertion des *MPA^R*-Markers in ein Allel dieser wieder aus dem Genom entfernt werden, was durch intrachromosomale Rekombination zwischen den direkten *hisG*-Sequenzwiederholungen erfolgt. Die Selektion *MPA*-sensitiver Zellen wird allerdings dadurch erschwert, dass die Rekombination zwischen den *hisG*-Wiederholungen spontan mit einer geringen Frequenz von ca. 10^{-5} - 10^{-6} erfolgt (87) und der Verlust des *MPA^R*-Gens nicht positiv selektioniert werden kann. Durch eine gezielte Marker-Exzision bei Verwendung der Flipper-Strategie ist die Wiedergewinnung des Markers aus

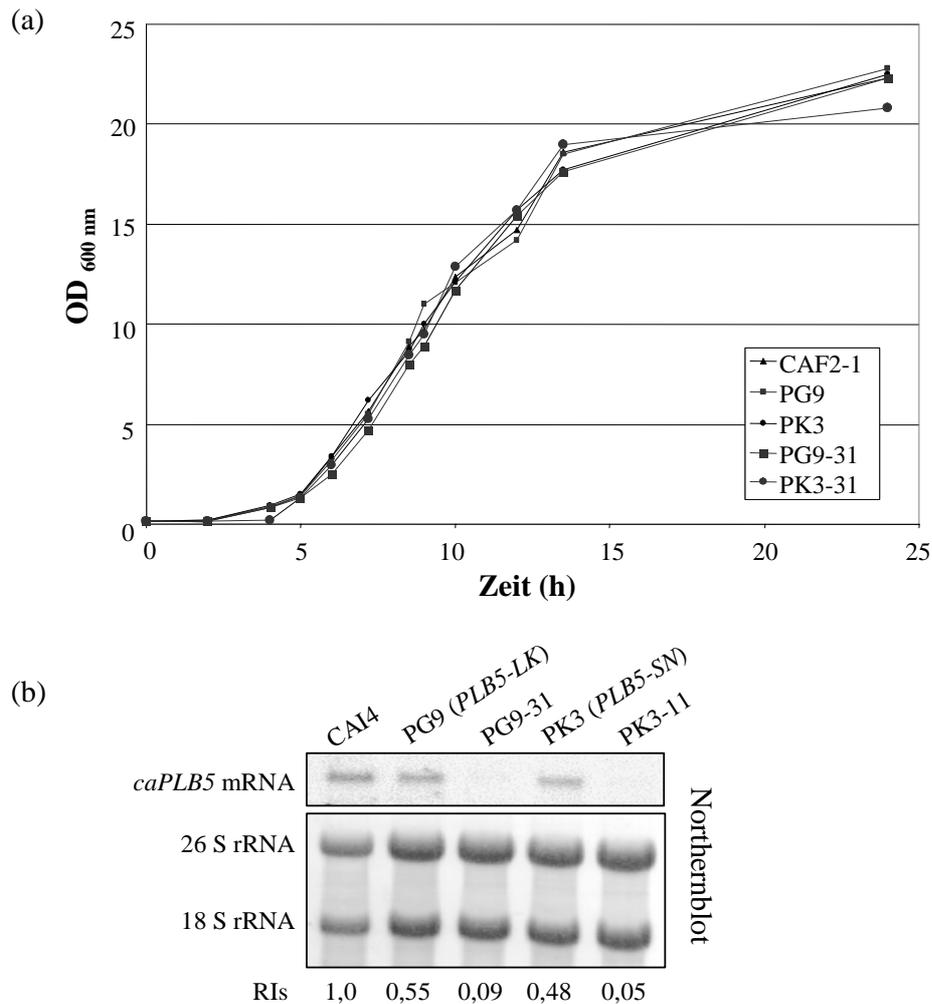


Abbildung 33: **Wachstumsfitnesstest (a) und Northernblotanalyse (b)** der *caplb5*-Mutanten. (a) Die Zellen wurden bei 30°C in SD-Medium (ohne Uridin/Uracil) bis zu 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde zur Erstellung einer Wachstumskurve die Zelldichte bei OD_{600nm} gemessen. Zwischen dem Vergleichsstamm CAF2-1 und den unabhängigen Mutanten PK3, PK3-11 und PG9, PG9-31 zeigten sich keine Unterschiede in den Wachstumsraten. (b) Die Hybridisierung des Northernblots erfolgte mit der Sonde PLB5#4 (*caPLB5* mRNA). Die RNAs des CAI4-Ausgangsstamms und der in *caPLB5* mutierten Stämme wurden nach 2,5 h Wachstum der Zellen bei 37°C in Lee's Medium pH 6,8 isoliert. Als Ladungskontrolle diente Methylenblau-gefärbte rRNA. Zur Berechnung der relativen Signalintensitäten der *caPLB5*-mRNA-Banden wurden die Signale mit der entsprechenden 26 S rRNA- und 18 S rRNA standardisiert, auf den Wert der höchsten Intensität normalisiert (RI = 1) und die erhaltenen Werte gemittelt.

dem Genom sehr viel effizienter (184).

Die *MPA^R*-Flipper-Strategie beruht auf einer genetisch adaptierten, Sequenz-spezifischen FLP- (ausgesprochen „Flip“) -Rekombinase der Hefe *S. cerevisiae* (269), die unter die Kontrolle des *caSAP2*-Promotors (*SAP2P*, Abb. 34) gesetzt wurde. Unter *SAP2*-induzierenden Bedingungen kommt es zur Expression des FLP-Gens und zur FLP-vermittelten Rekombination zweier FRT- (FLP *recognition target*)-Erkennungssequenzen, was zur Deletion des zwischen den FRT-

Zielsequenzen positionierten Selektionsmarkers führt. Gleichzeitig wird dabei das FLP-Gen mit ausgeschnitten.

Zur sequentiellen Disruption beider *caPLB5*-Allele im Stamm ATCC44808 wurde der *MPA^R*-Flipper (312) zwischen *caPLB5*-spezifische 5'- und 3'-Sequenzen kloniert. Zusätzlich wurden kurze (6 bp), zufallsgenerierte Sequenzabschnitte (*Tags*) den *MPA^R*-Flipper flankierend an die FRT-Sequenzen gehängt (siehe Kapitel IV 7.4.8). Das so erhaltene Gemisch verschiedener *Tag*-markierter Disruptionskassetten (*PLB5-MPA^R-Tag*-Flipper) wurde zur Inaktivierung beider *caPLB5*-Allele verwendet. In Abbildung 34 ist der Genmutagenesevorgang schematisch dargestellt, wobei 638 bp der 2262 bp umfassenden *caPLB5*-kodierenden Region deletiert wurden – unter Verbleib einer intakten FRT-Zielsequenz und beider *Tags*. Die korrekte Insertion des *PLB5-MPA^R-Tag*-Flippers ins *C. albicans*-Genom sowie die Exzision des *MPA^R*-Markers wurde in Southernblot hybridisierungen mit einer *caPLB5*- und *caIMH3/MPA^R*-spezifischen Sonde überprüft (Abb. 35). Durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten ([AMPLI5-AMPLI3]-Amplifikate), die den *caPLB5*-Genbereich beider Allele umfassen, konnte in den *MPA*-sensitiven hetero- und homozygoten *caPlb5*-Mutanten die Sequenz der nach Marker-Exzision im Zielgen verbliebenen *Tags* bestimmt werden. Lief die FLP-vermittelte Rekombination wie erwartet intrachromosomal zwischen den beiden FRT-Stellen ab, so mussten sich in der homozygoten Mutante die vier *Tags*, die die Integrationsstelle umgeben, in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden.

In der ersten Transformationsrunde entstand die heterozygote *caplb5^{LK}/caPLB5^{SN}*-Mutante KH44 durch homologe Rekombination der Disruptionskassette mit der Genregion des ersten *caPLB5*-Allels. Nach Wachstum in 2x YCB-BSA-Medium, zur Aktivierung des *SAP2*-Promotors und folgender Induktion der FLP-Rekombinase, wurden die Zellen auf Agarplatten mit geringer *MPA*-Konzentration (1 µg/ml) ausplattiert. Zellen, die den *MPA^R*-Marker gezielt aus ihrem Genom geschnitten hatten wuchsen bei dieser geringen *MPA*-Konzentration schlechter und bildeten kleine Kolonien. Zellen hingegen, in denen die FLP-Rekombinase nicht aktiviert wurde, blieben *MPA*-resistent und bildeten große Kolonien. Die so selektionierte *MPA*-sensitive, für *caPLB5* heterozygote Mutante KH44-13 wurde in einer zweiten Disruptionsrunde eingesetzt zur Inaktivierung des noch intakten *caPLB5^{SN}*-Allels, wobei die *caplb5^{LK}/caplb5^{SN}*-Nullmutanten KH44-90 (*MPA^R*-positiv) und nach Marker-Exzision KH44-91 (*MPA^R*-negativ) generiert werden konnten.

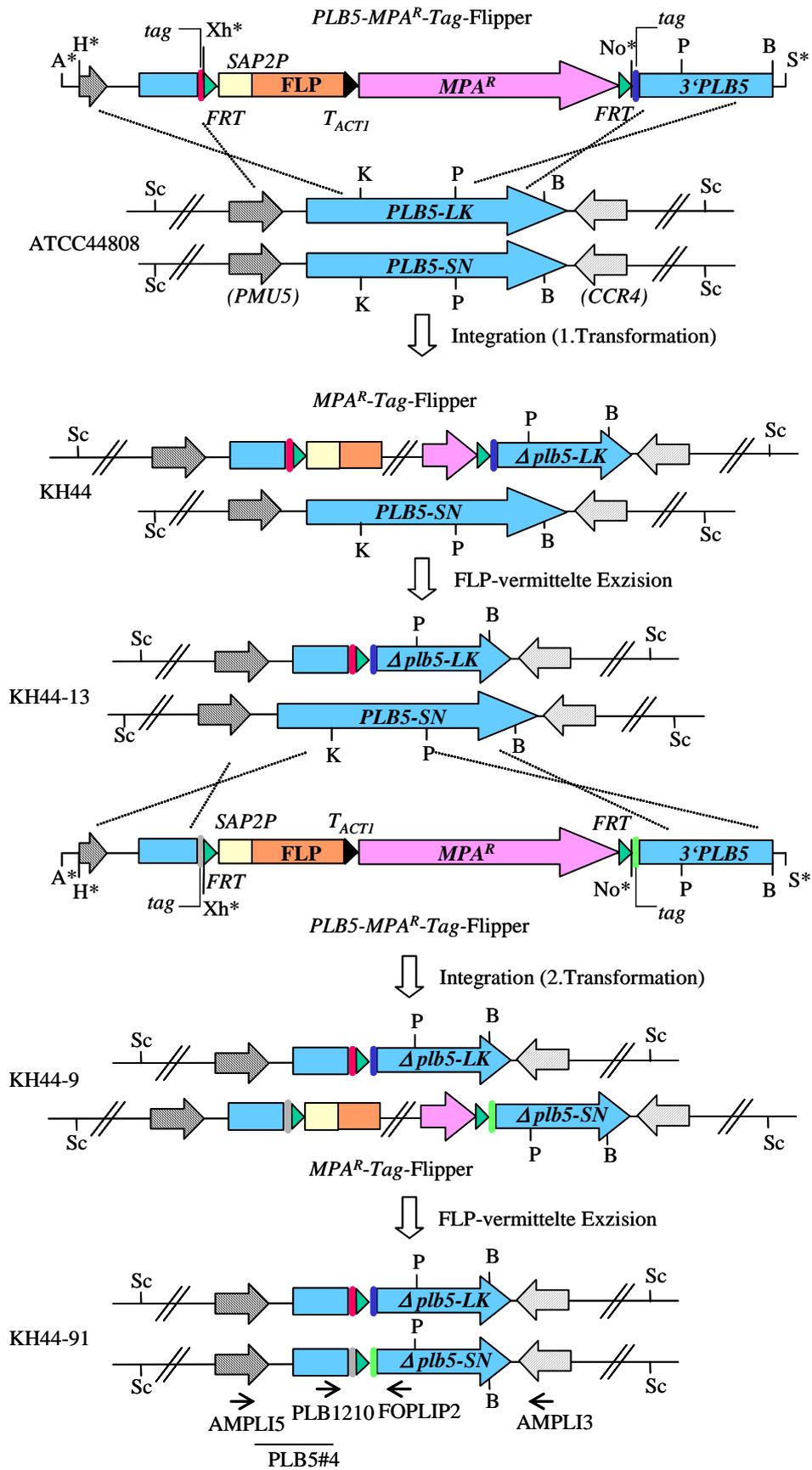


Abbildung 34: **schematische Darstellung der sequentiellen Gendisruption der *caPLB5*-Allele mittels *PLB5*-*MPA^R*-Tag-Flipper.** Das lineare DNA-Fragment des Plasmidpools pDIS-Pool wurde für die integrative 1. und 2. Transformation verwendet. Abgebildet ist die *caPLB5*-Genregion beider Allele mit den angrenzenden Genen *caPMU5* und *caCCR4* (gestreifte Blockpfeile) des Ausgangsstamms ATCC44808, der *MPA^R*-positiven Transformanten KH44 (*Δplb5^{LK}::MPA^R-Tag-Flipper/PLB5^{SN}*) und KH44-13 (*Δplb5^{LK}::tag-FRT-tag/Δplb5^{SN}::MPA^R-Tag-Flipper*) und den *MPA^R*-negativen Rekombinanten KH44-9 (*Δplb5^{LK}::tag-FRT-tag/PLB5^{SN}*) und KH44-91 (*Δplb5^{LK}::tag-FRT-tag/Δplb5^{SN}::tag-FRT-tag*). Die für die Konstruktion relevanten Schnittstellen sind A (*Apa*I), B (*Bam*HI), H (*Hind*III), No (*Not*I), S (*Sac*I), Sc (*Sca*I), Xh (*Xho*I), wobei mit * markierte Schnittstellen Primer- oder Vektor-generiert sind. Weitere Abkürzungen sind: *SAP2P* (*SAP2*-Promotor), *T_{ACT1}* (Sequenz des Transkriptionsterminators von *ACT1*), *FRT* (34 bp Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase). Die Position der zur Hybridisierung des Southern- und Northernblots verwendeten Sonde ist mit einem dünnen Balken angezeigt. Die unterschiedlichen *Tag*-Sequenzen wurden durch Sequenzierung des [AMPLI5-AMPLI3]-PCR-Amplifikats mit den Primern FOPLIP2 und PLB1210 identifiziert.

Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten der *caplb5*-Genregion aus genomischer DNA der homozygoten Mutante KH44-91, zeigten Sequenzvariationen an den die *caplb5^{LK}/caplb5^{SN}*-Deletion flankierenden *Tags* (insgesamt waren alle vier *Tags* von unterschiedlicher Nukleotidsequenz; Daten hier nicht dargestellt). Somit kann ausgeschlossen werden, dass weder mitotisches crossover noch Chromosomenverlust bzw. Chromosomenverdopplung zur Homozygotität am *caplb5*-Locus geführt haben. Northernblotanalysen isolierter Gesamt-RNAs zeigten eine Abnahme der *caPLB5*-mRNA-Menge auf etwa die Hälfte des wildtypischen Transkriptniveaus in den *caplb5^{LK}/caPLB5^{SN}*-Mutanten und einen vollkommenen Verlust der *caPLB5*-mRNA-Expression in den Nullmutanten (Abb. 35).

3.4 Charakterisierung der Mutantenstämme

3.4.1 Untersuchungen des *in vitro* Wachstumsverhaltens der *caplb5*-Mutanten

Die heterozygoten und homozygoten *caplb5*-Mutanten der Stämme CAI4 und ATCC44808 wurden hinsichtlich Wachstum und Hyphenbildung *in vitro* phänotypisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Ura-positiven Mutanten PK3, PG9, PK3-11 und PG9-31 sowie die Mutanten KH44, KH44-13, KH44-9 und KH44-91 in verschiedenen Flüssigmedien (YPD, SD ohne Zugabe von Uridin oder Uracil, Lee's Medium, RPMI1640 und 10 % Serum) und auf entsprechenden Agarplatten (zusätzlich noch Spider-Medium) bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert. Im Vergleich zu den Ausgangsstämmen ATCC44808 und CAI4 bzw. dem für das *URA3*-Gen heterozygoten Stamm CAF2-1 (siehe Abb. 33 a) zeigten sich keine Unterschiede in der Wachstumsrate und Zellmorphologie. Da sich gezeigt hatte, dass *C. albicans* ATCC44808 im Vergleich zu anderen wildtypischen Stämmen auf Eigelb-SD-Platten eine ausgeprägte Präzipitatszone um die Kolonien

bildet (siehe Abb. 29 a und 29 b), was auf Abbau der Eigelbbestandteile durch Sekretion lipolytischer Enzyme beruht, wurden die *caplb5*-Mutanten auf ihre lipolytische Aktivität hin untersucht. Die isogenen hetero- und homozygoten *caplb5*-Mutanten des Stamms ATCC44808 zeigten jedoch keinen Unterschied zum Wildtyp in der Ausbildung von Koloniehöfen bei Wachstum auf Eigelb-haltigen Agarplatten (Sabouraud Dextrose Agar pH 4,3 und pH 6,8 sowie Lee's Medium) bei 30°C und 37°C.

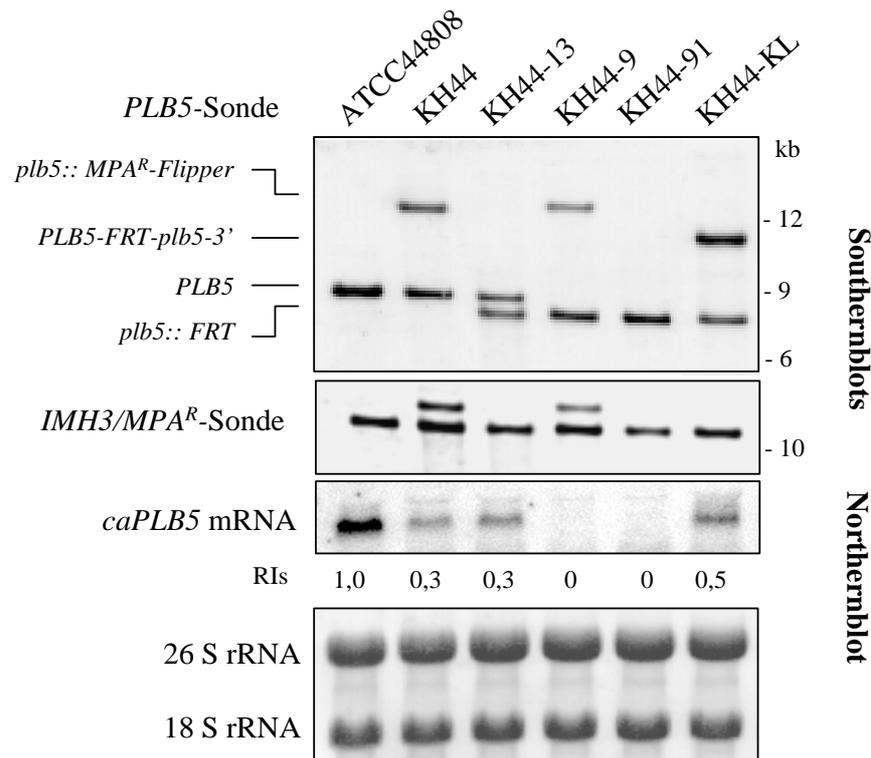


Abbildung 35: **Blotanalysen der *caPLB5*-Genmutagenese und *caplb5*-Komplementation im Stamm ATCC44808.** Southernblotanalyse: Die DNAs der Stämme ATCC44808, KH44 und KH44-9 (*MPA^R*-positiv), KH44-13 und KH44-91 (*MPA^R*-negativ) und KH44-KL (Revertante) wurden mit *ScaI* verdaut und mit der Sonde PLB5#4 und IMH3#2 hybridisiert. KH44-KL entstand durch Reintegration einer intakten *caPLB5^{LK}*-Genkopie in ein *ApIb5*-Allel im Stamm KH44-91 (siehe Kapitel V 3.4.3). Northernblotanalyse: Die Gesamt-RNAs wurden nach 2,5 h Wachstum der Zellen bei 37°C in Lee's Medium pH 6.8 isoliert. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde PLB5#4. Methylenblau-gefärbte rRNA-Banden dienten der Ladungskontrolle und zur Berechnung der relativen Signalintensitäten der *caPLB5*-mRNA-Banden.

3.4.2 Virulenzverhalten der *caplb5*-Mutantenstämme im i. v. Infektionsmodell

Phospholipasen tragen in verschiedenen pathogenen mikrobiellen Organismen zur Virulenzausbildung bei. Verschiedene Studien belegten auch bei *C. albicans* eine Korrelation zwischen Phospholipase-Sekretion und Virulenzverhalten (Übersicht in (102)). So konnte

interessanterweise eine Beteiligung von Phospholipase-B-Isoenzymen an der Virulenzausbildung von *C. albicans* bereits für die Phospholipase caPlb1p nachgewiesen werden, wobei im systemischen Mausmodell die Virulenz von *caplb1*-Nullmutanten stark abgeschwächt war (158).

In einem systemischen Infektionsmodell nach intravenöser Infektion sollten nun die in dieser Arbeit konstruierten *caplb5*-Deletionsmutanten auf ihre Virulenzeigenschaften hin untersucht werden. Zunächst wurden Balb/c-Mäuse über die Schwanzvene mit Ura⁺-Zellen der *caplb5*-Mutanten des Stamms CAI4 (heterozygote Mutanten PK3 und PG9 sowie Nullmutanten PK3-11 und PG9-31) infiziert. An den Tagen 3 und 4 nach Infektion wurden die Organe Leber, Hirn und Nieren entnommen, die Pilzzellen reisoliert und die CFU bestimmt. Abbildung 36 zeigt die logarithmierten CFU-Werte pro Organ der Tage 3 und 4 p. i. grafisch getrennt dargestellt. In beiden Versuchen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Pilzlast in allen drei untersuchten Organen nach Infektion mit der *caplb5*-Nullmutante PG9-31 ($p < 0,01$). In den Mäusen, die mit der dazu unabhängig hergestellten Nullmutante PK3-11 infiziert worden waren, nahm die Pilzlast nach drei Tagen p. i. im Vergleich zu den Stämmen SC5314 und CAF2-1 nur leicht und statistisch nicht signifikant ab. An Tag 4 p. i. zeigte sich jedoch auch hier, dass die Inaktivierung von caPlb5p einen signifikanten (bei $p < 0,05$) Einfluss nimmt auf die Fähigkeit von *C. albicans* im verwendeten systemischen Tiermodell in die Organe zu dissimulieren. Das ergibt sich messbar aus den CFU-Werten, aber auch vom Erscheinungsbild der Mäuse. Denn zum Zeitpunkt der Organentnahme am Tag 4 waren bei CAF2-1 drei Mäuse von fünf moribund, bei PK3-31 und PG9-11 jedoch null von fünf.

Zur Verifizierung der gewonnenen Daten wurden in einem weiteren i. v. Infektionsversuch die zu dem wildtypischen Stamm ATCC44808 isogenen *caplb5*-Mutanten eingesetzt. Je vier Mäuse wurden mit der heterozygoten Mutante KH44-13, der Nullmutante KH44-91 und dem Wildtyp infiziert. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich nach Infektion mit der *caplb5*-Nullmutante eine deutliche Abnahme ($p < 0,05$) der Pilzlast in den nach drei Tagen p. i. untersuchten Organen Leber, rechte Niere, linke Niere und Hirn (Abb. 37), wobei die heterozygote Mutante KH44-13 intermediäre CFU-Werte aufwies. Am meisten attenuiert verhielt sich der Stamm KH44-91 jedoch in der Leber mit einer prozentualen Abnahme der CFU-Werte um ca. 50 % im Vergleich zu den ATCC44808-Werten ($p < 0,01$).

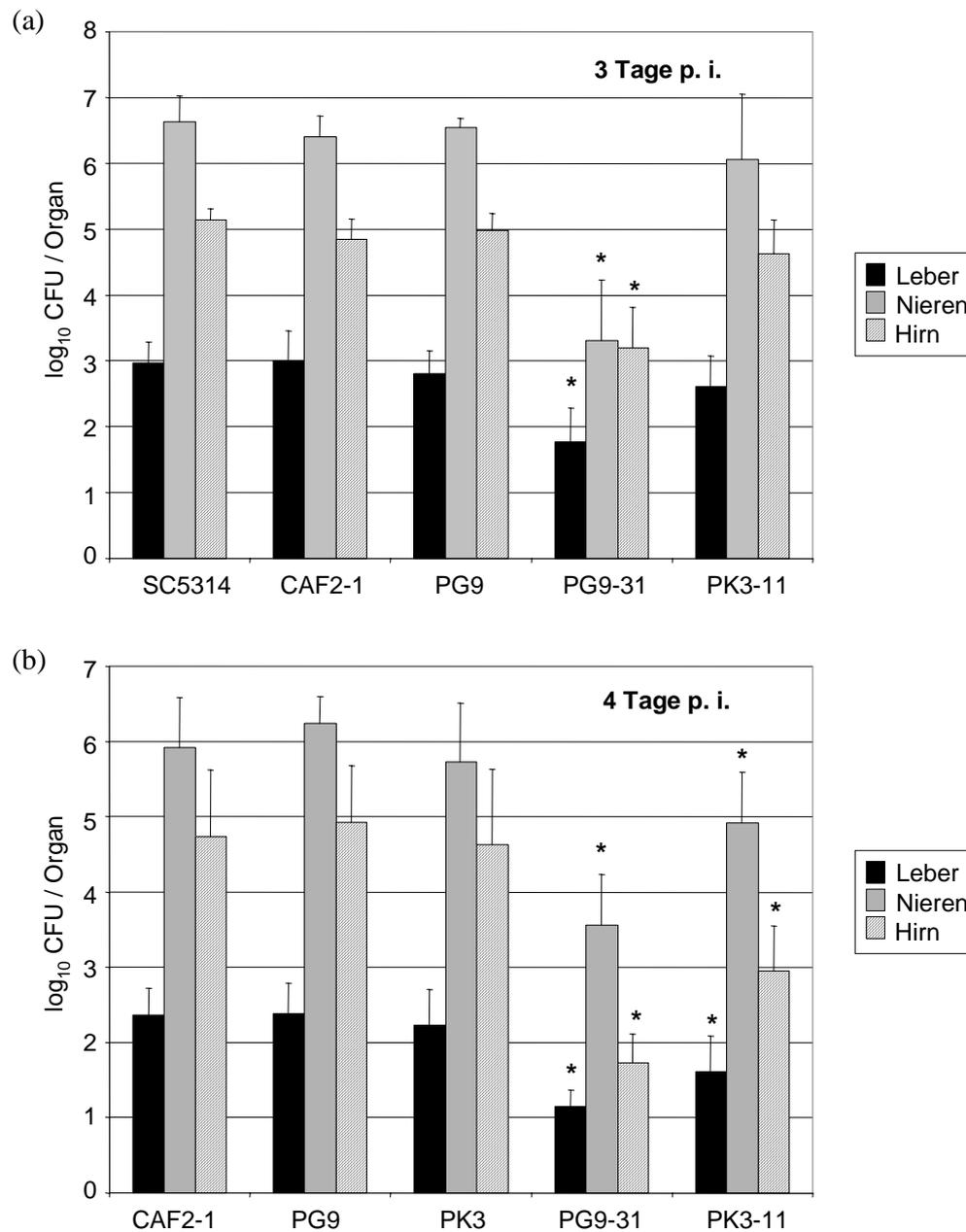


Abbildung 36: **Effekt der *caplb5*-Deletion im Stamm CAI4 auf die Virulenz nach i. v. Infektion.** Gruppen von Balb/c Mäusen wurden i. v. mit 3×10^5 Blastosporen in (a) bzw. $2,5 \times 10^5$ Blastosporen in (b) der Stämme CAF2-1, PG9, PG9-31 und PK3-11 (a und b) sowie zusätzlich der Stämme SC5314 (a) und PK3 (b) infiziert. Nach drei Tagen p. i. (a) und vier Tagen p. i. (b) wurden nach Entnahme, Homogenisieren und Ausplattieren der Organe Leber, Nieren und Hirn die CFU pro Organ bestimmt. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der \log_{10} CFU/Organ gemessen bei 4 (SC5314), 8 (CAF2-1), 6 (PG9), 11 (PG9-31) und 4 (PK3-11) Mäusen in (a) sowie bei je 5 Mäusen in (b). Die Signifikanz der ermittelten Werte wurde mittels Students t-test (einseitiger Test; zwei Stichproben, gleiche Varianz (homoskedastisch)) kalkuliert. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der CFU im Vergleich zu SC5314 (Tag 3 p. i.) und CAF2-1 (Tag 4 p. i.) wurden mit einem Stern markiert: PG9-31 (Tag 3 / Tag 4 p. i.): Leber $p = 0,0006 / 0,004$, Nieren $p = 8,5 \times 10^{-6} / 0,0002$, Hirn $p = 5,1 \times 10^{-5} / 0,0008$; PK3-11 (Tag 4 p. i.): Leber $p = 0,01$, Nieren $p = 0,02$, Hirn $p = 0,003$.

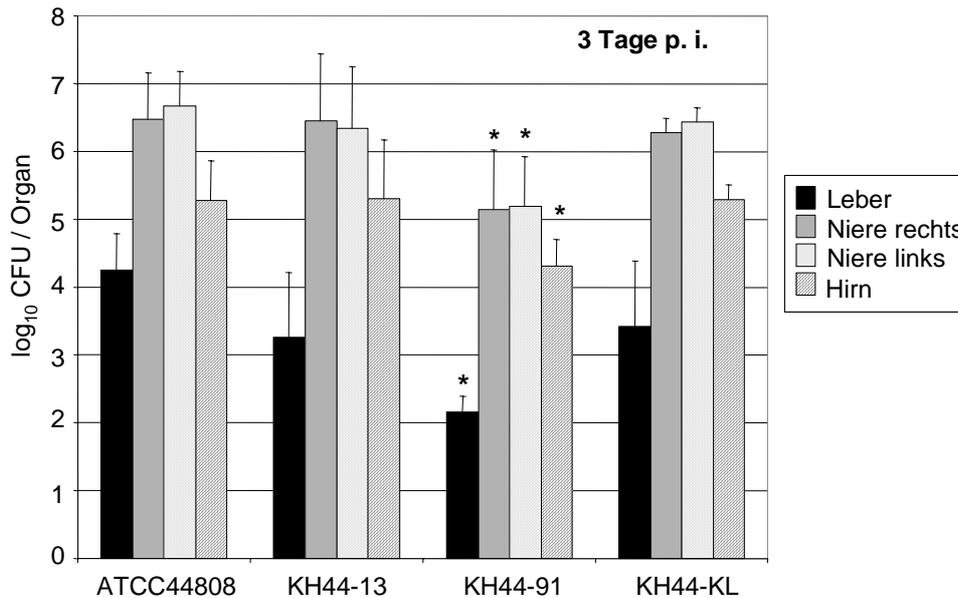


Abbildung 37: Effekt der *caplb5*-Deletion im Stamm ATCC44808 auf die Virulenz nach i. v. Infektion. Je vier Balb/c Mäusen wurden i. v. infiziert mit 4×10^5 Blastosporen des Wildtyps ATCC44808, des *caplb5^{LK}/caPLB5^{SN}*-heterozygoten Stammes KH44-13, der *caplb5^{LK}/caplb5^{SN}*-homozygoten Mutante KH44-91 sowie einer Komplementanten KH44-KL. KH44-KL entstand durch Reintegration einer intakten *caPLB5^{LK}*-Genkopie in ein *Δplb5*-Allel im Stamm KH44-91 (siehe Kapitel V 3.4.3). Nach drei Tagen p. i. wurden nach Entnahme, Homogenisieren und Ausplattieren der Organe Leber, Nieren (in diesem Versuch wurden die rechte und linke Niere getrennt behandelt) und Hirn die CFU pro Organ bestimmt. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der log₁₀ CFU/Organ. Die Signifikanz der ermittelten Werte wurde mittels Students t-test (einseitiger Test; zwei Stichproben, gleiche Varianz (homoskedastisch)) kalkuliert, wobei statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der CFU im Vergleich zu ATCC44808 mit einem Stern markiert wurden: KH44-91: Leber $p = 0,0004$, Niere rechts $p = 0,03$, Niere links $p = 0,01$, Hirn $p = 0,02$.

3.4.3 Komplementation des caPlb5p-negativen Phänotyps des Stammes KH44-91 nach intravenöser Infektion

Mit Hilfe des dominanten Selektionsmarkers *MPA^R* konnte die im *caPLB5*-Gen inaktivierte Mutante KH44-91 durch Reintegration einer intakten *caPLB5*-Genkopie in ein *caplb5*-Allel komplementiert werden. Abbildung 38 zeigt die Konstruktion der Komplementanten grafisch dargestellt. Damit sollte der Beweis erbracht werden, dass der im Tierinfektionsmodell beobachtete Phänotyp der *caplb5*-Mutanten aus dem Verlust der caPlb5p-Aktivität resultiert und nicht auf einen anderen unspezifischen Effekt beruht, der beispielsweise während der genetischen Manipulation hätte auftreten können.

Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des *MPA^R*-Flippers eine Komplementationskassette konstruiert, die das *caPLB5*-Gen inklusive Promotor- und Terminatorregion beinhaltet (siehe

Kapitel IV 7.4.9). Das *PLB5-MPA^R-Flipper-3'-PLB5*-Konstrukt wurde als lineares Fragment in Zellen des KH44-91 Stammes transformiert. Die Transformanten wurden mittels PCR auf die korrekte Rekombination der die Markerkassette flankierenden *caPLB5*-Gensequenzen mit Sequenzen eines *caplb5*-Allel untersucht. PCR-Amplifikate mit den Primern DTCTAG (bindet forward im C-terminalen *MPA^R*-Bereich) und AMPLI3 bestätigten im Transformant KH44-KI die korrekte genomische Integration des *MPA^R*-Flippers. Mit PLB2001 (bindet im deletierten *caPLB5*-Bereich) und AMPLI3 konnte zudem die Wiedereinbringung des wildtypischen *caPLB5*-Gens nachgewiesen werden. Die *MPA*-resistente Komplementante KH44-KI wurde zur FLP-vermittelten Entfernung des *MPA^R*-Flippers über Nacht in YCB-BSA-Medium inkubiert und auf Indikatorplatten auf erlangte *MPA*-sensitivität selektioniert. So konnte im Stamm KH44-KL mittels PCR und Southernblotanalysen (siehe Abb. 35) die Exzision des Selektionsmarkers nach Integration einer intakten Kopie von *caPLB5* bestätigt werden. Direkte Sequenzierungen des intakten Allels im *MPA*-sensitiven Komplementant KH44-KL, die im Anschluss an diese Arbeit von G. Köhler durchgeführt wurden, zeigten, dass die Sequenz des Allels L₅₇K₂₀₈ wieder hergestellt wurde. Auch ist eine *caPLB5*-Expression im *caPLB5^{LK}-FRT-3'caplb5-/caplb5^{LK}::FRT*-heterozygoten Stamm wieder detektierbar und nach Northernblotanalyse (Abb. 35) vergleichbar mit der der heterozygoten Mutantenstämme KH44-13 und KH44-9.

Die Komplementante KH44-KL wurde im systemischen Mausinfektionsmodell eingesetzt, das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt. Drei Tage nach i. v. Infektion wurden die CFU der Organe Leber, rechte und linke Niere sowie Hirn bestimmt. Verglichen mit der *caplb5*-Nullmutante KH44-91 zeigte sich in den Organen ein deutlicher Anstieg der Pilzlast, wobei CFU-Werte erreicht wurden, die denen nach Infektion mit der heterozygoten Mutante KH44-13 entsprachen. Somit konnte der beobachtete Mutantenphänotyp im i. v. Infektionsmodell durch Wiedereinbringung eines intakten *caPLB5*-Allels komplementiert werden.

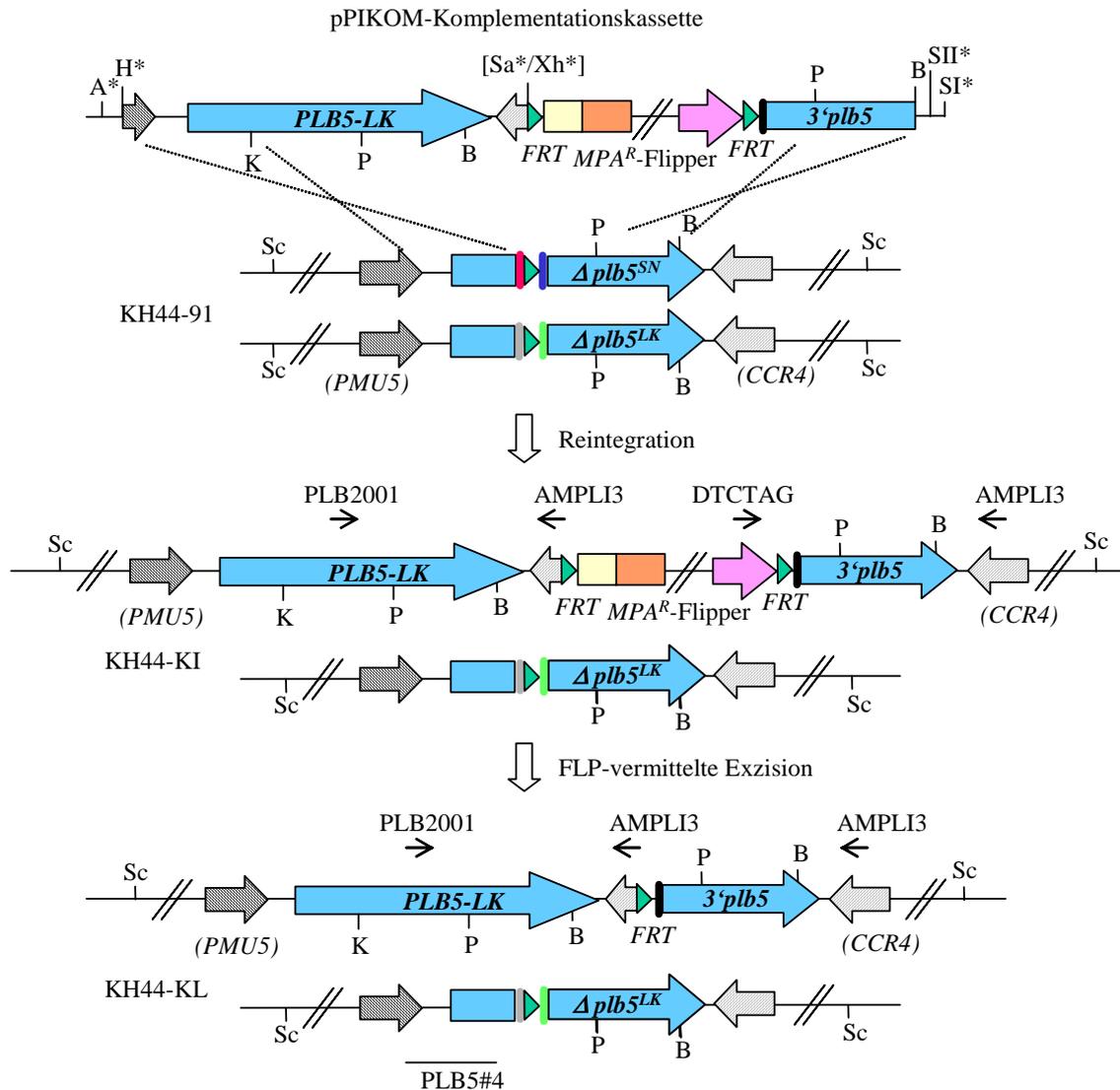


Abbildung 38: **Genomische Reintegration einer funktionalen *caPLB5*-Genkopie in den Stamm KH44-91.** Schematisch dargestellt ist die pPIKOMP-Komplementationskassette und ihre Integration in eines der beiden mutierten *caplb5*-Allele, wobei der Stamm KH44-KI (*caPLB5^{LK}-MPA^R-Flipper-3'plb5/Δplb5^{LK}::tag-FRT-tag*) entsteht. Nach Inkubation in YCB-BSA-Medium erfolgte die gezielte FLP-vermittelte Exzision des *MPA^R*-Flippers aus dem Genom. Der *MPA*-sensitive Stamm KH44-KL (*caPLB5^{LK}-FRT-3'plb5/Δplb5^{LK}::tag-FRT-tag*) verfügt demnach über eine intakte *caPLB5^{LK}*-Genkopie reintegriert an Position des *Δplb5^{SN}*-Allels. Angegeben sind folgende Schnittstellen: A (*Apa*I), B (*Bam*HI), H (*Hind*III), K (*Kpn*I), P (*Pst*I), SI (*Sac*I), SII (*Sac*II), Sa (*Sal*I), Sc (*Sca*I), Xh (*Xho*I), * (Primer- oder Vector-generiert). Die *caPLB5*-Rekonstitution wurde mittels PCR und den Primerpaaren [PLB2001 + AMPLI3] und [DTCTAG + AMPLI3] überprüft. PLB5#4 stellt den Fragmentabschnitt dar, der in den Southern- und Northernblot hybridisierungen (Abb. 35) als Sonde eingesetzt wurde.

VI DISKUSSION

1. Etablierung eines MPA-resistenten *caIMH3*-Allels (MPA^R) als dominanter Selektionsmarker zur Genmutagenese im wildtypischen Stamm

In der *Candida* Genetik wurden in den letzten Jahren auf molekularbiologischer Ebene große Fortschritte erzielt, die zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen in *C. albicans* geführt haben, die in die Expression virulenzassoziierter Eigenschaften involviert sind (Übersicht in (61)). Eine der meist genutzten Errungenschaften der vergangenen Jahre war die Möglichkeit Gene gezielt durch Integration einer sogenannten *URA3*-Blaster-Kassette inaktivieren zu können (87). Allerdings muss bei Nutzung dieser Mutagenesetechnik, die auf dem *caURA3*-Gen als Selektionsmarker beruht, auf Ura-auxotrophe *C. albicans*-Stämme zurückgegriffen werden. Eine genetische Manipulation von wildtypischen Isolaten mit besonderem Phänotyp, wie z. B. erhöhter Drogenresistenz (90), ist nur schwer möglich (61).

C. albicans zeigt sich resistent gegenüber vielen Substanzen, die häufig als Selektionshilfen in der molekularen Methodik eingesetzt werden. Allerdings ist die Sensitivität von *C. albicans* gegenüber Mykophenolsäure, einem spezifischen Inhibitor der IMP Dehydrogenase (89), schon seit längerem bekannt (218), was schließlich zur Nutzung dieses Enzym-Inhibitor-Systems in der genetischen Manipulation von *Candida* führte. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines von Köhler und Mitarbeitern isolierten, MPA-toleranten *IMH3*-Allels (MPA^R) als erster dominanter Selektionsmarker in *C. albicans*. Da ein weiteres Ziel dieser Arbeit die nähere Charakterisierung des MRP1 ähnlichen ABC-Transporters *caMLT1* war (vgl. Kapitel VI 2.), sollten mittels MPA^R -Marker *camlt1*-Deletionsmutanten mit ansonsten zum Wildtypstamm isogenen Hintergrund konstruiert werden. Zunächst gelang es das MPA^R -Gen als Einzelkopie in den *caMLT1*-Lokus eines wildtypischen, prototrophen *C. albicans* Isolats zu integrieren, wo es unabhängig von einer Genüberexpression MPA-Resistenz verlieh. So verlief die Selektion heterozygoter Mutanten, die nach Transformation einer MPA^R -Genkassette den Marker durch homologe Rekombination in ein *caMLT1*-Allel integriert hatten, erfolgreich, was die Nutzbarkeit dieses dominanten Selektionssystems für genetische Manipulationen in *C. albicans* bestätigte. Spätere Studien zeigten zudem den erfolgreichen Einsatz des MPA^R -Markers auch in nicht-*albicans* Arten, wie z. B. *C. dubliniensis* (266, 270, 271) und *C. tropicalis* (G. Köhler, persönliche Information). Kurioserweise verlieh ein anderes MPA-Resistenz verleihendes *caIMH3*-Allel, dessen Isolierung und Einsatz als

Deletionsmarker für ein einzelnes *caARG4*-Allel kürzlich beschrieben wurde (17), nicht ausreichend MPA-Resistenz für die Selektion in *C. dubliniensis*.

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits erwähnt, zeigten einige Transformanten nach Ausstrich auf MPA-haltigem Selektionsagar uneinheitliche Koloniegrößen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Mykophenolsäure sich störend auf die Zellteilung auswirkt. Dies kann zur Bildung sogenannter „Multi-Buds“ führen: knospende Zellen, deren Tochterzellen haften bleiben (218). Sollten Zellen ohne Selektionsmarker oder mit einer oder auch mehreren Kopien des *MPA^R*-Allels in einem solchen Zellgemisch vorkommen, dann führt das zur Entstehung von Mischkulturen aus MPA-resistenten und -sensitiven Zellen. Für die Selektion der Transformanten wurde deshalb eine möglichst geringe MPA-Konzentration von 10 µg/ml im Selektionsmedium zum Einsatz gebracht, mit anschließender Kontrolle der Klonreinheit auf 1 µg/ml MPA-haltiger Platten.

Das Einbringen einer zweiten *MPA^R*-Genkopie ins Genom von *C. albicans* führte nicht zu einer ausreichenden Erhöhung der MPA-Resistenz, um doppelt positive Transformanten selektionieren zu können. Die Selektion auf Agarplatten mit erhöhtem MPA-Gehalt führte dagegen zu einer vermehrten Bildung von Mischkolonien aus verschiedengradig MPA-resistenten Zellen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die erhöhte Menge an Mykophenolsäure sich verstärkt störend auf die Zellteilung auswirkt. Die Überprüfung einiger erhöht MPA-resistenter Klone bestätigte die Heterogenität der Zellkolonien, wobei in Southernblotanalysen die Bande des mutierten *caMLT1*-Allels (mit der *MPA^R*-Insertion) entweder wesentlich stärker war als die Bande des (noch vorhandenen) wildtypischen Allels oder im Analysegele höher lief als erwartet (Daten nicht gezeigt). Als Ursache für das Auftreten des erhöhten Resistenzphänotyps lassen sich demzufolge Mischkolonien vermuten, bestehend aus heterozygoten und homozygoten *camlt1*-Mutantenzellen, oder auch Mehrfachinsertionen der Transformationskassette bzw. *MPA^R*-Genamplifikationen. Der Stress dem *C. albicans* durch den Wachstumsinhibitor MPA ausgesetzt ist, könnte auch einen Effekt auf die Kopienzahl der Chromosomen haben und z. B. zu Chromosomenverdopplung bzw. -verlust führen (46). Dies könnte auch die Entstehung von Mischkolonien erklären und die unterschiedlichen *caMLT1*-Bandenintensitäten im Southernblot mancher heterozygoter *C. albicans* Zellen.

Eine Selektion homozygoter *caMLT1*-Mutanten, die nach erfolgter zweiter Transformation den *MPA^R*-Marker in das bislang noch wildtypische *caMLT1*-Allel integriert hätten, war so nicht möglich. Für die Inaktivierung des zweiten Allels wären zwei Möglichkeiten denkbar: So müsste entweder ein zweiter dominanter Selektionsmarker gefunden werden oder der Marker aus dem

ersten inaktivierten Allel, vor dessen Integration in das zweite Allel, wieder entfernt werden. Um letzteres umzusetzen wurde in dieser Arbeit der sogenannte *MPA^R*-Blaster konstruiert und im wildtypischen Stamm für die gezielte Inaktivierung des *caMLT1*-Gens zu dessen funktionaler Charakterisierung genutzt. Dieses Mutagenesesystem funktioniert nach dem selben Prinzip wie der bekannte *URA3*-Blaster, der für die Mutagenese Ura-negativer Stämme entwickelt wurde (87). Nach erfolgreicher Integration ins Zielgen konnte der *MPA^R*-Marker wieder aus dem Genom durch spontane intrachromosomale Rekombination der flankierenden *hisG*-Sequenzwiederholungen entfernt werden. Dies hatte nicht nur den Vorteil, dass beide Allele des *caMLT1*-Gens inaktiviert werden konnten, sondern auch, dass der Marker wieder vollständig aus dem Genom der konstruierten Deletionsmutanten entfernt werden konnte. Durch wiederholten Einsatz des *MPA^R*-Gens als Selektionsmarker war so die Komplementation einer *MPA*-sensitiven *camlt1*-Nullmutante mit einer funktionalen *caMLT1*-Kopie möglich. Auch unterschieden sich die finalen Mutanten vom prototrophen Wildtyp nur durch das inaktivierte Gen. Unerwünschte Effekte, die nicht auf das zu untersuchende Gen zurückzuführen sind, sondern möglicherweise auf die Anwesenheit eines heterologen Gens bzw. eines wildtypischen Gens, das an heterologer Stelle im *C. albicans* Genom plaziert wurde (wie z. B. *URA3*), können so ausgeschlossen werden. So könnte sich z. B. die Anwesenheit einer zusätzlichen *caIMH3*-Genkopie nach genomischer Integration des *MPA^R*-Markers auf das Wachstum der *C.-albicans*-Zellen auswirken. Unterschiede in der IMP Dehydrogenase Enzymmenge und/oder Enzymaktivität könnten für die *in vivo* Fitness einzelner Stämme von Bedeutung sein. Zu welchem Grad die IMP-Dehydrogenase wichtig ist für das Überleben von *C. albicans* im Wirt ist noch unklar. Zwar kann durch Aufnahme von Guanosin-Nukleotidvorläufern (z. B. Guanin) in die Zelle und dessen Umwandlung zu GMP über den „salvage pathway“, die Oxidation von IMP zu XMP durch die IMP Dehydrogenase umgangen werden (130), dennoch besteht die Frage, ob derartige Nukleinsäurebausteine in ausreichender Menge für ein optimales Wachstum im Wirt vorhanden sind. Inwieweit sich das wildtypische *caImh3p*-Protein und das in einer Aminosäure mutierte, *MPA*-resistente Genprodukt in ihrer enzymatischen Funktion unterscheiden wird derzeit biochemisch untersucht. Auch die Ursache für die erhöhte *MPA*-Resistenz des *MPA^R*-Gens ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen (G. Köhler, persönliche Mitteilung). Interessanterweise hatte die Anwesenheit des *MPA^R*-Allels, zusätzlich zu den beiden wildtypischen *IMH3*-Allelen, als Reportergen in *in vivo* Expressionsstudien keinen Einfluss auf die Organ-Invasivität der untersuchten Stämme (269). Auxotrophe Stämme, wie der als Ausgangsstamm zur Inaktivierung von Zielgenen oft genutzte CAI4-Stamm, sind häufig in ihrer Virulenz abgeschwächt. Als valide isogene Kontrolle *in vivo* können sie nicht ohne Vorbehalt genutzt werden. Dies belegen auch Untersuchungen über

Positionseffekte der *URA3*-Expression (153) und die Entdeckung des Defekts im *IRO1*-Gen im Stamm CAI4 (98). *IRO1* kodiert einen putativen Transkriptionsfaktor, der in den Eisenmetabolismus involviert ist. Das *IRO1*-Gen grenzt direkt an den *URA3*-Lokus an und wurde im *URA3*-Mutageneseprozess mit beschädigt. Um einen derart ungewollten Sekundäreffekt im Vorfeld zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit zur Inaktivierung von *caMLT1* nur ein Teil der Sequenz deletiert. Angrenzende ORFs blieben so unbeschädigt, wie die vom *caMLT1*-Gen nur 108 Basenpaare entfernte Endonuklease, die auf dem DNA-Gegenstrang lokalisiert ist und sich mit *caMLT1* dieselbe Terminatorregion teilt.

Ein anderes *MPA^R/MPA*-Selektionssystem zur Gendisruption in prototrophen *C. albicans* Isolaten basiert auf der „Flipper“-Strategie und wurde von Wirsching und Mitarbeitern entwickelt (312). Zur funktionalen Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten neuen Phospholipase B von *C. albicans*, *caPLB5* (vgl. Kapitel VI 3.), wurde der *MPA^R*-Flipper freundlicherweise für die Geninaktivierung zur Verfügung gestellt. Das *MPA^R*-Flippersystem beruht darauf, dass sich nach erfolgreicher Integration der Disruptionskassette ins Zielgen eine Sequenz-spezifische FLP-Rekombinase, die unter Kontrolle des *caSAP2*-Promotors gesetzt wurde, für die Exzision des *MPA^R*-Markers aus dem Genom induzieren lässt. Im Vergleich zur Blaster-Strategie, bei der die Rekombination der *hisG*-Sequenzwiederholungen spontan mit einer geringen Frequenz von $\sim 10^5/10^6$ verläuft (87), ist die Wiedergewinnung des Markers bei der Flipper-Strategie sehr viel effizienter (184). Dennoch kann der *MPA^R*-Blaster als Alternative zum *MPA^R*-Flipper verwendet werden, z. B. in Situationen in denen die FLP-basierte Exzision des Markers nicht anwendbar ist. Vorstellbar wäre z. B., dass die Bedingungen für die Funktionalität des Flippers (saurer pH, nur Proteine/Peptide als N-Quelle) nicht eingehalten werden können oder dass das SAP2P-FLP-Flippersystem in dem Zielstamm bereits für andere Zwecke zum Einsatz kommt.

Die hier durchgeführten Inaktivierungen der beiden Gene *caMLT1* und *caPLB5* machen die Verwendbarkeit des *MPA^R*-Gens als dominanter Selektionsmarker zur Konstruktion von Mutantenstämmen, die ansonsten über denselben genetischen Hintergrund verfügen wie der virulente Wildtypstamm, deutlich. Das *MPA^R*-Gen zeichnet sich dadurch aus, dass es in vielen, wenn nicht allen, *C. albicans* Isolaten (275, 311) und auch nicht *albicans* Isolaten (270, 271), die sich sensitiv gegenüber Mykophenolsäure zeigen als Selektionsmarker für Transformation (311) und Genmutagenese (285, 312) oder als Reporter gen (269) genutzt werden kann. Spontanresistenzen gegen MPA treten dabei mit einer nur sehr geringen Frequenz auf ($\sim 10^{-7}$ (141)).

2. Strukturelle Charakterisierung des caMlt1p-Transporters und funktionale Analyse *in vitro* und im Infektionsmodell

ATP-abhängige Transportsysteme sind in pro- und eukaryotischen Organismen weit verbreitet. Als membranständige Pumpen sind sie vor allem in den Entgiftungsprozess von Zellen involviert (119). Auch in Pilzzellen lassen sich ATP-abhängige Transportproteine finden, die z. B. für den zellulären Export oder die vakuolare Sequestrierung unterschiedlicher Verbindungen (Speicherstoffe und toxischer Substanzen) verantwortlich sind. Als Beispiel seien genannt SNQ2p und Pdr5p in *S. cerevisiae* sowie AtrA-Dp in *Aspergillus nidulans*, die als plasmamembranständige Effluxpumpen in die Ausbildung der Multidrogenresistenz (MDR) involviert sind; oder Ycf1p, Bat1p und Bpt1p in *S. cerevisiae*, die durch Transport cytotoxischer Verbindungen in die Vakuole das Zellcytoplasma entgiften (315). In der Therapie von humanen Pilzinfektionen mit *C. albicans* erlangten die zueinander hoch homologen CDR-Transporter großes klinisches Interesse, da wenigstens für die gut untersuchten Proteine caCdr1p und caCdr2p eine wichtige Rolle in der Resistenzausbildung gegenüber Azol-Antimykotika gezeigt werden konnte (213, 240, 241). So war die nähere Charakterisierung des von Köhler und Mitarbeitern identifizierten caMlt1-Transportproteins von großem Interesse.

Strukturelle Analyse der caMLT1-Gensequenzdaten

Nach Isolierung eines caMLT1-DNA-Fragments aus einer Phagen-Expressionsbibliothek gelang es durch Überprüfung einer genomischen *C. albicans* Fosmidgenbank das umfassende caMLT1-Gen mit angrenzenden Bereichen zu isolieren und dessen Gensequenz vollständig zu bestimmen. Die Analyse der Sequenzdaten ergab eine hohe Ähnlichkeit des caMlt1-Proteins zu den Hefen-Transportern scYcf1p und scBpt1p sowie zu dem humanen Transporter MRP1. Diese Proteine zählen zu den MRP/CFTR-ähnlichen Transportern der ABC-Transportersuperfamilie (16, 64, 283). Die Mitglieder dieser Untergruppe zeichnen sich durch eine hohe Aminosäuresequenzidentität und gemeinsame strukturelle Eigenschaften aus, die auch caMlt1p aufweist. In *C. albicans* wurden bislang insbesondere die CDR-Proteine Cdr1-4p detailliert untersucht, die als Mitglieder der Pdr5-Unterfamilie eine charakteristische (NBF-TMD_n)₂-Topologie besitzen. Der identifizierte caMlt1p-Transporter stellt somit mit einer reversen (TMD_n-NBF)₂-Topologie den ersten ABC-Transporter der MRP/CFTR-Klasse in diesem Hefepilz dar. Mit Hilfe computergestützter Analysen und Sequenzvergleiche mit homologen ABC-Transportern lassen sich in der Proteinsequenz von caMlt1p eine asymmetrische Anordnung von 12 - 13 möglichen Transmembranhelizes vorhersagen, von denen acht bis neun in der ersten Proteinhälfte und vier in der zweiten Hälfte zu finden sind. Die tatsächliche caMlt1p-Topologie ist allerdings nur in weiteren experimentellen

Studien bestimmbar. Wie Vergleiche mit der scYcf1p-Sequenz aufzeigten, verfügt auch caMlt1p über eine extra aminoternale Domäne (TMD₀-Region), die die ersten drei bis vier α -helikalen Transmembransegmente umfasst und bei anderen Mitgliedern der MRP/CFTR-Klasse, wie z. B. huMRP1-3 und huMRP6 ebenfalls anzutreffen ist (29, 294). Welche Funktion diesen zusätzlichen putativ membrandurchspannenden Segmenten zukommt ist letztlich noch nicht geklärt. Mutagenesestudien an huMRP1 und scYCF1 zeigten, dass die TMD₀-Region nicht für eine korrekte Proteinlokalisierung benötigt wird (12, 303), jedoch vermutlich eine Funktion im Transport bestimmter Substanzen erfüllt. Andere MRP-ähnliche ABC-Transporter, wie z. B. der humane Chloridionenkanal CFTR, oder Mitglieder anderer ABC-Unterfamilien, wie z. B. die PDR-ähnlichen Transporter scPdr5p, caCDR1p und caCDR2p, weisen keinen verlängerten hydrophoben N-terminalen Bereich auf.

Eine weitere strukturelle Eigenschaft von caMlt1p, die dieser Transporter mit caYcf1p, CFTR und einigen anderen MRP/CFTR-ähnlichen Transportern gemeinsam hat, ist die Anwesenheit einer sogenannten regulatorischen (R) Domäne (siehe Abb. 9, Kapitel V 2.1.4). Diese stark geladene cytoplasmatische Domäne wurde zuerst für CFTR beschrieben, wo ihre Funktion in der Aktivierung der Kanalaktivität liegt. Dabei erfolgt durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A eine Phosphorylierung von vier Serinresten innerhalb der R-Domäne, was die Bindung von ATP an die beiden NBDs ermöglicht. Die anschließende Spaltung von ATP führt schließlich zur Öffnung des Chloridionenkanals (93). Ebenso wie bei scYcf1p beinhaltet die in ihrer Aminosäuresequenz nur wenig homologe R-Domäne von caMlt1p eine konservierte PKA-Phosphorylierungsstelle (RRAS, AS-Pos. 973 - 976), deren Mutation im scYcf1-Protein zum Verlust der Cadmiumresistenz der Hefezelle führt (282). Ob dieser Bereich allerdings auch im *C. albicans* Transporter caMlt1p eine regulatorische Funktion besitzt ist nicht bekannt.

Untersuchungen zur Funktionalität von caMlt1p und Analyse potentieller Regulationsmechanismen

Durch genomische Markierung mit dem fluoreszierenden Protein GFP konnte caMlt1p als vakuolarer ABC-Transporter identifiziert werden, dessen Colokalisation mit der Vakuolenmembran in Hefe- wie in Hyphenzellen in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich wurde. Transporter in *S. cerevisiae*, die die höchsten Ähnlichkeiten zu caMlt1p aufweisen, wie scYcf1p, scBpt1p und scBat1p, sind ebenfalls in der Vakuolenmembran lokalisiert (160, 205, 206). Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass die Fusion von Proteinen mit GFP zu einer vakuolaren Fehllokalisierung führen kann, wie eine Studie von Kunze und Mitarbeitern zeigte (150). Im Gegensatz zu einer NH₂-terminalen Fusion, wie sie in der benannten Studie vorlag, wurde hier

das caMlt1-Protein COOH-terminal mit GFP fusioniert. Ein normalerweise NH₂-terminal gelegenes, vakuolares Proteinlokalisierungssignal (138, 175) bleibt so unbeeinflusst. Auch zeigten andere Studien bereits den Erfolg einer C-terminalen GFP-Fusionierung mit ABC-Transportproteinen. So entstanden mit dem Hefetransporter scPdr12p und dem humanen Transporter ABCA1 funktional aktive GFP-Fusionsproteine, wobei scPdr12p in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* Zellen (212) und ABCA1 an der Zelloberfläche von HeLa-Zellen sowie auf intrazellulären Vesikeln (193) lokalisiert werden konnte.

Interessanterweise ist auch das wachstumsphasenabhängige *caMLT1*-Transkriptionsprofil typisch für ein vakuolar lokalisiertes Protein. So variiert die mRNA-Expression vieler vakuolarer Hydrolasen der Bäckerhefe, wie z. B. Aminopeptidase I und Proteinase B, mit dem Wachstumsstadium und dem Nährstoffangebot (138). Bei Wachstum auf reichhaltigem Medium werden diese Enzyme induziert, wenn der Glucosespiegel abnimmt (*Diauxic-Transition*) und erreichen ihre maximale Expression, ähnlich wie *caMLT1*, bevor die Zelle in die stationäre Wachstumsphase übergeht. Ob die Transkription des *caMLT1*-Gens während des Wachstums auf reichhaltigem Medium unter dem Einfluss der Katabolitrepression steht oder durch eine generelle Stressantwort während des *Diauxic-Shifts* induziert wird ist bislang unklar. In der putativen Promotorregion von *caMLT1* sind mehrere potentielle Module vorhanden, die eine Genregulation durch multiple Faktoren vermuten lassen (siehe unten). Interessanterweise zeigten sich in einer Studie, die sich mit der Expression der plasmamembranständigen CDR-Transporter in *C. albicans* befasste, die Gene *caCDR1*, *caCDR2* und *caCDR4* während des Wachstums von der frühen logarithmischen Phase bis hin zur stationären Phase unterschiedlich exprimiert (168). Dabei wurde nur das *caCDR1*-Transkript durchgehend detektiert, wobei im Unterschied zu *caMLT1* keine Erhöhung des Transkriptionsniveaus während des *Diauxic-Shifts* auftrat.

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* erfolgt die Energiegewinnung während des exponentiellen Wachstums im reichhaltigen Medium (wie z. B. YPD) vorwiegend durch Fermentation. Die Abnahme an Nährstoffen im Medium, wie z. B. ein Mangel an fermentierbarem Zucker wie Glucose während des *Diauxic-Shifts*, führt zu einer Reorganisation des zellulären Metabolismus der Hefe (306). Die Pilzzelle wechselt zu einem rein oxidativen Metabolismus während der *Post-Diauxic*-Phase und das Wachstum verlangsamt sich. Dabei kann es durch die Bildung von reaktivem Sauerstoff zur Entstehung von toxischen Produkten kommen. Es wäre denkbar, dass in *C. albicans* caMlt1p eine mögliche Rolle in der Beseitigung dieser toxischen Metabolite spielen könnte. So werden in der Hefe während des *Diauxic-Shifts* insbesondere Gene aktiviert, die unter Glucoserepression stehen oder Stress-induziert sind und für das Überleben der Zelle sorgen (31,

306). Die Anwesenheit eines generellen Stress beantwortenden Promotorelements (STRE) mit der Consensuskernsequenz 5'-CCCCT-3' in der putativen Promotorregion von *caMLT1* deutet auf eine Regulation durch möglicherweise verschiedene Stressfaktoren hin, wie z. B. Hitze, niedriger pH-Wert, oxidativer und osmotischer Stress oder Nährstoffmangel (173, 251). Boy-Marcotte und Mitarbeiter konnten durch Herstellung eines STRE-lacZ-Reportergens und Messung der β -Galaktosidaseaktivität während der verschiedenen Wachstumsphasen zeigen, dass STRE auch während der *Diauxic-Transition* aktiviert wird (30). Interessanterweise wurden auch in *C. albicans* STRE-Promotorelemente in stressregulierten Genen gefunden, wie z. B. in *caHSP12* und *caCTA1* (dem wahrscheinlichen Homolog der cytoplasmatischen Katalase T, *scCTT1*). Eine generelle Stressantwort, wie sie in *S. cerevisiae* für eine Kreuzresistenz der Zelle gegenüber verschiedenen Stressfaktoren sorgt, scheint in *C. albicans* allerdings kaum vorzukommen (79). Dennoch könnte die detektierte Erhöhung des *caMLT1*-mRNA-Spiegels während des Übergangs von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase auf einer STRE-vermittelten Aktivierung der Transkription durch einen Stressfaktor, wie z. B. oxidativen Stress, basieren. Gerade oxidativer Stress könnte ein häufiger Stressauslöser im natürlichen Habitat von *C. albicans*, dem menschlichen Wirt sein, z. B. bei Attacke durch neutrophile Granulozyten oder Makrophagen.

In der putativen Promotorregion von *caMLT1* befinden sich zusätzlich zu STRE noch zwei weitere Promotormodule, die ebenfalls für eine Aktivierung der *caMLT1*-Transkription während des Diauxic-Shifts sorgen könnten. Glucosehunger und der dadurch verursachte Mangel an Aminosäuren und Purinen könnten zur Aktivierung zweier GCN4-bindender Consensuskernsequenzen (5'-TGACTC-3') führen (10), wohingegen eine transkriptionelle Regulation auch denkbar wäre über mehrere GATA-Einheiten in Antwort auf die Stickstoff-Verfügbarkeit. So werden in *S. cerevisiae* intrazelluläre Proteine unter speziellen Umständen, wie z. B. bei Eintritt in die stationäre Phase oder bei Sporulation, einem schnellen Abbau unterzogen um so der Zelle eine N-Quelle zur Verfügung zu stellen. Viele vakuolare Proteasegene sind sensitiv gegenüber der Nitrogen-Katabolit-Repression und werden durch *trans*-aktive Faktoren der GATA-bindenden Proteinfamilie reguliert (51). GCN4 ist ein gut untersuchtes bZIP-Domänen-Bindeprotein, das zur Familie der AP-1 ähnlichen Transkriptionsfaktoren zählt. In *S. cerevisiae* greift *scGcn4p* regulierend in die Expression von über 1000 Genen ein, die vor allem in die Aminosäure- und Purinbiosynthese involviert sind aber auch für z. B. Proteinkinasen und Membrantransporter kodieren (190). In *C. albicans* konnte ein zu *scGcn4p* funktionales Homolog identifiziert werden, das als globaler Regulator in die Koordination von Aminosäurebiosynthesegenen involviert ist und unter Aminosäuremangel die Transkription von Zielgenen über 5'-TGACTC-3' induzieren kann (289).

Weiterführende Experimente, wie z. B. die gezielte Mutagenese von *caMLT1*-Promotorelementen in Kombination mit Reporterfusionen, könnten zeigen, ob die identifizierten *cis*-regulatorischen Einheiten tatsächlich aktiv sind und Gen-regulatorische Funktionen während der verschiedenen Wachstumsphasen oder unter bestimmten Stress-Situationen ausüben. Auch können neben einer Induktion der Transkription durch *trans*-aktive Faktoren andere Mechanismen für die Erhöhung des *caMLT1*-mRNA-Spiegels verantwortlich sein, wie z. B. die Erhöhung der mRNA-Halbwertszeit. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen ob die Erhöhung der mRNA-Menge von *caMLT1* auch tatsächlich zu einer erhöhten Proteinexpression führen.

Ein Beispiel für einen ABC-Transporter, der stressinduzierbar ist und zum Überleben der Zelle unter Stress beiträgt ist der vakuolare Glutathion-S-Konjugat-Transporter *scYcf1p*. Bei Untersuchungen zur *in vitro* Induzierbarkeit der *caMLT1*-Expression zeigte sich bei Anwesenheit von CDNB und Cadmium, beides *scYcf1p*-spezifische Substrate, eine Erhöhung der *caMLT1*-Transkriptmenge um das etwa zweieinhalbfache (CDNB) und vierfache (Cd^{2+}). Ähnliche Werte wurden auch für die Deregulation der *scYCF1*-spezifischen mRNA beschrieben (Cd^{2+} : 1,9fach, CDNB: 2,5fach; (159)). Die durch Cadmium vermittelte transkriptionelle Aktivierung der *scYCF1*-Expression verläuft über den bZIP-Transkriptionsfaktor *scYap1p* (304). *ScYap1p* zählt, ebenso wie *GCN4p*, zur Familie der AP1-ähnlichen Transkriptionsfaktoren und ist in die Toleranz gegenüber oxidativem Stress ebenso wie in die pleiotrope Drogenresistenz involviert. Eine toxinvermittelte Aktivierung der *caMLT1*-Transkription durch *caCap1p*, dem funktionalen Homolog von *scYap1p* (2) wäre denkbar. Allerdings konnte keine *caCap1p*-typische Kernbindungssequenz (5'-TTACTAA-3') im sequenzierten *caMLT1*-Promotor gefunden werden. Die toxinvermittelte *caMLT1*-Genaktivierung könnte dennoch durch *scYap1p*-ähnliche Faktoren erfolgen und zwar durch Bindung an STRE oder an AP-1-Promotorelemente, die von der klassischen YAP1/CAP1-Erkennungssequenz abweichen. Zum einen zeigt sich in *S. cerevisiae* *scYap1p* für die Expression einiger stressregulierter Gene über STRE verantwortlich (171). Zum anderen sind *scYap1-8p* und *GCN4p* *in vitro* in der Lage dieselben AP-1 Bindungssequenzen, zentriert um die Konsensussequenz 5'-TTAG/CTA/CA-3', zu erkennen, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (288). Untersuchungen des *caCDRI* Promotors lassen vermuten, dass das in einer Base zur YAP1/CAP1-Bindungssequenz abweichende AP-1-Modul in die Induktion des Transporters durch Miconazol involviert ist (216).

Ist caMlt1p das funktionale Homolog zu scYcf1p?

Die hohe Ähnlichkeit der beiden Transporter caMlt1p und scYcf1p in Primärsequenz und *in silico* vorausgesagter Sekundärstruktur, ihre Lokalisation im selben Zellkompartiment sowie ihre Induzierbarkeit durch die GSH-konjugierbaren Substrate Cadmium und CDNB legen die Vermutung nahe, dass es sich um funktional homologe Transportproteine handeln könnte. Weiterführende Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sprechen jedoch gegen diese Annahme. So konnte die mangelnde Resistenz gegenüber Cadmiumionen einer *scycf1*-negativen *S. cerevisiae*-Mutante durch Einbringung einer intakten, plasmidkodierten *caMLT1*-Genkopie nicht komplementiert werden. Auch zeigten *camlt1*-negative *C. albicans* Mutanten keinen hypersensitiven Phänotyp gegenüber steigenden Cadmium- oder CDNB-Konzentrationen, wie es bei *scycf1*-Mutanten in *S. cerevisiae* der Fall ist (160, 282). CaMlt1p erscheint demnach nicht in den primären Detoxifikationsmechanismus dieser Toxine in *C. albicans* involviert. Im Cytoplasma können freie Schwermetallionen den Zellstoffwechsel schwer schädigen, wobei es vor allem durch Blockierung von Thiol-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Imidazol- und anderen funktionellen Gruppen in Enzymen und durch Austausch essentieller Cofaktoren, wie z. B. Zn^{2+} , zum Funktionsverlust vieler Proteine kommt (4). Substanzen, wie CDNB, die mit SH-Gruppen reagieren, können Cysteinreste in Proteinen oder Glutathion blockieren und dadurch Enzymreaktionen beeinflussen. Das Abfangen von Glutathion oder die Schädigung antioxidativer Enzyme könnte dazu führen, dass die Zelle in oxidativen Stress gerät (45, 302). Der durch die toxischen Substanzen Cadmium oder CDNB hervorgerufene generelle Stress könnte demnach die eigentliche Ursache für die erhöhte *caMLT1*-mRNA-Expression sein. Dass caMlt1p möglicherweise eine geringe Substrataffinität zu Cadmium und CDNB besitzt kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, zumal eine leichte Wachstumsverzögerung bei einer subinhibitorischen Konzentration von 80 μ M CDNB bei der *camlt1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde. Ein weiterer, bislang nicht charakterisierter und zu *scYCF1* homologer Transporter könnte in den *camlt1*-Nullmutanten einen, wenn auch geringen, Transportdefekt überdecken. Tatsächlich ergaben BLAST-Datenbankrecherchen die Anwesenheit zwei weiterer ORFs im Genom von *C. albicans*, die für putative ABC-Transporter mit hoher Ähnlichkeit zu caMlt1p kodieren. Expressions- und Mutagenesestudien dieser Proteine könnten Aufschluss über ihre funktionalen Fähigkeiten geben, zumal sie aufgrund ihrer Proteinstruktur eine höhere Verwandtschaft zu den *S. cerevisiae* Transportern scYcf1p und scBpt1p aufweisen, als zu caMlt1p.

Ein weiteres Indiz dafür, dass caMlt1p kein Ortholog zu scYcf1p ist, zeigten Komplementationsversuche, die von A. Bachhawat und Mitarbeitern durchgeführt wurden: Sie

transformierten eine *caMLT1*-Genkopie auf einem *High-Copy*-Vector in einen *ade2*-negativen *S. cerevisiae* Stamm und in eine *ade2/scycf1*-Doppelmutante. Mutanten im Adenin-Biosyntheseweg (*ade1* und *ade2* in *S. cerevisiae*) akkumulieren ein intensives, rotes Pigment in ihren Vakuolen bei Wachstum unter Adenin-limitierten Bedingungen. Studien zeigten, dass der *ade*-Pigmentvorläufer als Glutathionkonjugat hauptsächlich durch den GS-Transporter scYcf1p in die Vakuole gelangt (42). Dort nimmt er vermutlich durch die saure, oxidativ wirkende Umgebung und/oder durch Reaktion mit anderen vakuolaren Inhaltsstoffen, die charakteristische rote Farbe an. Nach Mutagenese des scYcf1p-Transporters nimmt die Pigmentierung der Vakuole um 80 - 90 % ab. Die erwartete Komplementation dieses Effekts, durch Einbringung einer intakten *caMLT1*-Genkopie in die *scycf1*-Mutante, blieb jedoch aus. Im Gegenteil – die schon stark reduzierte Rotfärbung der Vakuole nahm weiter ab (persönliche Information von A. Bachhawat); ein Effekt, der sich im Experiment mit dem *ade2*-negativen aber scYcf1p-wildtypischen Stamm bestätigte. Auch hier zeigte sich eine leichte Verminderung der roten *ade*-Pigmentbildung nach Einbringung des *caMLT1*-tragenden Vektors, wobei die Ursache dafür bislang unklar ist. Denkbar wäre, dass die Anwesenheit von caMlt1p den vakuolaren Transport der Substanzen, die zur Pigmentbildung beitragen, stört oder andere Substrate transportiert, die einen abschwächenden Effekt auf die Pigmentbildung ausüben. Hierbei muss allerdings auch in Betracht gezogen werden, dass es durch Überexpression von caMlt1p zu einer Fehllokalisierung innerhalb der *S. cerevisiae* Zelle kommen kann, wodurch z. B. ein Export des *ade*-Pigmentvorläufers über die Plasmamembran erfolgen könnte. Bei Überexpression des scYcf1-Proteins in *S. cerevisiae* Zellen zeigten jedoch indirekte Immunofluoreszenz-Aufnahmen eine Lokalisation dieses Transporters ausschließlich in der vakuolaren Membran (303).

Experimente zur Identifikation von Substraten, die durch caMlt1p transportiert werden

Die Pilzvakuole stellt ein Zellkompartiment dar, das neben hydrolytischen und Protein-degradierenden Funktionen auch der Lagerung, Sequestrierung und dem Transport von Metaboliten und Xenobiotika dient. Durch Transport toxischer Produkte aus dem Cytosol in die Vakuole kommt es zur Entgiftung der Zelle. Vakuolare, membranständige Pumpen, wie die MRP-ähnlichen Transporter der Hefe, scYcf1p, scBat1p und scBpt1p, sind sich strukturell ähnlich, zeigen aber unterschiedliche, teils überlappende (scYcf1p und scBpt1p) Substratspezifitäten. So könnte caMlt1p auch homologe Funktionen zu dem Transporter für Gallensäure, scBat1p (205), oder für Gallenpigment, scBpt1p (206), übernehmen. Allerdings wies eine *camlt1*-Nullmutante bei Vergleich mit dem Wildtyp keinerlei Wachstumsdefizite in Gegenwart steigender Konzentrationen an Galle oder dem Gallensalz Deoxycholat auf. Auch gegenüber toxischen Konzentrationen

verschiedener Metalle, metabolischer Inhibitoren, Oxidanzien und Antimykotika verhielt sich die *camlt1*-Nullmutante nicht sensitiv, so dass keine der getesteten Substanzen als potentiell caMlt1p-Substrat identifiziert werden konnte. Dennoch bleibt anzunehmen, dass caMlt1p als MRP-ähnlicher Transporter eine Funktion im Transport organischer Anionen erfüllt, möglicherweise in Konjugation mit Glutathion. Neben CDNB stellt auch Monochlorobiman ein typisches Modellsubstrat für cytosolische Glutathion-S-Transferasen (GSTs) dar, wobei ein intensiv fluoreszierendes, Membran-impermeables Konjugat entsteht. Eine *camlt1*-Nullmutante wurde mit Monochlorobiman inkubiert, in der Annahme, dass caMlt1p ähnlich wie scYcf1p eine GS-X-Pumpe sein könnte und, dass sich GS-X-Pumpen gegenüber einem breiten Spektrum an S-Konjugaten aktiv zeigen. Im Gegensatz zur *scycf1*-negativen *S. cerevisiae*-Mutante (160) wies die *camlt1*-Deletionsmutante nach Inkubation mit Monochlorobiman jedoch keine Reduktion der Fluoreszenz in der Vakuole auf. In *C. albicans* scheint ein anderer Transporter als caMlt1p für den vakuolaren Monochlorobiman-GS Transport verantwortlich zu sein. Allerdings könnte der Transport von Substraten durch caMlt1p außer in Form von Glutathion-Konjugaten auch in Konjugation mit anderen sauren Liganden, wie Glucuronat oder Sulfat, erfolgen. Zum Beispiel bevorzugt MRP3, ein Mitglied der insgesamt sieben Mitglieder umfassenden humanen MRP-Familie, den Transport von Glucuronat-Konjugaten gegenüber GSH-Konjugaten. Auch gibt es Hinweise, dass GS-X-Pumpen, wie z. B. MRP1/2 oder scYcf1p, toxische Substrate durch Cotransport mit GSH transportieren können (29, 48).

In weiterführenden Studien könnten Substrat-Aufnahmeversuche an isolierten Vakuolen die Chance erhöhen spezifische caMlt1p-Substrate zu identifizieren, möglicherweise nach Mutagenese anderer im Genom von *C. albicans* identifizierter, MRP-ähnlicher Gene. Dies würde unerwünschte Einflüsse auf den Transport der Testsubstrate unterbinden, wie z. B. Transport durch andere Membranpumpen mit überlappender Transportfunktion oder andere zelluläre Detoxifikationsmechanismen.

Nimmt caMlt1p Einfluss auf den Infektionsprozess von *C. albicans* *in vivo*?

In den *in vivo* Experimenten wurden *camlt1*-Deletionsmutanten eingesetzt, die mittels *MPA^R*-Blaster-Technik aus dem wildtypischen Stamm SC5314 als direktem Ausgangstamm entstanden sind (vgl. Kapitel VI 1.). Die Inaktivierung von Zielgenen im SC5314-Stamm ermöglicht die Konstruktion von Mutanten mit ansonsten zum Wildtyp isogenem Hintergrund.

Murine Infektionsmodelle können sicherlich nur annähernd eine *Candida*-Mykose im Menschen simulieren, tragen aber dennoch dazu bei, das Verhalten eines Erregers in der komplexen Umgebung eines lebenden Organismus besser zu verstehen. Um den Effekt von *caMLT1* auf das

Virulenzverhalten von *C. albicans* zu testen, wurden Mausmodelle gewählt, die einen disseminierenden Infektionsverlauf im Menschen widerspiegeln. Dabei wurde zwischen intravenöser und intraperitonealer Infektion differenziert. Die intravenöse Infektion kann dabei als ein Modell für eine hämatogene disseminierende Candidiasis verstanden werden. Dagegen reflektiert eine intraperitoneale Inokulation der Maus eine *Candida*-Peritonitis, die bei chronischer Peritonealdialyse (CAPD-Peritonitis) oder nach chirurgischen Eingriffen, wie z. B. nach Leber- oder Pankreas-Transplantationen, in Patienten auftreten kann (149).

Bereits 24 Stunden nach subletaler i. p. Infektion lässt sich das Ausmaß einer *Candida*-Infektion in Mäusen mittels histopathologischer Analyse der Leber und Pankreas erkennen. Hierbei zeigte die *camlt1*-Nullmutante (Stamm ST13-63) einen deutlichen Defekt in der Invasion dieser beiden parenchymalen Organe. Die Pilzzellen verblieben in der Mehrzahl auf der Organoberfläche und zeigten nur an einzelnen Stellen eine geringgradige Invasion. Der hoch virulente Kontrollstamm SC5314 drang dagegen tief in das Gewebe ein und schädigte dieses schwer. Als Maß für die Invasion in die Leber können ALT-Werte im Blut herangezogen werden (144, 146). Die niedrigen ALT-Mengen, die nach Infektion mit dem Stamm ST13-63 im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurden, verdeutlichen auch hier die mangelnde Invasivität der Mutante und die damit verbundene geringe Zerstörung der Gewebezellen. Durch die Reintegration einer intakten Genkopie an die Position eines *mlt1*-Allels im Stamm ST13-63 konnte bestätigt werden, dass der beobachtete attenuierte Phänotyp auf den Verlust des *caMLT1*-Gens zurückzuführen ist und nicht auf unerwünschte Mutageneseeffekte durch die genetische Manipulation. Die *caMLT1*-Revertanten verhielten sich nach i. p. Infektion wieder annähernd wie der Wildtyp. Sowohl histopathologische Daten, als auch die signifikante Steigerung der ALT-Werte im Blut infizierter Mäuse bewiesen die wiedererlangte Fähigkeit die Leber zu invadieren.

Im Gegensatz zum murinen Peritonitismodell zeigte sich im systemischen i. v. Modell kein signifikanter Unterschied in der Virulenz der beiden Stämmen ST13-63 und SC5314. Die Pilzbelastung wurde hierbei durch Ermittlung der CFU-Werte in ausgewählten Zielorganen, wie z. B. Nieren, Leber, Milz und Hirn, erfasst. Der Einsatz unterschiedlicher *in vivo* Modelle kann durchaus zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Einschätzung der Virulenz eines Erregers führen. So sind z. B. Mutanten, die im Histidinkinase-Gen *caHKL1* deletiert wurden, in einem akuten Maus-Lethalitätstest avirulent, aber in einem Ratten-Vaginitismodell nicht (38). Die Pilzzelle muss nach einer i. p. Inokulation in der Lage sein Gewebegrenzen zu überwinden, um im weiteren Verlauf der Infektion über die Blutbahn in andere Wirtsnischen vordringen zu können. Dieser frühe Infektionsschritt wird bei i. v. Infektion umgangen, da die Erreger direkt in die Blutbahn gespritzt

werden. *In vivo* könnte der caMlt1p-Transporter demnach in die Fähigkeit von *C. albicans* involviert sein, gegen die Wirkung von Immunzellen und deren freigesetzten Stoffe an Oberflächen zu adhären und diese zu durchdringen.

ABC-Transporter, die in der Virulenzausbildung von Pilzen eine Rolle spielen, lassen sich insbesondere bei Pflanzenpathogenen finden (65). Im Pilz *Magnaporthe grisea*, einem Pilz der an Reis Mehltau hervorruft, spielt der ABC-Transporter Abc1p für die initiale Kolonisierung des Wirtsgewebes und somit für den Infektionsprozess eine wichtige Rolle. Obwohl die Substratspezifität der mgAbc1p-Pumpe bislang unbekannt ist, liegt seine Funktion vermutlich im Export pflanzlicher Abwehrstoffe (292).

Die *camlt1*-Nullmutante scheint schon frühzeitig nach i. p. Infektion durch Abwehrzellen vom Gewebe abgegrenzt zu werden (ersichtlich in den Gewebeschnitten von Leber und Pankreas), wodurch eine Organinvasion sicherlich erschwert wird. Oxidative und nicht oxygene Abwehrmechanismen (z. B. antimikrobielle kationische Peptide) phagozytischer Zellen schädigen die Pilzzellwand und führen auch zu intrazellulären Schäden, wie DNA-Fragmentation und Proteindenaturierung (50, 96, 295). CaMlt1p könnte als stressinduzierbare, vakuolare Membranpumpe in den Transport toxischer Substanzen involviert sein, mit denen sich *C. albicans* extrazellulär oder intrazellulär nach Phagozytose konfrontiert sieht. Auch ein Transport toxischer Inhaltsstoffe der Wirtszelle, die durch die Zerstörung des Organgewebes frei werden, wäre denkbar. Ein Fehlen des Transporters könnte dann dazu führen, dass die Pilzzelle sensitiv gegenüber hohen Konzentration z. B. an Galle wird und nicht mehr in die Leber einwachsen kann. Für bakterielle Mikroorganismen, wie z. B. *Vibrio cholerae*, ist ein ausreichender Schutz vor Gallsäuren für das Überleben im Dünndarm wichtig, was u. a. auch durch Effluxpumpen gewährleistet wird (54). Wie bereits erwähnt zeigten jedoch Hemmungsexperimente, die mit Galle und auch mit Mäusegalle (Kretschmar, persönliche Information) durchgeführt wurden, keinen Unterschied zwischen *camlt1*-Mutanten und Wildtyp.

Da die Tiefe der Invasion in Leber und Pankreas und die Schädigung der Gewebezellen in enger Korrelation zur *in vitro* gebildeten Keimschlauchlänge steht (146), wurden die *camlt1*-Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung untersucht. Sowohl *in vitro* (z. B. Serum bei 37°C) als auch *in vivo* (Gewebeschnitte) zeigte sich in der Ausbildung von Keimschläuchen kein Unterschied zum Wildtyp, wodurch ein indirekter Einfluss der *camlt1*-Mutation auf Organinvasion und Phagozytose ausgeschlossen werden kann. Die beobachtete Induktion der *caMLT1*-Transkription nach zweistündigem Wachstum von *C. albicans* unter hypheninduzierenden Bedingungen in den Medien RPMI und Spider wird vermutlich nicht (oder nicht ausschließlich) durch den

Morphogeneseprozess an sich hervorgerufen. Darauf deutet die fehlende Steigerung der *caMLT1*-mRNA-Expression im ebenfalls hypheninduzierenden Lee's Medium (pH 6,8 / 37°C) hin. Ein Grund für die unterschiedliche *caMLT1*-Genaktivierung könnte in dem unterschiedlichen Glucosegehalt der verwendeten Medien liegen (66). Der erhöhte Gehalt an Glucose im Lee's Medium (1,2 % Glucose) im Vergleich zu normalem RPMI (0,2 %) und Spider Medium (enthält statt Glucose 1 % Mannitol) könnte die Expression von *caMLT1* reprimieren.

Die *in vitro* Induzierbarkeit der *caMLT1*-Expression durch toxische Verbindungen (z. B. Cd²⁺ oder CDNB) und während Nährstoffmangel (stationäres Wachstum) sowie die Anwesenheit verschiedener Promotorelemente (z. B. STRE und GCN4-Bindungssequenzen) deuten auf die Einbindung des Transporters in Stressantwort- und Detoxifikationsmechanismen hin. In *S. cerevisiae* lassen sich sechs ORFs identifizieren, die signifikante Homologien zu MRP und in geringerem Grad zu CFTR zeigen (16), von denen scYor1p, scYcf1p, scBat1p und scBpt1 bislang näher charakterisiert wurden. In ähnlicher Weise verfügt auch *C. albicans* über eine Familie MRP/CFTR-homologer Transporter, was die Identifikation mindestens drei weiterer zu *caMLT1* homologer ORFs zeigt. Für caMlt1p konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Funktion in der Virulenzausbildung von *C. albicans* bei peritonealer Infektion nachgewiesen werden. Inwieweit caMlt1p auch in oralen oder vaginalen Infektionsverläufen von Bedeutung ist muss in weiterführenden Untersuchungen evaluiert werden. Auch der Einfluss von caMlt1p auf das Abtöten der Pilzzelle durch phagozytierende Zellen kann nur in zusätzlichen *in vitro* Phagozytentests oder *in vivo* Infektionsmodellen mit immunsupprimierten Mäusen untersucht werden.

3. Charakterisierung eines dritten Phospholipase-B-Gens in *C. albicans* und Untersuchungen zu dessen Virulenzbeitrag im systemischen Infektionsmodell

Die Analyse der zu *caMLT1* 5'-gelegenen Genomsequenz ergab die Anwesenheit eines dritten Phospholipasegens mit hohen AS-Sequenzähnlichkeiten zu den beiden anderen bereits bekannten Phospholipasen B, caPlb1p (158) und caPlb2p (278), sowie zu Phospholipasen B / Lysophospholipasen anderer Pilze. Hydrolytische Enzyme, wie Proteinasen und Phospholipasen, tragen zur Virulenz von *C. albicans* entscheidend bei (102, 125). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine mögliche Virulenz-assoziierte Funktion des, aufgrund seiner phylogenetischen Verwandtschaft zu den anderen Phospholipasen, als caPlb5p bezeichneten Enzyms aufzudecken.

Homologierecherchen und Analyse der von *caPLB5* abgeleiteten Proteinsequenz

Zusätzlich zu *caPLB1,2* und *5* konnten mittels BLAST-Homologierecherche zwei weitere ORFs im *C. albicans* Genom identifiziert werden, die für potentielle Phospholipasen B kodieren könnten: *caPLB3* (ORF 6.795 und 6.796) und *caPLB4* (ORF 6.6206) (Assembly 6, *Stanford-Genome-Technology-Center*). Die Unterbrechung im Leseraster der ORFs 6.795 und 6.796 wurde vermutlich durch einen Sequenzierfehler verursacht, da zumindest der in dieser Arbeit verwendete Laborstamm SC5314 an dieser Stelle einen kontinuierlichen Leserahmen aufweist (G. Köhler, persönliche Information). Im Vergleich zu den drei *PLB*-Genen der nah verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* verfügt *C. albicans* somit über eine Phospholipase-B-Genfamilie mit fünf Mitgliedern. Eine phylogenetische Stammbaumanalyse, die einige Phospholipasen B unterschiedlicher Pilzarten mit einbezieht, belegt die enge Verwandtschaft der *C. albicans* Plb-Isoenzyme zueinander. Dabei verfügen die Phospholipasen caPlb5p und caPlb4p über die höchsten Ähnlichkeiten zu Phospholipasen anderer Pilzarten, wie z. B. zu scPlb2/3p von *S. cerevisiae*, klPlb1p von *K. lactis* und cgPlb2p von *C. glabrata*. Sequenzvergleiche mit Phospholipasen B / Lysophospholipasen aus Pilzen zeigen, dass caPlb5p über eine für diese Enzymgruppe typische katalytische Domäne (pfam01735) verfügt. So sind die konservierten Aminosäuren ¹⁸⁷Arg, ²²⁵Ser und ⁴⁷⁷Asp sehr wahrscheinlich für die hydrolytische Aktivität des Enzyms verantwortlich. Wie andere Phospholipasen B in Pilzen könnte caPlb5p multifunktional sein. So verfügen z. B. alle drei identifizierten Plb-Enzyme von *S. cerevisiae* über hydrolytische Aktivitäten, was sowohl die Deacylierung von Phospholipasen (PLB-Aktivität) als auch von Lysophospholipasen (Lyso-PL-Aktivität) umfasst. Zudem katalysieren sie den Transfer einer Acylkette von einem Lysophospholipid auf ein zweites (LPTA-Aktivitäten) (177). Mirbod und Mitarbeiter charakterisierten die funktionale Aktivität eines aus dem Kulturüberstand von *C. albicans* aufgereinigten Enzyms und konnten hier ebenfalls PLB-, Lyso-PL- und LPTA-Aktivitäten nachweisen (180). Dementsprechend zeigte eine *caplb1*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der PLB- und Lyso-PL-Aktivität im Kulturüberstand auf entsprechend 1 % und 10 % (102), wobei die PLB-Nachweisreaktion mit Phosphatidylcholin als Substrat durchgeführt wurde (158). Ob für die verbleibende hydrolytische Restaktivität in den *caplb1*-negativen Mutanten caPlb5p verantwortlich ist, bleibt rein spekulativ, zumal noch drei andere Gene in *C. albicans* für putative PLBs kodieren. Neueste Daten zeigen, dass eine *caplb5*-Nullmutante besonders in der Zell-assoziierten PLA₂-Aktivität bei 37°C reduziert ist, d. h. in der Abspaltung C₂-gekoppelter Fettsäuren von Phospholipiden (getestet wurde 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-Phosphatidylcholine, persönliche Mitteilung von G. Köhler). PLA₁-Aktivität scheint nicht oder weniger betroffen zu sein. Diese *in vitro* Daten lassen jedoch die Frage offen, ob und unter welchen Umständen (*in vivo*)

caPlb5p PLA₁- oder PLA₂-Aktivität aufzeigt. Eine vorherrschende PLA₂-Aktivität von caPlb5p könnte während des Infektionsprozesses die Bildung von Arachidonsäure durch Spaltung von Wirtszellphospholipiden fördern, wobei die Stimulation von Arachidonsäure-Freisetzung und – Metabolismus durch Interaktion von *C. albicans* mit Wirtszellen belegt ist (40, 41, 85). Metabolische Arachidonsäureprodukte, wie z. B. Prostaglandine und Leukotriene, nehmen entscheidend Einfluss auf den pro- aber auch anti-inflammatorischen Prozess am Ort der Infektion (321). Darüberhinaus fördert Prostaglandin E₂ die Hefe-zu-Hyphe-Transition von *C. albicans* (131). Interessanterweise ist *C. albicans* in der Lage Prostaglandine *de novo* und, in größerer Menge, durch Metabolisierung exogen zugeführter Arachidonsäure selbst herzustellen (69, 198). Eine vermehrte Produktion von Prostaglandinen durch die Wirtszelle aber auch durch *C. albicans* am Ort der Infektion könnte so ein wichtiger Faktor für die Manifestation einer Pilzinfektion sein, zumal Prostaglandine inhibierend auf die Th1-typische Immunantwort (Zell-vermittelte Immunität), die Chemokinproduktion, die Phagozytose und die Lymphozytenproliferation wirken können.

Andere mögliche Aktivitäten von caPlb5p (Lyso-PL- oder LPTA-Aktivität) wurden bisher noch nicht getestet. Weitere Untersuchungen sind auch erforderlich hinsichtlich der Substratspezifität von caPlb5p in Bezug auf die hydrophilen Kopfgruppen (Cholin, Ethanolamin, etc.) und die veresterten Fettsäuren (z. B. Kettenlänge, Sättigungsgrad) der Phospholipide, die im Vergleich zu caPlb1p variieren könnte. Studien zur Aktivität von Plb1-3p in *S. cerevisiae* ergaben unterschiedliche Substratspezifitäten der Isoenzyme *in vitro* sowie Variationen in der funktionalen Aktivität *in vivo*: Während scPlb1p und scPlb2p *in vitro* die gleiche breite Substratspezifität aufweisen, zeigt sich scPlb3p selektiv für die Spaltung von Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin. Zudem zeigten Mutagenesestudien, dass *in vivo* ausschließlich scPlb1p für die Deacylierung von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin benötigt wird, nicht aber scPlb2p (155, 177).

Die Aktivität und Substratspezifität von caPlb5p könnte durch den Einsatz der in dieser Arbeit konstruierten *caplb5*-negativen Mutanten in dem Ura-auxotrophen Ausgangsstamm CAI4 und dem wildtypischen Stamm ATCC44808 (s. u. und vgl. Kapitel VI 1.) in weiterführende Enzymaktivitätsstudien (radioaktiv oder colorimetrisch) näher bestimmt werden und zwar unter Verwendung verschiedener Phospholipid- und Lysophospholipid-Substrate. Durch Herstellung von *plb1-5*-Mehrfachmutanten könnten zudem mögliche funktionale Überdeckungseffekte erkannt werden, die bei überlappender Substratspezifität anderer Phospholipase-B-Enzyme oder im Falle von Kreuzregulationen auftreten würden.

Die von *caPLB5* abgeleitete Proteinsequenz weist am NH₂-Terminus ein 19 Aminosäuren umfassendes, hydrophobes Signalpeptid auf. Analysen mit dem Programm SignalP (196) ergaben auch bei den anderen Genen *PLB1-4* die Anwesenheit einer hydrophoben NH₂-terminalen Signalsequenz. Daraus lässt sich schließen, dass vermutlich alle in *C. albicans* identifizierten Plb-Enzyme sekretiert werden (156). Im Gegensatz zu caPlb1/2p scheinen die Enzyme caPlb3p, caPlb4p und caPlb5p über einen hydrophoben COOH-Terminus zu verfügen, dem eine potentielle ω -Stelle (114) für die Kopplung eines GPI-Ankers unmittelbar vorangestellt ist. Hierbei bleibt anzumerken, dass die mittels DGPI-Analyse ermittelten ω -Stellen, Aminosäure ⁶⁷⁴S bei caPlb3p, ⁶⁰⁷N bei caPlb4p und ⁷²⁰S bei caPlb5p, lediglich als Vorhersage für ein GPI-Motiv zu werten sind. Bei Verwendung anderer Suchalgorithmen können sich die potentiellen GPI-Verankerungsstellen auf benachbarte Aminosäuren verschieben (62). Eine andere Studie sagt nur für caPlb5p eine GPI-Verankerung vorher (156). Weitere experimentelle Untersuchungen sind demnach nötig, um die GPI-Verankerung *in vivo* zu bestätigen und zu klären welchen Effekt diese Modifikation auf die Funktion und subzelluläre Lokalisation von caPlb5p haben könnte. Der Zellwandaufbau von *C. albicans* ist mit dem von *S. cerevisiae* grundlegend vergleichbar (133). Das Schicksal von GPI-Proteinen in *C. albicans* könnte dem GPI-verankerter Zellwandproteine in *S. cerevisiae* gleichen. So könnte caPlb5p nur vorübergehend an die Plasmamembran gebunden sein. Im weiteren Verlauf könnten GPI-spezifische Phospholipasen für eine Wiederabkopplung von caPlb5p sorgen, so dass das Enzym letzten Endes mit der unlöslichen Glucan-Komponente der Zellwand verknüpft werden kann (63, 167). Für das Zellwandprotein caHwp1p und die α -Agglutinin ähnlichen Als-Proteine von *C. albicans* ließ sich bereits zeigen, dass sie nach kappen des GPI-Ankers mit β (1,6)-Glucan verknüpft und über β (1,3)-Glucan an die Zellwand gekoppelt werden (133, 280). Welche Mechanismen der Zellwandverankerung von GPI-Proteinen zu Grunde liegen ist bislang nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Abfolge von Aminosäuresequenzen unmittelbar vor der ω -Region (ω -Minus-Region) sich positiv oder negativ auf eine Inkorporation in die Zellwand auswirkt. Kommen bestimmte Aminosäuren an den Positionen ω -4/5 (Isoleucin, Valin oder Leucin) und ω -2 (Tyrosin oder Asparagin) nicht vor, so wie es bei caPlb5p der Fall ist, dann scheint eine Zellwandlokalisation weniger wahrscheinlich (114). Positiv auf eine Zellwandlokalisation könnte sich dagegen die Serin- und Threonin-reiche Sequenzabfolge unmittelbar vor der ω -Region (AS-Position 674 – 719) von caPlb5p auswirken, die im Vergleich zu anderen GPI-Proteinen jedoch relativ kurz ist. Exzessive Glykosylierungen dieser Region scheinen für eine stabähnliche Struktur zu sorgen und das Protein aus der Zellwand hervortreten zu lassen (128).

Eine interessante Besonderheit in der caPlb5p-Sequenz stellt die Verlängerung des NH₂-Terminus dar. Vergleicht man die AS-Sequenz von caPlb5p mit denen anderer bekannter Phospholipasen B von Pilzen, so zeigt sich bei caPlb5p im Anschluss an das Signalpeptid ein Sequenzeinschub, der eine Serin-reiche, ca. 90 Aminosäuren umfassende Domäne beinhaltet. Die mittels 5'-RACE ermittelten *caPLB5*-Transkriptionsstarts (Position -137 und -90) weisen auf einen Translationsstart am ATG-Codon Pos. 1 hin und bestätigen die NH₂-terminale Verlängerung von caPlb5p. Auch der Nachweis des *caPLB5*-Transkripts im Northernblot nach Hybridisierung mit einer Sonde, die diese Sequenzverlängerung abdeckt, bestätigen, dass diese NH₂-terminale Verlängerung im *caPLB5*-Gen tatsächlich exprimiert wird (siehe Abb. 34 und 35, Kapitel V 3.3.2). Die biologische Funktion dieses verlängerten NH₂-Terminus ist bislang unbekannt. Die geclusterten potentiellen O-Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen dieser Region könnten jedoch für eine korrekte Expression und Prozessierung des Glycoproteins notwendig sein (293). So befinden sich C-terminal angrenzend zu dieser Region zwei dibasische Aminosäuremotive (Lys-Arg) an den Positionen 138 und 153, die als Kex2p-Spaltstellen dienen könnten (228). Die Funktion von Kex2p liegt in der normalen Prozessierung und Aktivierung sekretierter extrazellulärer und zellwandgebundener Proteine. Newport und Mitarbeiter identifizierten mittels Datenbankrecherche 147 ORFs im Genom von *C. albicans*, deren Produkte potentielle Kex2p-Spaltstellen aufweisen (194). Darunter befanden sich ORFs, die für Zellwandproteine, wie z. B. Hwp1p oder caPhr1/2p, oder Hydrolyasen, wie z. B. Sphingomyelinasen und die sekretorischen Aspartyl-Proteinasen SAP, kodieren. CaPlb5p wurde in dieser Arbeit nicht als potentielles Kex2p-Substrat identifiziert, möglicherweise aufgrund zu restriktiv gewählter Suchalgorithmen. Ob caPlb5p als Prepropeptid exprimiert wird und im weiteren Syntheseweg durch caKex2p oder andere Proteinasen mit ähnlicher Spaltaktivität (z. B. SAP9 und SAP10 (3)) aktiviert wird, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden. Hinweise ließen sich z. B. erhalten durch Immunoblot-Analysen von caPlb5p, exprimiert in Endoproteinase-mutierten *C.-albicans*-Stämmen.

Identifikation von *caPLB5*-Allel-Polymorphismen

In drei untersuchten *C. albicans* Stämme, ATCC44808, CAI4 und dessen Elternstamm SC5314, zeigte sich interessanterweise eine Heterozygotität am *caPLB5*-Genlocus. Direktsequenzierungen der amplifizierten *caPLB5*-Genregion offenbarten die Existenz zweier Allele innerhalb eines Stamms, die sich abgesehen von wenigen stillen Nukleotidaustauschen vor allem an zwei Aminosäurepositionen (L₅₇K₂₀₈ und S₅₇N₂₀₈) unterschieden. Beide *caPLB5*-Allele L₅₇K₂₀₈ und S₅₇N₂₀₈ waren in jedem der insgesamt drei untersuchten *C. albicans* Stämme präsent. Zudem zeigte

sich zusätzlich eine stammspezifische Sequenzvariation an AS-Position 709, wobei eine Alanin/Serin-Variation in den Stämmen CAI4/SC5314 und ATTC44808 vorlag.

Die Existenz natürlicher Alleldifferenzen in *C. albicans* ist bekannt und bereits eingehend beschrieben worden (111, 307). Als stets diploider Organismus mit zwei Kopien eines jeden Gens können sich die beiden Allele durch das Auftreten von Mutationen innerhalb der DNA-Sequenz unterscheiden. Vermutlich führt das Auftreten und Ansammeln von DNA-Sequenzunterschieden zwischen zwei Allelen eines Gens auch zur Herabsetzung interchromosomaler Rekombinationsereignisse, was wiederum das Entstehen heterozygoter Genloci fördert. Die biologische Bedeutung von Allelvariationen zeigt sich sehr deutlich am Beispiel des *caSAP2*-Gens, dessen zwei Allele sich in zwei Aminosäuren in der kodierenden Genregion und in der Anzahl pentamerer Wiederholungssequenzen in der Promotorregion voneinander unterscheiden (267). Beide *caSAP2*-Allele, *caSAP2-1* und *caSAP2-2*, werden *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich reguliert, wobei die Expression von *caSAP2-1p* abhängig ist von einer früheren Aktivität von *caSAP2-2p* und demzufolge auch leichten Induzierbarkeit des *caSAP2-2*-Promotors. Alleldiversität in *C. albicans* stellt somit, zusätzlich zur Existenz von Genfamilien, eine weitere Ebene zur Erlangung regulatorischer und (möglicherweise) funktionaler Flexibilität dar. Dies wiederum könnte das Anpassungspotential dieses Mikroorganismus an verschiedene Bedingungen im Wirt erhöhen. Auch das Auftreten der Aminosäuresequenzunterschiede zwischen den Allelen des Gens *caPLB5* könnte von biologischer Bedeutung sein und z. B. zu unterschiedlichen Spezifitäten oder unterschiedlichen Stärken in der Enzymaktivität führen, was sich mittels biochemischer Analysen gereinigter Proteine untersuchen liesse. Ebenso wäre eine differentielle Regulation der *caPlb5p*-Alloenzyme denkbar, wobei genauere Daten bezüglich relevanter Sequenzunterschiede im Bereich des putativen *caPLB5*-Promotors noch gewonnen werden müssten. Die Überprüfung der *in vitro* *caPLB5*-mRNA-Expression in den konstruierten heterozygoten CAI4-Mutanten PK3 und PG9 (die im jeweils anderen *caPLB5*-Allel inaktiviert worden sind) lieferte keinen Unterschied in der Transkriptstärke der beiden *caPLB5*-Allele und demnach keinen Hinweis auf eine Allel-spezifische differentielle Regulation. Dennoch kann eine mögliche differentielle Regulation der unterschiedlichen *caPLB5*-Allele nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine detaillierte Analyse der Allel-Promotorsequenzen sowie der Einsatz von Promotor-Reportergenkonstrukten könnten eine mögliche differentielle Expression *in vitro* wie *in vivo* aufdecken.

Regulation der *caPLB5*-Expression während der morphologischen Transition von *C. albicans* und differenzielle Expression der Phospholipase-B-Isoenzyme

Die Fähigkeit zur morphologischen Transition (Dimorphismus) wird als ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenitätsausbildung von *C. albicans* angesehen. Bemerkenswert dabei ist, dass mit dem Wechsel der verschiedenen Zellmorphologien auch ein Wechsel zellulärer Eigenschaften einher geht, wie z. B. eine bessere Adhärenz an Epithel- und Endothelzellen (Odds 1988 #116, Cutler 1991 #182) und die Fähigkeit Wirtsgewebezellen zu invadieren (23, 108, 324). So scheinen die selben Signale und Regulationsmechanismen, die ein filamentöses Wachstum induzieren, auch die Expression Hyphen-spezifischer, oft virulenzassoziiertes Proteine zu aktivieren, wie z. B. die hydrolytischen sekretorischen Proteasen SAP4-6p (250, 268) oder das Zellwandprotein Hwp1p (254), das Adhärenz an Gewebezellen während der Infektion vermittelt (265). Auch die Regulation der *caPLB1*-Expression scheint in Abhängigkeit der Zellform zu erfolgen und unter dem Einfluss Zellform-regulierender Mechanismen zu stehen (122). Bei Untersuchungen von Hoover und Mitarbeitern wiesen Blastosporen und Pseudohyphen im reichhaltigen YPD-Medium eine stärkere *caPLB1*-mRNA-Expression auf als Keimschlauch-bildende Zellen. Als Signal zur morphologischen Transition diente hierbei ein Temperaturwechsel von 25°C auf 37°C und ein Wechsel des pH-Werts vom sauren in den neutralen Bereich. Die gleichen Signale wurden auch gewählt, um die Expression der *caPLB5*-mRNA nach dreistündigem Wachstum im Lee's Medium zu untersuchen. In diesem synthetisch definierten Medium führt der gleichzeitige Wechsel von Temperatur und pH-Wert zum Gestaltwechsel der Pilzzelle, wobei je nach Kombination der Wachstumsbedingungen Hefen (25°C), echte Hyphen (37°C und neutraler pH-Wert 6,8) oder vornehmlich Pseudohyphen (37°C und saurer pH-Wert 4,5) gebildet werden. Während unter allen gewählten Wachstumsbedingungen ein *caPLB5*-spezifisches Transkriptsignal detektiert werden konnte (auch während des Wachstums in YPD-Vollmedium), zeigte sich bei 37°C im Lee's Medium eine deutliche Signalinduktion mit dem höchsten Niveau bei 37°C und pH 6,8. Dabei war das *caPLB5*-Expressionsmuster in den untersuchten Stämmen CAI4, SC5314 und dem auf Eigelbagarplatten hoch lipolytischen Blutisolat ATCC44808 identisch, allerdings wies der Stamm ATCC44808 die höchsten Expressionsniveaus auf.

Weitere Hybridisierungen derselben isolierten *C. albicans* RNAs wurden mit Sonden durchgeführt, die spezifisch an *caPLB1* und *caPLB2* binden. Sonden für den Nachweis der *caPLB4*-mRNA und *caPLB3*-mRNA konnten zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nicht angefertigt werden, da beide Gensequenzen noch unbekannt waren und erst später im Rahmen des *C.-albicans*-Sequenzierungsprojekts (Stanford) identifiziert und für Sequenz-Vergleichsanalysen in die Promotionsarbeit mit aufgenommen wurden. Die Ergebnisse der Northernblotanalysen weisen auf

eine differentielle Regulation der Phospholipasen caPlb1p, caPlb2p und caPlb5p hin. Während *caPLB5* vermehrt unter Hyphen-induzierenden Bedingungen transkribiert wurde, erfolgte die Expression der *caPLB1*-mRNA ausschließlich unter Pseudohyphen-induzierenden Bedingungen bei 37°C und pH 4,5. Eine nur schwache Expression konnte unter den gewählten *in vitro* Bedingungen für *caPLB2* gemessen werden, wobei das intensivste Hybridisierungssignal ebenfalls bei Pseudohyphenbildung auftrat. In einer kürzlich veröffentlichten Studie über den Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die *in vitro* Regulation von *caPLB1* konnte die Transkription dieser Phospholipase unter der physiologisch relevanten Temperatur von 37°C nur durch Zugabe von Serum und Phospholipiden aktiviert werden (185). Dabei erfolgte die Analyse nach sieben Stunden Inkubation im YNB-Medium, im Unterschied zu der hier gewählten Bedingung (zwei Stunden Wachstum in Lee's Medium), bei der *caPLB1* auch ohne Supplemente aktiviert werden konnte. Neben der Temperatur und dem pH-Wert nehmen vermutlich auch andere Faktoren, wie das Wachstumsmedium und die Wachstumsphase Einfluss auf die Transkription von *caPLB1*. Microarray Expressionsdaten, die im Anschluss an diese Arbeit von Köhler und Mitarbeitern durchgeführt wurden, bestätigen die Northernblot-Analysedaten und zeigten, dass *caPLB5* gemeinsam mit *caPLB4* die einzigen Phospholipase-B-Gene sind, die während des Wachstums in Lee's Medium in Hefen exprimiert werden und nach Induktion echter Hyphen hoch reguliert sind (284).

Die hier gezeigte differentielle Regulation *in vitro* könnte auch im Wirt an den unterschiedlichen Infektionsorten von Bedeutung sein. Die bereits gut untersuchten, virulenzassoziierten SAP-Gene sind *in vitro* und *in vivo* differentiell reguliert, wobei je nach Infektionsort und Infektionsstadium den einzelnen Sap-Proteasen eine unterschiedliche Gewichtung zukommt (227, 246, 266). Dies lässt sich auch für die Mitglieder der Phospholipase B Genfamilie vermuten. Im artifiziellen Blutstrom-Infektionsmodell konnte bereits eine Expressionsinduktion von *caPLB5*, nicht aber von *caPLB1* und *caPLB2* nachgewiesen werden (88). Das Expressionsmuster der einzelnen Plb-Isoenzyme während einer Infektion ließe sich durch Einsatz der „In-Vivo-Expression-Technology“ (IVET) analysieren. Staib und Mitarbeiter wendeten diese Technologie bereits erfolgreich zur Untersuchung der SAP1-SAP6 Genexpression in *C. albicans* an, wobei die jeweiligen SAP-Promotoren mit einer gentechnisch angepassten FLP-Rekombinase fusioniert wurden (266). Während *in vitro* keine Promotoraktivität detektiert werden konnte, kam es nach Aktivierung *in vivo* zur Expression der FLP-Rekombinase und zur permanenten Exzision des an anderer Stelle im Genom inserierten *MPA^R*-Markers. Die stets vorhandene Basalaktivität des *caPLB5*-Promotors verhinderte bislang die Nutzung der FLP-Reportergen-Methode für *in vivo* Expressionsstudien des *caPLB5*-Gens. So kam es bereits unter *in vitro* Kulturbedingungen zur Expression der FLP-

Rekombinase in der *caPLB5*-Promotorfusion (21). Auch immunologisch ist ein Nachweis der exprimierten caPlb-Isoenzyme nach Infektion im Gewebe möglich. CaPlb1p konnte bereits während der Infektion mittels anti-caPlb1p-Antikörper im Gewebe (Magen) detektiert werden, wobei nach *caPLB1*-Inaktivierung eine geringe Immunomarkierung der Zellwand der Mutante verblieb. Diese Restaktivität könnte unspezifisch sein oder möglicherweise auf der Anwesenheit anderer, immunologisch kreuzreaktiver Phospholipasen B beruhen (186).

Über welche Transduktionswege die Signale zur Expression der Phospholipasen B führen und welche Transkriptionsfaktoren direkt daran beteiligt sind ist bislang kaum bekannt. Eine Beteiligung von caTup1p (einem Transkriptionsrepressor, der in die Hyphenbildung sowie die Transkription vieler Hyphen-spezifischer Gene involviert ist) an der Regulation der *caPLB1*-Expression wird vermutet (122). Sequenzanalysen der putativen Promotorregion von *caPLB5* zeigten mehrere theoretische Erkennungssequenzen für GATA-Bindungsfaktoren. GATA-Faktoren umfassen eine Gruppe weit verbreiteter eukaryotischer Transkriptionsregulatoren mit DNA-bindendem Zinkfingermotiv, die auch in Pilzen wichtige Funktionen bei der Kontrolle vieler regulatorischer Prozesse ausüben. Am besten charakterisiert ist dabei die Kontrolle von Enzymen, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind, so z. B. Nit2 im Pilz *Neurospora crassa* oder AreA in *Aspergillus nidulans* (176). Die Stickstoffregulation spielt auch eine Rolle in der morphologischen Transition von *S. cerevisiae* und *C. albicans* (109) und ist verbunden mit der Pathogenität von *M. grisea* (176). Ob die putativen GATA-Bindungsstellen innerhalb des *caPLB5*-Promotors tatsächlich eine Bedeutung für die Regulation und Expression dieses Phospholipase B Gens haben, z. B. während der Hefe-Hyphe-Transition, könnte durch Mutagenisierung des Promotors in weiterführenden Studien analysiert werden.

Beitrag von caPlb5p zur Virulenzausbildung von *C. albicans* während der systemischen Infektion

Die Hyphen-assoziierte Induktion der Phospholipase-B-5 von *C. albicans* deutet auf Funktionen hin, die für das filamentöse Wachstum selbst von Bedeutung sein könnten, z. B. durch Umbau der Plasmamembranphospholipide während der Transition. Andererseits könnten auch Funktionen ausgeübt werden, die mit Eigenschaften der filamentösen Zellform verbunden sind. So ist die Ausbildung von Hyphen z. B. wichtig für die Penetration von Wirtsgewebezellen und für die Abwehr phagozytierender Zellen des Wirtsimmunsystems (23, 60, 165, 200). Die Bedeutung von Phospholipasen als Virulenz-assoziiertes Faktor im bakteriellen Infektionsprozess sowie bei pathogenen Pilzen ist bereits eingehend beschrieben worden (102, 263). Für caPlb1p konnte bereits

eine Funktion bei der Penetration epithelialer und endothelialer Zellmonolayer (158) sowie bei der Durchschreitung des gastrointestinalen Trakts (186) aufgezeigt werden. Der Einsatz der in dieser Arbeit konstruierten *caplb5*-Deletionsmutanten im murinen systemischen Infektionsmodell dokumentiert auch für *caPLB5* virulenz-fördernde Eigenschaften. Dabei blieb die Fähigkeit zur Hyphenbildung von der Mutagenese des *caPLB5*-Gens unbeeinflusst. Nach i. v. Infektion von Balb/c-Mäusen verfügten *caplb5*-Nullmutanten der Ausgangsstämme CAI4 (PG9-31 und PK3-11, hergestellt mittels *URA3*-Blaster) und ATCC44808 (KH44-91, hergestellt mittels *MPA^R*-Flipper-Strategie, vgl. Kapitel VI 1.) über eine verminderte Fähigkeit über den Blutstrom zu dissimulieren und Organe zu invadieren. Dies zeigte sich durch eine geringere Pilzlast (CFU-Wert) in den untersuchten Organen Leber, Nieren und Hirn im Vergleich zur Infektion mit den Kontrollstämmen SC5314, CAF2-1 und ATCC44808. Die für *caPLB5* heterozygoten Mutanten beider Ausgangsstämme verhielten sich im systemischen Infektionsmodell nahezu wildtypisch. Lediglich in der Leber wies die heterozygote ATCC44808-Mutante KH44-13 intermediäre CFU-Werte auf, wobei sich die homozygote Mutante KH44-91 in diesem Organ auch am meisten attenuiert verhielt. Die erfolgreiche Wiederherstellung der wildtypischen Virulenz im *caplb5*-negativen Stamm KH44-91 durch Rekonstitution der *caPlb5p*-Aktivität mit einer intakten *caPLB5*-Genkopie demonstriert, dass keine undefinierten Mutationen für den Virulenzdefekt im *caplb5*-Stamm verantwortlich sind.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die beiden voneinander unabhängig hergestellten CAI4-Nullmutanten PG9-31 und PK3-11 sich unterschiedlich in ihrer Ausprägung des attenuierten Phänotyps zeigten. Über die Gründe, die PG9-31 während der systemischen Infektion wesentlich attenuierter erscheinen ließen als PK3-11, kann derzeit nur spekuliert werden. Southernblot- und Northernblotanalysen zeigten die korrekte und erfolgreiche Inaktivierung des *caPLB5*-Gens in beiden Stämmen (siehe Abb. 32 b und 33 b, Kapitel V 3.3.1). PK3-11 zeigte eine ähnliche Virulenzausprägung wie die *caplb5*-Nullmutante KH44-91 mit wildtypischem Stammhintergrund, was den *caplb5*-negativen Phänotyp dieser beiden Mutanten bestärkt. Unterschiede in der Organpräferenz – die vom Stamm ATCC44808 abstammenden Mutanten zeigten sich im Vergleich zu den CAI4-Mutanten vermehrt attenuiert in der Leber - könnten hierbei stammspezifisch sein. Ein größerer, möglicherweise sekundär auftretender Defekt in der Mutante PG9-31 könnte Ursache für die vermehrte Virulenzminderung dieser Mutante sein. In den heterozygoten Vorläuferstämmen PG9 und PK3 erfolgte die Insertion der *PLB5-URA3*-Mutagenesekassette im ersten jeweils anderen *caPLB5*-Allel, so dass nach der zweiten Disruptionsrunde das *URA3*-Gen der Mutagenesekassette in den Stämmen PG9-31 und PK3-11 im zweiten jeweils anderen Allel verblieb. Es wäre also

denkbar, dass durch die unterschiedliche Lokalisation des essentiellen *URA3*-Gens ein Positionseffekt auftritt, der zu abweichenden, *in vivo* relevanten OMP-Decarboxylase-Aktivitäten führt (118) und den *plb5*-negativen Phänotyp bei PG9-31 verstärkt. Wachstumsdefizite konnten allerdings bei keinem der in *caPLB5*-mutierten Stämme im Uridin/Uracil-Mangelmedium bemerkt werden (siehe Abb. 33 a, Kapitel V 3.3.1). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte auf, dass, unerwarteterweise, bestimmte CAI4-Laborstämme eine Chromosom-1-Trisomie aufweisen, die zur Avirulenz auch *URA3*-positiver Stämme führt (46). Die Studie zeigte auch, dass das Wachstum von *C. albicans* in Gegenwart von 5-FOA während genetischer Manipulationen zur Selektion Ura-negativer Stämme in der Veränderung der Chromosomen-1-Kopienzahl resultieren kann. Während der Generierung der *caplb5*-Mutanten im Stamm CAI4, die mittels *URA3*-Blaster-Strategie und 5-FOA-Selektion durchgeführt wurde, hätte es demnach auch zur Veränderung in der Chromosomenkopienzahl kommen können – entweder durch Gewinnung einer Extrakopie von Chromosom 1 (dadurch z. B. Entstehung einer Trisomie) oder durch Verlust einer Chromosomen-1-Kopie (dadurch z. B. Verlust einer schon bestandenen Trisomie). Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für die unterschiedlichen *in vivo* Phänotypen der unabhängig voneinander konstruierten Mutanten PG9-31 und PK3-11 sein. Andere unspezifische Effekte, die während des Mutageneseprozesses eingebracht wurden und den attenuierten Phänotyp von PG9-31 verstärken können nicht ausgeschlossen werden. Bei Mutagenese des *caPLB5*-Gens wurde darauf geachtet, dass die angrenzenden Gene - eine 5'-stromaufwärts gelegene Phosphomutase und eine auf dem Gegenstrang nur 97 bp 3' von *caPLB5* endender putativer Transkriptionsfaktor der Carbon-Katabolitrepression, Ccr4p - unbeschädigt blieben. Um dennoch unerwünschte Sequenzmutationen im zu *caPLB5* 5'-angrenzenden Phosphomutase-Gen *caPMU5* auszuschließen, die durch Rekombination der Mutagenesekassette mit den Zielsequenzen hätten entstehen können, wurde aus genomischer DNA hetero- und homozygoter *caplb5*-Mutanten sowie des Ausgangsstamms CAI4 PCR-Amplifikate der *caPLB5*-Genregion mit angrenzendem Bereich hergestellt und direkt sequenziert. Es zeigten sich keine durch den Prozess der *caPLB5*-Mutagenese eingebrachten Sequenzabweichungen im 3'-*caPMU5*-Genbereich.

Während der systemischen Infektion ist *C. albicans* in der Lage aus dem Blutstrom zu entkommen und in tiefer gelegene Gewebe vorzudringen. Der Pilz adheriert zunächst an der Blutgefäßoberfläche, um dann die endotheliale Zellschicht zu penetrieren (139). Der Wechsel vom hefenförmigen Wachstum zur Hyphe und die Expression Hyphen-assoziiierter Faktoren, wie z. B. Adhäsine und hydrolytische Enzyme, wurden als Eigenschaften beschrieben, die am Prozess der Transmigration und Besiedlung von Organen involviert sind (82, 94, 210). In Serum wird die

Bildung von Hyphen in *C. albicans* effizient induziert. Die vermehrte *caPLB5*-Expression während des filamentösen Wachstums *in vitro*, die gleichzeitige Induktion von *caPLB5* mit Hyphen-spezifischen Genen wie *caSAP4-6* und *caHWPI* (G. Köhler, persönliche Information) sowie die verminderte Virulenz *caplb5*-negativer Mutanten im intravenösen Infektionsmodell disseminierter Candidiasis deuten auf eine Beteiligung dieses lipolytischen Enzyms am Infektionsprozess hin. Über welche Mechanismen Phospholipasen zur Virulenzausbildung pathogener *Candida* Arten beitragen ist bislang unbekannt. So wird eine direkte Degradation von Wirtszell-Phospholipiden vermutet, die zur Modifikation oder gar Zerstörung der Wirtszellmembran führen könnte (102). Im Unterschied zu *caPlb1p* verfügt *caPlb5p* über eine GPI-Verankerung, die das Enzym eng mit der Plasmamembran und letztlich auch mit der Zellwand verknüpft. Gerade deshalb könnte *caPlb5p* von Bedeutung sein, wenn der Pilz im engen Kontakt mit der Wirtszelle steht, so z. B. während der Anhaftung an oder Penetration von Zelloberflächen. *CaPlb5p* könnte an der gemessenen restlichen Phospholipase-B-Aktivität und Virulenz der *caplb1*-Mutanten beteiligt sein; übereinstimmend mit der Ansicht, dass die *Candida*-Pathogenität multifaktoriell ist und von mehr als nur einer Determinante beeinflusst wird (37, 59, 191). Da die Beeinträchtigung der Virulenz eines Stammes nach Inaktivierung eines Virulenz-assozierten Faktors auch vom gewählten Infektionsmodell abhängt, wäre es interessant das Verhalten der *caplb5*-negativen Mutanten neben dem Modell für systemische Infektion auch in anderen etablierten Infektionsmodellen für *C. albicans* zu testen, wie z. B. nach intraperitonealer oder oral-intragastrischer Infektion. Zur Etablierung und Aufrechterhaltung einer Infektion durch *C. albicans* bedarf es vermutlich je nach Infektionsort der Expression anderer Gensortimente. So könnte auch die Expression von *caPlb5p* durch Kontakt mit unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen *in vivo* beeinflusst werden und der Bedarf eines intakten *caPLB5*-Gens variieren.

VII LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski and S. Vartivarian (1997)** The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* **24**, 1122-8.
2. **Alarco, A. M. and M. Raymond (1999)** The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 700-8.
3. **Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, M. Schaller, M. Kretschmar, T. Nichterlein, W. Schäfer, M. Monod and B. Hube (2003)** SAP9 and SAP10 of *Candida albicans* code for GPI-anchored regulatory proteinases which are necessary for cell surface integrity, adherence and virulence. *IJMM - 55. DGHM-Tagung in Dresden* **293**, 229.
4. **Alloway, B. J. and D. C. Ayres (1996)** *Schadstoffe in der Umwelt: Chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzung*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
5. **Alseth, I., L. Eide, M. Pirovano, T. Rognes, E. Seeberg and M. Bjoras (1999)** The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 3779-87.
6. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
7. **Andrianopoulos, A. and W. E. Timberlake (1994)** The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-15.
8. **Appel, R. D., A. Bairoch and H. D.F. (1994)** A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 258-60.
9. **Arai, T., Y. Mikami and K. Yokoyama (1977)** Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. *Sabouraudia* **15**, 171-7.
10. **Arndt, K. and G. R. Fink (1986)** GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8516-20.
11. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1989)** *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
12. **Bakos, E., R. Evers, G. Szakacs, G. E. Tusnady, E. Welker, K. Szabo, M. de Haas, L. van Deemter, P. Borst, A. Varadi and B. Sarkadi (1998)** Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem* **273**, 32167-75.
13. **Balzi, E. and A. Goffeau (1994)** Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1187**, 152-62.
14. **Balzi, E., M. Wang, S. Leterme, L. Van Dyck and A. Goffeau (1994)** PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J Biol Chem* **269**, 2206-14.
15. **Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson and J. F. Ryley (1985)** A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* **131**, 1217-21.
16. **Bauer, B. E., H. Wolfger and K. Kuchler (1999)** Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 217-36.
17. **Beckerman, J., H. Chibana, J. Turner and P. T. Magee (2001)** Single-copy IMH3 allele is sufficient to confer resistance to mycophenolic acid in *Candida albicans* and to mediate transformation of clinical *Candida* species. *Infect Immun* **69**, 108-14.

18. **Beck-Sague, C. and W. R. Jarvis (1993)** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* **167**, 1247-51.
19. **Bennett, D. E., C. E. McCreary and D. C. Coleman (1998)** Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology* **144**, 55-72.
20. **Bennett, R. J. and A. D. Johnson (2003)** Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J* **22**, 2505-15.
21. **Bentink, S. (2001)** Molekulare Charakterisierung der Inosinmonophosphatdehydrogenase bei *Candida albicans*. In *Fakultät für Biologie*, pp. 69. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
22. **Bernhardt, H. (1998)** [Fungi in the intestine--normal flora or pathogens?]. *Z Arztl Fortbild Qualitätssich* **92**, 154-6.
23. **Bernhardt, J., D. Herman, M. Sheridan and R. Calderone (2001)** Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis* **184**, 1170-5.
24. **Birnboim, H. C. and J. Doly (1979)** Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23 Chlorophorm/Isoamylalkohol.
25. **Bissinger, P. H. and K. Kuchler (1994)** Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J Biol Chem* **269**, 4180-6.
26. **Blasi, E., L. Pitzurra, A. R. Chimienti, R. Mazzolla, M. Puliti, R. Barluzzi and F. Bistoni (1995)** Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to proteolytic activity of macrophages. *Infect Immun* **63**, 1253-7.
27. **Blasi, E., L. Pitzurra, M. Puliti, A. R. Chimienti, R. Mazzolla, R. Barluzzi and F. Bistoni (1995)** Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. *Infect Immun* **63**, 1806-9.
28. **Boeke, J. D., F. LaCrout and G. R. Fink (1984)** A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* **197**, 345-6.
29. **Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000)** A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295-302.
30. **Boy-Marcotte, E., M. Perrot, F. Bussereau, H. Boucherie and M. Jacquet (1998)** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180**, 1044-52.
31. **Boy-Marcotte, E., D. Tadi, M. Perrot, H. Boucherie and M. Jacquet (1996)** High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**, 459-67.
32. **Bradsher, R. W. (1996)** Histoplasmosis and blastomycosis. *Clin Infect Dis* **22**, S102-11.
33. **Brown, A. J. and N. A. Gow (1999)** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**, 333-8.
34. **Bryant, A. E. and D. L. Stevens (1996)** Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* **64**, 358-62.

35. **Bunting, M., D. E. Lorant, A. E. Bryant, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, D. L. Stevens and S. M. Prescott (1997)** Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J Clin Invest* **100**, 565-74.
36. **Calderone, R. A. and P. C. Braun (1991)** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **55**, 1-20.
37. **Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001)** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-35.
38. **Calera, J. A., X. J. Zhao, F. De Bernardis, M. Sheridan and R. Calderone (1999)** Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun* **67**, 4280-4.
39. **Cannon, R. D., H. F. Jenkinson and M. G. Shepherd (1992)** Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **235**, 453-7.
40. **Castro, M., J. A. Bjoraker, M. S. Rohrbach and A. H. Limper (1996)** *Candida albicans* induces the release of inflammatory mediators from human peripheral blood monocytes. *Inflammation* **20**, 107-22.
41. **Castro, M., N. V. Ralston, T. I. Morgenthaler, M. S. Rohrbach and A. H. Limper (1994)** *Candida albicans* stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components. *Infect Immun* **62**, 3138-45.
42. **Chaudhuri, B., S. Ingavale and A. K. Bachhawat (1997)** *apd1+*, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* **145**, 75-83.
43. **Chen, S. C., M. Muller, J. Z. Zhou, L. C. Wright and T. C. Sorrell (1997)** Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis* **175**, 414-20.
44. **Chen, S. C., L. C. Wright, R. T. Santangelo, M. Muller, V. R. Moran, P. W. Kuchel and T. C. Sorrell (1997)** Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **65**, 405-11.
45. **Chen, T., W. Li, P. J. Schulz, A. Furst and P. K. Chien (1995)** Induction of peroxisome proliferation and increase of catalase activity in yeast, *Candida albicans*, by cadmium. *Biol Trace Elem Res* **50**, 125-33.
46. **Chen, X., B. B. Magee, D. Dawson, P. T. Magee and C. A. Kumamoto (2004)** Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **51**, 551-65.
47. **Chiang, T. Y. and G. A. Marzluf (1994)** DNA recognition by the NIT2 nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon NIT2 binding. *Biochemistry* **33**, 576-82.
48. **Choi, J. H., W. Lou and A. Vancura (1998)** A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 29915-22.
49. **Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero and P. Hieter (1992)** Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-22.
50. **Christin, L., D. R. Wysong, T. Meshulam, S. Wang and R. D. Diamond (1997)** Mechanisms and target sites of damage in killing of *Candida albicans* hyphae by human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* **176**, 1567-78.

51. **Coffman, J. A. and T. G. Cooper (1997)** Nitrogen GATA factors participate in transcriptional regulation of vacuolar protease genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 5609-13.
52. **Cole, S. P. and R. G. Deeley (1998)** Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* **20**, 931-40.
53. **Coleman, D. C., D. E. Bennett, D. J. Sullivan, P. J. Gallagher, M. C. Henman, D. B. Shanley and R. J. Russell (1993)** Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol* **19**, 61-82.
54. **Colmer, J. A., J. A. Fralick and A. N. Hamood (1998)** Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **27**, 63-72.
55. **Costa, A. L. and F. Romano (1967)** [Morphological and cytochemical aspects of vaginal *Candida albicans*. Preliminary note]. *Boll Soc Ital Biol Sper* **43**, 1311-4.
56. **Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. C. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum and J. R. Perfect (2001)** Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**, 166-75.
57. **Csank, C., C. Makris, S. Meloche, K. Schroppel, M. Rollinghoff, D. Dignard, D. Y. Thomas and M. Whiteway (1997)** Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **8**, 2539-51.
58. **Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne and A. Elofsson (1997)** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**, 673-6.
59. **Cutler, J. E. (1991)** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
60. **Cutler, J. E. and A. H. Poor (1981)** Effect of mouse phagocytes on *Candida albicans* in in vivo chambers. *Infect Immun* **31**, 1110-6.
61. **De Backer, M. D., P. T. Magee and J. Pla (2000)** Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **54**, 463-98.
62. **De Groot, P. W., K. J. Hellingwerf and F. M. Klis (2003)** Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781-96.
63. **De Sampaio, G., J. P. Bourdineaud and G. J. Lauquin (1999)** A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol* **34**, 247-56.
64. **Decottignies, A. and A. Goffeau (1997)** Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**, 137-45.
65. **Del Sorbo, G., H. Schoonbeek and M. A. De Waard (2000)** Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol* **30**, 1-15.
66. **Delbruck, S. and J. F. Ernst (1993)** Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **10**, 859-66.
67. **Denis, C. L. (1984)** Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* **108**, 833-44.
68. **Denis, C. L. and T. Malvar (1990)** The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression. *Genetics* **124**, 283-91.
69. **Deva, R., R. Ciccoli, T. Schewe, J. L. Kock and S. Nigam (2000)** Arachidonic acid stimulates cell growth and forms a novel oxygenated metabolite in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 299-311.

70. **Devereux, J., P. Haerberli and O. Smithies (1984)** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**, 387-95.
71. **Diamond, R. D., R. A. Clark and C. C. Haudenschild (1980)** Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* **66**, 908-17.
72. **Diamond, R. D., C. A. Lyman and D. R. Wysong (1991)** Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. *J Clin Invest* **87**, 711-20.
73. **Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt and M. A. Pfaller (2002)** Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* **40**, 1298-302.
74. **Divecha, N. and R. F. Irvine (1995)** Phospholipid signaling. *Cell* **80**, 269-78.
75. **Dupont, B., J. R. Graybill, D. Armstrong, R. Laroche, J. E. Touze and L. J. Wheat (1992)** Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* **30**, 19-28.
76. **Dupont, P. F. (1995)** *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J Am Podiatr Med Assoc* **85**, 104-15.
77. **Eckmann, L., S. L. Reed, J. R. Smith and M. F. Kagnoff (1995)** *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J Clin Invest* **96**, 1269-79.
78. **Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones and R. P. Wenzel (1999)** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three- year analysis. *Clin Infect Dis* **29**, 239-44.
79. **Enjalbert, B., A. Nantel and M. Whiteway (2003)** Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**, 1460-7.
80. **Falcon-Perez, J. M., M. J. Mazon, J. Molano and P. Eraso (1999)** Functional domain analysis of the yeast ABC transporter Ycf1p by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 23584-90.
81. **Falkow, S. (1988)** Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* **10**, S274-6.
82. **Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schafer and B. Hube (2002)** *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* **70**, 3689-700.
83. **Fidel, P. L., Jr. (2002)** Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* **40**, 359-75.
84. **Fidel, P. L., Jr. (2002)** Immunity to *Candida*. *Oral Dis* **8**, 69-75.
85. **Filler, S. G., B. O. Ibe, P. M. Lockett, J. U. Raj and J. E. Edwards, Jr. (1991)** *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis* **164**, 928-35.
86. **Fisher-Hoch, S. P. and L. Hutwagner (1995)** Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. *Clin Infect Dis* **21**, 897-904.
87. **Fonzi, W. A. and M. Y. Irwin (1993)** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-28.

88. **Fradin, C., M. Kretschmar, T. Nichterlein, C. Gaillardin, C. d'Enfert and B. Hube (2003)** Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **47**, 1523-43.
89. **Franklin, T. J. and J. M. Cook (1969)** The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J* **113**, 515-24.
90. **Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke and J. Morschhauser (1998)** Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3065-72.
91. **Franz, R., S. Michel and J. Morschhauser (1998)** A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters. *Gene* **220**, 91-8.
92. **Fridkin, S. K. and W. R. Jarvis (1996)** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* **9**, 499-511.
93. **Gadsby, D. C. and A. C. Nairn (1994)** Regulation of CFTR channel gating. *Trends Biochem Sci* **19**, 513-8.
94. **Gale, C. A., C. M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J. M. Becker, J. Berman and M. K. Hostetter (1998)** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **279**, 1355-8.
95. **Galgiani, J. N. and N. M. Ampel (1990)** *Coccidioides immitis* in patients with human immunodeficiency virus infections. *Semin Respir Infect* **5**, 151-4.
96. **Ganz, T. and R. I. Lehrer (1999)** Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* **5**, 292-7. _00001490 _.
97. **Garbino, J., L. Kolarova, D. Lew, B. Hirschel and P. Rohner (2001)** Fungemia in HIV-infected patients: a 12-year study in a tertiary care hospital. *AIDS Patient Care STDS* **15**, 407-10.
98. **Garcia, M. G., J. E. O'Connor, L. L. Garcia, S. I. Martinez, E. Herrero and L. del Castillo Agudo (2001)** Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to URA3, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* *aft1* mutation. *Yeast* **18**, 301-11.
99. **Georgopapadakou, N. H. (1998)** Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* **1**, 547-57.
100. **Georgopapadakou, N. H. (2001)** Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3- glucan synthase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 269-80.
101. **Gerber, L. D., K. Kodukula and S. Udenfriend (1992)** Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **267**, 12168-73.
102. **Ghannoum, M. A. (2000)** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**, 122-43, table of contents.
103. **Ghosh, M., J. Shen and B. P. Rosen (1999)** Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5001-6.
104. **Ghosh, S., J. C. Strum and R. M. Bell (1997)** Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *Faseb J* **11**, 45-50.
105. **Gillum, A. M., E. Y. Tsay and D. R. Kirsch (1984)** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-82.

106. **Goodwin, T. J. and R. T. Poulter (2000)** Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Res* **10**, 174-91.
107. **Gottesman, M. M., C. A. Hrycyna, P. V. Schoenlein, U. A. Germann and I. Pastan (1995)** Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet* **29**, 607-49.
108. **Gow, N. A. (1994)** Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology* **140**, 3193-205.
109. **Gow, N. A. (1997)** Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* **8**, 43-55.
110. **Grandis, C., M. E. Balagna, M. Malandrino and A. Marocco (1991)** Fungal infections: correlation with previous treatment and use of antimycogram. *J Chemother* **3 Suppl 1**, 86-8.
111. **Graser, Y., M. Volovsek, J. Arrington, G. Schonian, W. Presber, T. G. Mitchell and R. Vilgalys (1996)** Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12473-7.
112. **Hacker, J. (2000)** *Candida albicans*. In *Molekulare Infektionsbiologie*, pp. 240-7. Edited by J. Hacker & J. Heesemann. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
113. **Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa and K. Kitada (1998)** Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 26946-53.
114. **Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa, N. Yabuki and K. Kitada (1999)** Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* **181**, 3886-9.
115. **Hanel, H., I. Menzel and H. Holzmann (1988)** [High phospholipase A-activity of *Candida albicans* isolated from the intestines of psoriatic patients]. *Mycoses* **31**, 451-3.
116. **Harris, A. and B. E. Argent (1993)** The cystic fibrosis gene and its product CFTR. *Semin Cell Biol* **4**, 37-44.
117. **Hazen, K. C. (1995)** New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* **8**, 462-78.
118. **Hendrich, B. D. and H. F. Willard (1995)** Epigenetic regulation of gene expression: the effect of altered chromatin structure from yeast to mammals. *Hum Mol Genet* **4**, 1765-77.
119. **Higgins, C. F. (1992)** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
120. **Hinder, B., M. Schellenberg, S. Rodoni, S. Ginsburg, E. Vogt, E. Martinoia, P. Matile and S. Hortensteiner (1996)** How plants dispose of chlorophyll catabolites. Directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles. *J Biol Chem* **271**, 27233-6.
121. **Hinnebusch, A. G. (1997)** Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J Biol Chem* **272**, 21661-4.
122. **Hoover, C. I., M. J. Jantapour, G. Newport, N. Agabian and S. J. Fisher (1998)** Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 163-9.
123. **Hortensteiner, S., E. Vogt, B. Hagenbuch, P. J. Meier, N. Amrhein and E. Martinoia (1993)** Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. *J Biol Chem* **268**, 18446-9.
124. **Hube, B., D. Hess, C. A. Baker, M. Schaller, W. Schafer and J. W. Dolan (2001)** The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**, 879-89.
125. **Hube, B. and J. Naglik (2001)** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**, 1997-2005.
126. **Hull, C. M. and A. D. Johnson (1999)** Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-5.

127. **Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nozawa and M. A. Ghannoum (1995)** Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**, 1993-8.
128. **Jentoft, N. (1990)** Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**, 291-4.
129. **Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres and E. Balish (1995)** Defective killing of *Candida albicans* hyphae by neutrophils from beige mice. *J Infect Dis* **171**, 1664-7.
130. **Kagawa, D., T. Nakamura, T. Ueda, S. Ando, H. Tsutani, M. Uchida, N. Domae, M. Sasada and H. Uchino (1986)** Reverse effect of guanine on the inhibitory action of mycophenolic acid during nucleic acid synthesis. *Anticancer Res* **6**, 643-8.
131. **Kalo-Klein, A. and S. S. Witkin (1990)** Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun* **58**, 260-2.
132. **Kamaya, T. (1970)** Lytic action of lysozyme on *Candida albicans*. *Mycopathol Mycol Appl* **42**, 197-207.
133. **Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van den Ende and F. M. Klis (2000)** The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall defective mutants. *Mol Micro* **35**, 601-11.
134. **Katzmann, D. J., T. C. Hallstrom, M. Voet, W. Wysock, J. Golin, G. Volckaert and W. S. Moye-Rowley (1995)** Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 6875-83.
135. **Kim, U. J., H. Shizuya, P. J. de Jong, B. Birren and M. I. Simon (1992)** Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res* **20**, 1083-5.
136. **Kirsch, D. R. and R. R. Whitney (1991)** Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**, 3297-300.
137. **Klein, R. S., C. A. Harris, C. B. Small, B. Moll, M. Lesser and G. H. Friedland (1984)** Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **311**, 354-8.
138. **Klionsky, D. J., P. K. Herman and S. D. Emr (1990)** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**, 266-92.
139. **Klotz, S. A., D. J. Drutz, J. L. Harrison and M. Huppert (1983)** Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun* **42**, 374-84.
140. **Koelsch, G., J. Tang, J. A. Loy, M. Monod, K. Jackson, S. I. Foundling and X. Lin (2000)** Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1480**, 117-31.
141. **Kohler, G. A., T. C. White and N. Agabian (1997)** Overexpression of a cloned IMP dehydrogenase gene of *Candida albicans* confers resistance to the specific inhibitor mycophenolic acid. *J Bacteriol* **179**, 2331-8.
142. **Kozak, M. (1981)** Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res* **9**, 5233-62.
143. **Krcmery, V. and A. J. Barnes (2002)** Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* **50**, 243-60.
144. **Kretschmar, M., T. Bertsch, M. Goller, M. Schaller, H. Hof and T. Nichterlein (1999)** Parameters for determination of *Candida albicans* virulence in murine peritonitis. *Mycoses* **42**, 19-24.
145. **Kretschmar, M., A. Felk, P. Staib, M. Schaller, D. Hess, M. Callapina, J. Morschhauser, W. Schafer, H. C. Korting, H. Hof, B. Hube and T. Nichterlein (2002)** Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of

- Candida albicans are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. *Microb Pathog* **32**, 61-70.
146. **Kretschmar, M., B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof and T. Nichterlein (1999)** Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* **67**, 6637-42.
147. **Kuchler, K., R. E. Sterne and J. Thorner (1989)** *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *Embo J* **8**, 3973-84.
148. **Kuchler, K. and J. Thorner (1992)** Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocr Rev* **13**, 499-514.
149. **Kullberg, B. J. and A. M. Oude Lashof (2002)** Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* **7**, 183-91.
150. **Kunze, I. I., G. Hensel, K. Adler, J. Bernard, B. Neubohn, C. Nilsson, R. Stoltenburg, S. D. Kohlwein and G. Kunze (1999)** The green fluorescent protein targets secretory proteins to the yeast vacuole. *Biochim Biophys Acta* **1410**, 287-98.
151. **Lane, T. and J. R. Garcia (1991)** Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses* **34**, 217-20.
152. **Langenbeck, B. (1839)** Auffindung von Pilzen aus der Schleimhaut der Speiseröhre einer Typhus-Leiche. *Neue Not Geb Natur-u-Heilk (Froriep)* **12**, 145-7.
153. **Lay, J., L. K. Henry, J. Clifford, Y. Koltin, C. E. Bulawa and J. M. Becker (1998)** Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**, 5301-6.
154. **Lee, K. L., H. R. Buckley and C. C. Campbell (1975)** An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabouraudia* **13**, 148-53.
155. **Lee, K. S., J. L. Patton, M. Fido, L. K. Hines, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, S. A. Henry and D. E. Levin (1994)** The *Saccharomyces cerevisiae* PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J Biol Chem* **269**, 19725-30.
156. **Lee, S. A., S. Wormsley, S. Kamoun, A. F. Lee, K. Joiner and B. Wong (2003)** An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer-based prediction algorithms. *Yeast* **20**, 595-610.
157. **Lehrer, R. I., T. Ganz, D. Szklarek and M. E. Selsted (1988)** Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest* **81**, 1829-35.
158. **Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa and M. A. Ghannoum (1998)** Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 26078-86.
159. **Li, Z. S., Y. P. Lu, R. G. Zhen, M. Szczypka, D. J. Thiele and P. A. Rea (1997)** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 42-7.
160. **Li, Z. S., M. Szczypka, Y. P. Lu, D. J. Thiele and P. A. Rea (1996)** The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S- conjugate pump. *J Biol Chem* **271**, 6509-17.
161. **Listemann, H. and W. Meigel (1995)** [HIV-associated mycoses]. *Mycoses* **38**, 40-4.

162. **Liu, H., J. Kohler and G. R. Fink (1994)** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* **266**, 1723-6.
163. **Liu, H. Y., V. Badarinarayana, D. C. Audino, J. Rappsilber, M. Mann and C. L. Denis (1998)** The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *Embo J* **17**, 1096-106.
164. **Liu, H. Y., J. H. Toyn, Y. C. Chiang, M. P. Draper, L. H. Johnston and C. L. Denis (1997)** DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *Embo J* **16**, 5289-98.
165. **Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti and G. R. Fink (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-49.
166. **Long-Krug, S. A., K. J. Fischer, R. M. Hysmith and J. I. Ravdin (1985)** Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis* **152**, 536-41.
167. **Lu, C. F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. Klis, J. Kurjan, H. Bussey and P. N. Lipke (1995)** Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **128**, 333-40.
168. **Lyons, C. N. and T. C. White (2000)** Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2296-303.
169. **MacFarlane, M. G. and B. C. J. G. Knight (1941)** The biochemistry of bacterial toxins. I. Lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem J* **35**, 884-902.
170. **Macphail, G. L., G. D. Taylor, M. Buchanan-Chell, C. Ross, S. Wilson and A. Kureishi (2002)** Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. *Mycoses* **45**, 141-5.
171. **Mager, W. H. and A. J. De Kruijff (1995)** Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* **59**, 506-31.
172. **Manning, M. and T. G. Mitchell (1980)** Strain variation and morphogenesis of yeast- and mycelial-phase *Candida albicans* in low-sulfate, synthetic medium. *J Bacteriol* **142**, 714-9.
173. **Marchler, G., C. Schuller, G. Adam and H. Ruis (1993)** A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *Embo J* **12**, 1997-2003.
174. **Marodi, L., H. M. Korchak and R. B. Johnston, Jr. (1991)** Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **146**, 2783-9.
175. **Martinez, E., B. Segui-Real, E. Siles, M. J. Mazon and I. V. Sandoval (1999)** The prepropeptide of vacuolar aminopeptidase I is necessary and sufficient to target the fluorescent reporter protein GFP to the vacuole of yeast by the Ccvt pathway. *Mol Microbiol* **33**, 52-62.
176. **Marzluf, G. A. (1997)** Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32.
177. **Merkel, O., M. Fido, J. A. Mayr, H. Pruger, F. Raab, G. Zandonella, S. D. Kohlwein and F. Paltauf (1999)** Characterization and function in vivo of two novel phospholipases B/lysophospholipases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 28121-7.
178. **Meyers, D. J. and R. S. Berk (1990)** Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. *Infect Immun* **58**, 659-66.

179. **Millon, L., A. Manteaux, G. Reboux, C. Drobacheff, M. Monod, T. Barale and Y. Michel-Briand (1994)** Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* **32**, 1115-8.
180. **Mirbod, F., Y. Banno, M. A. Ghannoum, A. S. Ibrahim, S. Nakashima, Y. Kitajima, G. T. Cole and Y. Nozawa (1995)** Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h- LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1257**, 181-8.
181. **Mitchell, T. G. and J. R. Perfect (1995)** Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* **8**, 515-48.
182. **Morris, A., C. B. Beard and L. Huang (2002)** Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infect* **4**, 95-103.
183. **Morschhauser, J., S. Michel and J. Hacker (1998)** Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* **257**, 412-20.
184. **Morschhauser, J., S. Michel and P. Staib (1999)** Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* **32**, 547-56.
185. **Mukherjee, P. K., J. Chandra, D. M. Kuhn and M. A. Ghannoum (2003)** Defferential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology* **149**, 261-7.
186. **Mukherjee, P. K., K. R. Seshan, S. D. Leidich, J. Chandra, G. T. Cole and M. A. Ghannoum (2001)** Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* **147**, 2585-97.
187. **Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
188. **Munro, C. A. and B. Hube (2002)** Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol* **10**, 173-7.
189. **Musial, C. E., F. R. Cockerill, 3rd and G. D. Roberts (1988)** Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev* **1**, 349-64.
190. **Natarajan, K., M. R. Meyer, B. M. Jackson, D. Slade, C. Roberts, A. G. Hinnebusch and M. J. Marton (2001)** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4347-68.
191. **Navarro-Garcia, F., M. Sanchez, C. Nombela and J. Pla (2001)** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-68.
192. **Neely, M. N. and M. A. Ghannoum (2000)** The exciting future of antifungal therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 897-914.
193. **Neufeld, E. B., A. T. Remaley, S. J. Demosky, J. A. Stonik, A. M. Cooney, M. Comly, N. K. Dwyer, M. Zhang, J. Blanchette-Mackie, S. Santamarina-Fojo and H. B. Brewer, Jr. (2001)** Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* **276**, 27584-90.
194. **Newport, G., A. Kuo, A. Flattery, C. Gill, J. J. Blake, M. B. Kurtz, G. K. Abruzzo and N. Agabian (2003)** Inactivation of Kex2p diminishes the virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **278**, 1713-20.
195. **Neyfakh, A. A. (2002)** Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol Microbiol* **44**, 1123-30.
196. **Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Eng* **10**, 1-6.

197. **Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, K. M. Pang and T. Hamada (1993)** The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* **38**, 1057-63.
198. **Noverr, M. C., S. M. Phare, G. B. Toews, M. J. Coffey and G. B. Huffnagle (2001)** Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* **69**, 2957-63.
199. **Odds, F. C. (1985)** Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **12**, 45-93.
200. **Odds, F. C. (1988)** *Candida and Candidiasis*. London: Bailliere Tindall.
201. **Odds, F. C. (1994)** Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**, S2-5.
202. **Odds, F. C. (1997)** Mycology in oral pathology. *Acta Stomatol Belg* **94**, 75-80.
203. **Oliphant, A. R., C. J. Brandl and K. Struhl (1989)** Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. *Mol Cell Biol* **9**, 2944-9.
204. **Oppenheim, F. G., T. Xu, F. M. McMillian, S. M. Levitz, R. D. Diamond, G. D. Offner and R. F. Troxler (1988)** Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **263**, 7472-7.
205. **Ortiz, D. F., M. V. St Pierre, A. Abdulmessih and I. M. Arias (1997)** A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* **272**, 15358-65.
206. **Petrovic, S., L. Pascolo, R. Gallo, F. Cupelli, J. D. Ostrow, A. Goffeau, C. Tiribelli and C. V. Bruschi (2000)** The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 561-71.
207. **Pfaller, M. A. (1996)** Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22 Suppl 2**, S89-94.
208. **Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis and S. A. Messer (2001)** International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* **39**, 3254-9.
209. **Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, A. C. Fluit, J. Verhoef, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman and R. J. Hollis (1999)** International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* **35**, 19-25.
210. **Phan, Q. T., P. H. Belanger and S. G. Filler (2000)** Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun* **68**, 3485-90.
211. **Pickard, R. T., X. G. Chiou, B. A. Striffler, M. R. DeFelippis, P. A. Hyslop, A. L. Tebbe, Y. K. Yee, L. J. Reynolds, E. A. Dennis, R. M. Kramer and J. D. Sharp (1996)** Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine. *J Biol Chem* **271**, 19225-31.
212. **Piper, P., Y. Mahe, S. Thompson, R. Pandjaitan, C. Holyoak, R. Egner, M. Muhlbauer, P. Coote and K. Kuchler (1998)** The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *Embo J* **17**, 4257-65.

213. **Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau and E. Balzi (1995)** Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**, 320-9.
214. **Prasad, R., S. K. Murthy and V. Gupta (1995)** Multiple drug resistance in *Candida albicans*. *Acta Biochim Pol* **42**, 497-504.
215. **Price, M. F., I. D. Wilkinson and L. O. Gentry (1982)** Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **20**, 7-14.
216. **Puri, N., S. Krishnamurthy, S. Habib, S. E. Hasnain, S. K. Goswami and R. Prasad (1999)** CDR1, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multiple regulatory domains in its promoter and the distal AP-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 213-9.
217. **Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender and T. Werner (1995)** MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Research* **23**, 4878-84.
218. **Quinn, C. M., V. C. Bugeja, J. A. Gallagher and P. A. Whittaker (1990)** The effect of mycophenolic acid on the cell cycle of *Candida albicans*. *Mycopathologia* **111**, 165-8.
219. **Ravdin, J. I., C. F. Murphy, R. L. Guerrant and S. A. Long-Krug (1985)** Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **152**, 542-9.
220. **Raymond, M., D. Dignard, A. M. Alarco, N. Mainville, B. B. Magee and D. Y. Thomas (1998)** A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the a-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**, 587-98.
221. **Rebbeer, J. F., G. C. Connolly, M. E. Dumont and N. Ballatori (1998)** ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J Biol Chem* **273**, 33449-54.
222. **Redmond, H. P., J. Shou, H. J. Gallagher, C. J. Kelly and J. M. Daly (1993)** Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms. *J Immunol* **150**, 3427-33.
223. **Rezusta, A., M. C. Alejandre, J. Gill, M. C. Rubio and M. S. Salvo (1991)** Phospholipase activity in *Candida albicans*, *Candida SPP* and other yeasts. In *Candida and Candidamycesis*. Edited by E. T. e. al. New York: Plenum Press.
224. **Riordan, J. R. (1999)** Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet* **64**, 1499-504.
225. **Riordan, J. R. and X. B. Chang (1992)** CFTR, a channel with the structure of a transporter. *Biochim Biophys Acta* **1101**, 221-2.
226. **Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou and et al. (1989)** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-73.
227. **Ripeau, J. S., M. Fiorillo, F. Aumont, P. Belhumeur and L. de Repentigny (2002)** Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. *J Infect Dis* **185**, 1094-102.
228. **Rockwell, N. C., D. J. Krysan, T. Komiyama and R. S. Fuller (2002)** Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* **102**, 4525-48.

229. **Roilides, E., C. A. Lyman, T. Sein, C. Gonzalez and T. J. Walsh (2000)** Antifungal activity of splenic, liver and pulmonary macrophages against *Candida albicans* and effects of macrophage colony-stimulating factor. *Med Mycol* **38**, 161-8.
230. **Roldan-Arjona, T., C. Anselmino and T. Lindahl (1996)** Molecular cloning and functional analysis of a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of *Escherichia coli* endonuclease III. *Nucleic Acids Res* **24**, 3307-12.
231. **Rolfes, R. J. and A. G. Hinnebusch (1993)** Translation of the yeast transcriptional activator GCN4 is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol* **13**, 5099-111.
232. **Rost, B., P. Fariselli and R. Casadio (1996)** Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **5**, 1704-18.
233. **Ruchel, R., S. Kellner and M. Schaffrinski (2002)** Renewed increase in *Candida albicans* among yeast isolates from the Göttingen university hospital. *Mycoses* **45**, 109-10.
234. **Saffer, L. D. and J. D. Schwartzman (1991)** A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* **38**, 454-60.
235. **Salminen, S., E. Isolauri and T. Onnela (1995)** Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy* **41**, 5-15.
236. **Samaranayake, L. P., J. M. Raeside and T. W. MacFarlane (1984)** Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* **22**, 201-7.
237. **Samaranayake, L. P., R. S. Tobgi and T. W. MacFarlane (1994)** Anti-*Candida* activity of murine bronchoalveolar lavage fluid. *J Med Microbiol* **40**, 350-7.
238. **Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989)** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2 edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
239. **Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
240. **Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod and J. Bille (1997)** Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**, 405-16.
241. **Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod and J. Bille (1995)** Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2378-86.
242. **Santoni, G., P. Birarelli, L. J. Hong, A. Gamero, J. Y. Djeu and M. Piccoli (1995)** An alpha 5 beta 1-like integrin receptor mediates the binding of less pathogenic *Candida* species to fibronectin. *J Med Microbiol* **43**, 360-7.
243. **Santoni, G., A. Gismondi, J. H. Liu, A. Punturieri, A. Santoni, L. Frati, M. Piccoli and J. Y. Djeu (1994)** *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to alpha 5 beta 1 integrin. *Microbiology* **140**, 2971-9.
244. **Santos, M. A., T. Ueda, K. Watanabe and M. F. Tuite (1997)** The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Mol Microbiol* **26**, 423-31.
245. **Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. Chen and B. Hube (1999)** Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* **34**, 169-80.

246. **Schaller, M., C. Schackert, H. C. Korting, E. Januschke and B. Hube (2000)** Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114**, 712-7.
247. **Schaller, M., W. Schafer, H. C. Korting and B. Hube (1998)** Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**, 605-15.
248. **Schmid, J., S. Herd, P. R. Hunter, R. D. Cannon, M. S. Yasin, S. Samad, M. Carr, D. Parr, W. McKinney, M. Schousboe, B. Harris, R. Ikram, M. Harris, A. Restrepo, G. Hoyos and K. P. Singh (1999)** Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patient types and types of infection. *Microbiology* **145**, 2405-13.
249. **Schmid, J., P. R. Hunter, G. C. White, A. K. Nand and R. D. Cannon (1995)** Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens. *J Clin Microbiol* **33**, 2920-6.
250. **Schroppel, K., K. Sprosser, M. Whiteway, D. Y. Thomas, M. Rollinghoff and C. Csank (2000)** Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun* **68**, 7159-61.
251. **Schuller, C., J. L. Brewster, M. R. Alexander, M. C. Gustin and H. Ruis (1994)** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *Embo J* **13**, 4382-9.
252. **Schweizer, A., S. Rupp, B. N. Taylor, M. Rollinghoff and K. Schroppel (2000)** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435-45.
253. **Sepkowitz, K. A. (2002)** Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis* **34**, 1098-107.
254. **Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd and W. A. Fonzi (1999)** HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol* **181**, 5273-9.
255. **Singh, N. (2001)** Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* **33**, 1692-6.
256. **Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy and H. Goldfine (1995)** The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**, 4231-7.
257. **Smolenski, G., P. A. Sullivan, S. M. Cutfield and J. F. Cutfield (1997)** Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. *Microbiology* **143**, 349-56.
258. **Smriti, S. Krishnamurthy, B. L. Dixit, C. M. Gupta, S. Milewski and R. Prasad (2002)** ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* **19**, 303-18.
259. **Sohnle, P. G., B. L. Hahn and V. Santhanagopalan (1996)** Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *J Infect Dis* **174**, 1369-72.
260. **Soll, D. R. (1992)** High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**, 183-203.

261. **Soll, D. R. (1997)** Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 279-88.
262. **Soll, D. R. (2004)** Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* **26**, 10-20.
263. **Songer, J. G. (1997)** Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**, 156-61.
264. **Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
265. **Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel and P. Sundstrom (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-8.
266. **Staub, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhauser (2000)** Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6102-7.
267. **Staub, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhauser (2002)** Host versus in vitro signals and intrastain allelic differences in the expression of a *Candida albicans* virulence gene. *Mol Microbiol* **44**, 1351-66.
268. **Staub, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhauser (2002)** Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. *Infect Immun* **70**, 921-7.
269. **Staub, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, G. Kohler, S. Michel, H. Hof, J. Hacker and J. Morschhauser (1999)** Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol* **32**, 533-46.
270. **Staub, P., S. Michel, G. Kohler and J. Morschhauser (2000)** A molecular genetic system for the pathogenic yeast *Candida dubliniensis*. *Gene* **242**, 393-8.
271. **Staub, P., G. P. Moran, D. J. Sullivan, D. C. Coleman and J. Morschhauser (2001)** Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*. *J Bacteriol* **183**, 2859-65.
272. **Steele, C., J. Leigh, R. Swoboda and P. L. Fidel, Jr. (2000)** Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis* **182**, 1479-85.
273. **Steele, C., J. Leigh, R. Swoboda, H. Ozenci and P. L. Fidel, Jr. (2001)** Potential role for a carbohydrate moiety in anti-*Candida* activity of human oral epithelial cells. *Infect Immun* **69**, 7091-9.
274. **Steele, C., H. Ozenci, W. Luo, M. Scott and P. L. Fidel, Jr. (1999)** Growth inhibition of *Candida albicans* by vaginal cells from naive mice. *Med Mycol* **37**, 251-9.
275. **Strauss, A., S. Michel and J. Morschhauser (2001)** Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**, 3761-9.
276. **Struhl, K. (1985)** Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8419-23.
277. **Struhl, K. (1987)** Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**, 295-7.
278. **Sugiyama, Y., S. Nakashima, F. Mirbod, H. Kanoh, Y. Kitajima, M. A. Ghannoum and Y. Nozawa (1999)** Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPLB2 from *Candida albicans*. *Med Mycol* **37**, 61-7.

279. **Sullivan, D. J., T. J. Westerneng, K. A. Haynes, D. E. Bennett and D. C. Coleman (1995)** *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141**, 1507-21.
280. **Sundstrom, P. (2002)** Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**, 461-9.
281. **Sundstrom, P., J. E. Cutler and J. F. Staab (2002)** Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus. *Infect Immun* **70**, 3281-3.
282. **Szczypka, M. S., J. A. Wemmie, W. S. Moye-Rowley and D. J. Thiele (1994)** A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**, 22853-7.
283. **Taglicht, D. and S. Michaelis (1998)** *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol* **292**, 130-62.
284. **Theiss, S., I. Ganchimeg, M. Kretschmar, T. Nichterlein, L. A. Murillo, J. Hacker, N. Santosh, N. Agabian and G. A. Kohler (2004)** Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Eingereicht bei IJMM*.
285. **Theiss, S., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, N. Agabian, J. Hacker and G. A. Kohler (2002)** Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. *Mol Microbiol* **43**, 571-84.
286. **Thompson, H. L. and J. M. Wilton (1992)** Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol* **87**, 316-21.
287. **Tobgi, R. S., L. P. Samaranyake and T. W. MacFarlane (1988)** In vitro susceptibility of *Candida* species to lysozyme. *Oral Microbiol Immunol* **3**, 35-9.
288. **Toone, W. M. and N. Jones (1999)** AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 55-61.
289. **Tripathi, G., C. Wiltshire, S. Macaskill, H. Tourneu, S. Budge and A. J. Brown (2002)** Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *Embo J* **21**, 5448-56.
290. **Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis and R. Parker (2001)** The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 377-86.
291. **Tusnady, G. E., E. Bakos, A. Varadi and B. Sarkadi (1997)** Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**, 1-3.
292. **Urban, M., T. Bhargava and J. E. Hamer (1999)** An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *Embo J* **18**, 512-21.
293. **Van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek and G. Opdenakker (1998)** Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**, 151-208.
294. **van Veen, H. W. and W. N. Konings (1997)** Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin Cancer Biol* **8**, 183-91.
295. **Vazquez-Torres, A. and E. Balish (1997)** Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 170-92.
296. **Vida, T. A. and S. D. Emr (1995)** A new stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* **128**, 779-92.

297. **Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. De Pauw and F. Meunier (1999)** Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* **28**, 1071-9.
298. **Voss, A., M. A. Pfaller, R. J. Hollis, J. Rhine-Chalberg and B. N. Doebbeling (1995)** Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods. *J Clin Microbiol* **33**, 576-80.
299. **Wach, A., A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung and P. Philippsen (1997)** Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1065-75.
300. **Walker, J. E., A. Eberle, N. J. Gay, M. J. Runswick and M. Saraste (1982)** Conservation of structure in proton-translocating ATPases of *Escherichia coli* and mitochondria. *Biochem Soc Trans* **10**, 203-6.
301. **Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick and N. J. Gay (1982)** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**, 945-51.
302. **Wätjen, W. and D. Beyersmann (2004)** Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals* **17**, 65-78.
303. **Wemmie, J. A. and W. S. Moye-Rowley (1997)** Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Mol Microbiol* **25**, 683-94.
304. **Wemmie, J. A., A. L. Wu, K. D. Harshman, C. S. Parker and W. S. Moye-Rowley (1994)** Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* **269**, 14690-7.
305. **Werner, H. (1966)** [Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **200**, 113-24.
306. **Werner-Washburne, M., E. Braun, G. C. Johnston and R. A. Singer (1993)** Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **57**, 383-401.
307. **Whelan, W. L. and P. T. Magee (1981)** Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **145**, 896-903.
308. **White, T. C. and N. Agabian (1995)** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* **177**, 5215-21.
309. **White, T. C., K. A. Marr and R. A. Bowden (1998)** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382-402.
310. **Williamson, M. I., L. P. Samaranyake and T. W. MacFarlane (1986)** Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **24**, 415-7.
311. **Wirsching, S., S. Michel, G. Kohler and J. Morschhauser (2000)** Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* **182**, 400-4.
312. **Wirsching, S., S. Michel and J. Morschhauser (2000)** Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* **36**, 856-65.
313. **Witt, W., A. Mertsching and E. König (1984)** Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **795**, 117-24.

314. **Witt, W., M. E. Schweingruber and A. Mertsching (1984)** Phospholipase B from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Separation of two forms with different carbohydrate content. *Biochim Biophys Acta* **795**, 108-16.
315. **Wolfger, H., Y. M. Mamnun and K. Kuchler (2001)** Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* **152**, 375-89.
316. **Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael and M. W. Graham (1989)** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-78.
317. **Woods, J. P. (2002)** *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol* **35**, 81-97.
318. **Xu, T., S. M. Levitz, R. D. Diamond and F. G. Oppenheim (1991)** Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* **59**, 2549-54.
319. **Yang, R., S. A. Wek and R. C. Wek (2000)** Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol* **20**, 2706-17.
320. **Yeaman, M. R., A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, Jr., A. S. Bayer and M. A. Ghannoum (1993)** Thrombin-induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 546-53.
321. **Yoshikai, Y. (2001)** Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis* **14**, 257-63.
322. **Zervos, M. J. and J. A. Vazquez (1996)** DNA analysis in the study of fungal infections in the immunocompromised host. *Clin Lab Med* **16**, 73-88.
323. **Zielenski, J. and L. C. Tsui (1995)** Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* **29**, 777-807.
324. **Zink, S., T. Nass, P. Rosen and J. F. Ernst (1996)** Migration of the fungal pathogen *Candida albicans* across endothelial monolayers. *Infect Immun* **64**, 5085-91.

VIII ANHANG

1. Abkürzungen

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erklärt.

Tabelle 12: **Abkürzungsverzeichnis.**

<i>ABC</i>	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AN	<i>accession number</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basepaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFU	<i>colony forming units</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FRT	<i>FLP recognition target</i>
g	Gramm
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
IMP	Inosinmonophosphat
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
kb	Kilobassenpaare
LP	Lysophospholipase
LPTA	Lysophospholipase-Transacylaseaktivität
MDR	multiple Drogenresistenz

MHK	minimale Hemmkonzentration
M	Mol
m	milli
min	Minuten
μ	Micro
MPA	Mykophenolsäure
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBD	Nukleotid bindende Domäne
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
p	piko
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR	pleiotrope Drogenresistenz
p. i.	<i>post infection</i>
PLA, PLB, PLC, PLD	Phospholipase A, B, C und D
Pos.	Position
RI	relative Signalintensität
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
s. u.	siehe unten
SAP	Saure Aspartyl-Protease
SGD	Sacharomyces Genomdatenbank
STRE	<i>Stress-Responsive-Element</i>
Tab.	Tabelle
TCS	TAE-Consensussequenz
TMD	Transmembrandomäne
u. a.	unter anderem / und andere
u. a. m.	und andere mehr
ÜN	über Nacht
vgl.	vergleiche
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
XMP	Xanthinmonophosphat
z. B.	zum Beispiel

2. Sequenzen der Gene *caMLT1* und *caPLB5*

Sequenz der *caMLT1*-Region:

```

CTTGAACAGCACACGACGCTTTGGTGAACAGGTGTACACTTTAAGTTGAAAATAGTGGCAAACATCTTTATTTATAAACCAAGAGAGAGTGTATTTAGGTG -1189
      FOXABC
      GATA(+)
TTACTTCTACTTCATTTGTCATCAATCGCAAGAAAAA[GATAA]TAATTTCAATAATGAATACTCTAAATATCTTACATTTGTTTTTCGTGTTGTATGTGTTG -1089
AAGGTAGTAATATAGAGGCGGTAAAACGATGGCAAGGAGTAGCATGATGACTAGGAGGACCGTTTTGCAGAACTTTAAGTAGTAGTCTCTCAGAATGTAC -989
      GATA(+).
TTCATTGATTACTTCTCATTGCACTACATGTTAGAAGAGAAATAAGGACATTAGCTCTTCAACTTCCAAAATATGGATGATT[GATAA]ATCTATGTGAATA -889
      GCN4 (+)
AACCATTTCCTATTTGAATACTAATTGTAAATGTATGAGAAT[FGACTCC]TCCTGAGTATTAAGTGGAGTAATATGGGAAATCGTAAATATAGTCTTCTG -789
AAGCTAACTCAAATTTGATTATAGTATTCAAACAATTGAAGAAAGAAACGGAAAGTAATTCCTTTTAAACCTAAGCCATGTTATGATTCCTTTGGAAAA -689
      GATA(-) . poly(dA-dT) .
AAAGAAAAAGTAAGTGA AAAACGTTTGTACCTGAAATGTATTGCTCAATTTTCAAACC[TTATC]TGACTTTGTTTGTTTTATTTTTCATAAAGA -589
      GCN4 (+) . HindIII .      GATA(+).
TCGCTTGAAGT[FGACTCA]TGGAAAGCTTACCAAAAACAATAACAGACACAACCTTAGTACTCTC[GATA]TAAACGGAGTTAGACATTTAACGTGAGAAATGAC -489
TAATATAGAATATGAAATGTAAACAGCTCTCTTCTATAGATCGCCTCCTGCCCCACCTCAATTTTCATTAACCCGCTTCTCATCTACGGCACAAAAAAA -389
      GATA(+).
ATTGAGAAATTTGCAGACGAACAATTCTAGC[GATAA]AGACAATGATTTACACAAGAATACTTCGCTTAAATTTCTACTACATGAGCAAACCTTGGATTTAAA -289
      GATA(+). GATA(+).
TATACTCTTTTATTGTTTGTCTGAATAAGGAAG[GATA]GTGAA[GATA]CTAATGTATTTTCATCAAACCTCGTTGGCACCGTTTCATTAATGTGGCGGGAAT -189
      .CCAAT(-) TCS(+). GATA(-). GATA(-).      poly(dA-dT)
TCTGACTTTGTTATTGG[CATTCC]TCTAATTC[TTATC]TATTT[TTATC]GGGTGAAAAATTTTATTTTATTTTATTTTGTCTATAATTTCTCGTTTC -89
      STRE(+). ClaI .      .:      .:      .:      +1
AAGGATTATTATAAATACCTTTGACAATA[CCCTT]CTCCTGCAATCGATTTTTTTTTTCGTAATTTATATCCTCATTGTTATAACATCATGAATGAAGT 12
      M N E S 4
AATAGAGAATTTATCTTGGGACTTTCCCTGTACATCTATCCCTTTTCAATTTCTGAGTCACTATTACACACCTTCAATTTTTTTGGTGTGGGAGATGGTC 112
N R E F I L G L S P V H L S L F N S E S L L H T F N F F G V G D G Q 38
      NsiI .
AAGCTAACATCGGGTCAAACCTATGCTACTGCTTCCAAATTTGTAATACCTCAGCCACTTTATTCTCCACATGGGAATGCATTGAATCTGCTTTTGTGTA 212
A N I G S N Y V T A S K F V I P Q P L Y S P H G N A L N P A F V E 71
      NHEKNUF .
ATTAATTTGGGCAAGCAGTCAATACTTTTTCGCTATTTTTCATGTTATTTCAATTAACCCGATTATTATTGACGAAAAAGAAAAGTCATCGCATCTACACA 312
L I G Q A V N T F F A I F M L F Q L T R L L I T K K K S H R I Y T 104
      EcoRI .
CCAACACCGTTTTTCAAACTTTGAAAATAAGTCTAGTTTATTACAAGTCATTCTCGTAGCACTGTTATACTTTTGAATAAGAAATTCATATTTTATTG 412
P T P F S Q T L K [I S L V L L Q V I L V A S L Y F L] N K N S Y F [I G] 138
      XHESPLY.
GTGGAATTGCAGCTACAGTTTTGGCATTGATTTTACACCTTGTGTAATTTAGAAGATCTCCAATTGCCATTGAGTCTTTGTTAACATATTGGTCTGCCAA 512
[G I A A T V L A L I L H L V] E F R R S P I A I E S L L T Y W S A N 171
TACCGGTTCACTTTTGCAGTGTTTATACAAGATCTTATTCTAAGCATAAAATTTATGCCAACTCAGGCCCTGCTTATGTTATTGAAATTATCAGTCTC 612
T A F T F A V F I Q D S Y S K H K I Y A N S G P A [Y V I E I I S I] 204
GTCAACAGCTTTTTGATTTTCGTTATTGAAAGTTGGTTATTACAACACAGGATTGAAATTTACAATGAAAAATTTTAGACACGGTCAATTTGTTTCTT 712
[V N S F L I F V F] E V G Y Y K P G F E I T N E K F L D T V N L F S Y 238
ATTTTACATTTTACTACCTCCAACCCCTCATCAATAAGATTTACGCTACTGATGACGTCAGTTAACCAGATTACCTGATATTTTGGGTAATATTACTTG 812
F T F Y Y L Q P L I N K I Y A T D D V Q L T D L P D I L G N I T C 271
CGATGATACCAAAGCCAAAGTTGCTAAAGCATGGGAAGAAGAATTGAAAAGAACTAAGAAACCTGGTTTAGTTTCAAAGTTTGGAGTTTGTCCACCAGA 912
D D T K A K V A K A W E E E L K R T K K P G L V S K V W S F V T R 304

```

.HindIII.

AGAAAGGTCAACTCTAAACCACAAATGTTTTAGCTATTGCCAAGCTTTTTGATAAATTTGCTATCAGTATCACTCTTGC AATTATTGTAACGGGT 1012
R K V N S K P Q M F L A I A K A F F D K F A I S I T L A I I V T G L 338

TGAGTTTCTTGCAGCCATTCCTTTTGAGGAAATTTATTAGTTTTCAGTACCTACTTTTACAGTGTGAGAAACCACCAATTATCATTTGGTTATTTTGG 1112
S F L Q P F L L R K F I Q F F S T Y F Y S V E K P P I I I G Y F W 371

GGCATCAGTAATGTTCTTGACATCAGTCGCTAATTTTCATTGCATTCAACCAGGCCTTCAAACCTCAATTTGATCTTGGGTACGAGATCCAGAGCTCACTC 1212
A S V M F L T S V A N F I A F N Q A F K T Q F D L G Y E I Q S S L 404

ACAACCTTGATATATGAAAAGGCATTAAGATTATCCCCACAATCAAGAAAAACAAGCCAACTGGTGATATTATTAATCATATAACTATGGACATTGATA 1312
T T L I Y E K A L R L S P Q S R K N K P T G D I I N H I T M D I D I 438

TTATTTTTGGTTTTGCTGGCAACTTGGTGAGTATTTGGCGTCGCCATTGAAGTTGGCTGTTTGTGTTAGCTGCATTATACAAGTTGTTTTCAAATGCTAC 1412
I F W F C W Q L G E Y L A S P L K L A V C L A A L Y K L F S N A T 471

ATGGGCTGGTGTAATAACTGCCATTATCGTGGCACCCTGTCCTCTGTAAACGCTTCCATGTCCAAGAACTATATACAGTTGATGAAAGACAAGGAT 1512
W A G V I T A I I V A P L A T L V N A S M S K N Y I Q L M K D K D 504

GAAAGAAGTATTTGATTACAGAGATTTTAAACTCAGCCAAAAGTATCAAGTTTTTATTGATGGAAAAACCGATGTAGCTCGATTGAGTCACATTAGAA 1612
E R T S L I T E I L N S A K S I K F Y S W E K P M L A R L S H I R N 538

ATGACAGAGAATTGAACAATATCAAGAAAATTTGGTGTGGTCAGTGCATTGGCACAATTTTTGTGGTCTTGTATTCCATTTTTTCATTAGTTGTGCCACCTA 1712
D R E L N N I K K I G V V S A L A Q F L W S C I P F F I S C A T Y 571

.NsiI

TGCCACCTATGCATATTTTTACAATGTTCATTAAACACCTGATATTGTTTTCCCTGCTTTGGCGTTGTTTGATTATTATCAGAACCTATGTTATTAATT 1812
A T Y A Y F Y N V P L T P D I V F P A L A L F D L L S E P M L L I 604

CCTAGTTTTATTGTTGAAGTTATCGAAGTTTCAACTTCGTTGGCTAGAATTTGGTGAGTTGTTATGTTTGGATGAACCTGCTGACGACCAACATGTTATG 1912
P S F I V E V I E V S T S L A R I G E L L C L D E L A D D Q H G Y V 638

TAAAGAGAGACCCAGAGCCTAATGATAACTCTATTATCTGTGATTGTGAAAGACGCAACATTTGTTTGGTCAGAAGAAACACAACAGAAACAGTATAC 2012
K R D P E P N D N S I Y S V I V K D A T F V W S E E T Q Q K Q Y T 671

.KpnI.

CGACGAAGAGAGTGAAGTTCAAGAGGTACCAGCTAGTAACGTTGCATTGAAAAATATCAATTTTTCTGCCAGAAAGGGTGAAGTTGGCATGTATTGTTGGT 2112
D E E S E V Q E V P A S N V A L K N I N F S A R K G E L A C I V G 704

AAAGTTGGAAGTGGGAAATCTACTTTGATTAAGGCTATCTTGGGTGACGTTCCAATCAAATTCCTTCTTATTCTGATGATTCGACAAATCCAACACCAA 2212
K V G S G K S T L I K A I L G D V P I K I P S Y S D D S T N P T P S 738
WalkerA

CGGTGGAAACTTTTGGATCAATGCTTATTGTCCACAGAACCCTTGGATATTGAATGGAAGTCAAGGAGAATATTTTGGTTGGTCACAAGTATGATGC 2312
V E T F G S I A Y C P Q N P W I L N G T V K E N I L F G H K Y D A 771

.EcoRI

AGAAATTCATCAAAAACTATTGATGCTTGTGAATTGATTCTGATTTCAAAAATCTCCCTGATGGGGACCAGACTGTTGTTGGTGAGAAAGGTATTCTT 2412
E F Y Q K T I D A C E L I S D F K N L P D G D Q T V V G E K G I S 804

CTTCCGGTGGGCAAAAGGCACGATTTTTCATTAGCAAGAAGTGTGTACACAAGAGCTGATATTTATCTTTGGACGATATCCTTTCAGCAGTGGACGCTC 2512
L S G G Q K A R I S L A R S V Y T R A D I Y L L D D I L S A V D A H 838
ABC signature WalkerB

ATGTTGGTAAAAATATCATCAAGAAAGTGTAAAGCAACGAAGGTCTCATCGAAATCGTTGTAGAATATTAGCAACAAATTCGGTGCCAGTCTTGCATGA 2612
V G K N I I K K V L S N E G L I G N R C R I L A T N S V P V L H E 871

AGCAAACGATATTTACTTGATTGCTGGTGGTGCATTGTTGAACATGGGAAATTCAAAGAAGTTATGAAAAGAAATGGTGATTTAGCCAAATGATTAA 2712
A N D I Y L I A G G A F V E H G K F K E V M K R N G D L A K L I K 904

GAATATGGACGTAAAAAGACGAACCAACAGAGGAAGAAACAACCGAGGCATCAACTGAACCTAAAGAAGAAGACCATTCTAACGGGAATCAGATACTG 2812
E Y G R K K D E P T E E E T T E A S T E P K E E D H S N G K S D T A 938

CTGTTTCATGACGAGCTTGATACGGATGAATTTGGTTGACGAAATTTGTCGATTATGTTGGCGAGCAAAATCGTGGTGTGTTGAACAAGCAATATTGCGTGG 2912
V H D E L D T D E L V D E I V D Y V G E Q N R G V V E Q A I L R R 971

KPN4390

TGCAAGTGTGTTTTCATACGGTCATAATTACGAAAATGATGAAGCAGACAATGGTCAAATAAGAAAACTAGACATGAACAAGAGGAGTCAAGAAAAGGT 3012
A S V V S Y G H N Y E N D E A D N G Q I R K T R H E Q E E S R K G 1004

ACTGTTCCATGGGATATTTTTAAACAATATATTATGCCTGTGATTACAAGTATTTTTTCATTCTATGTTGCTGCAACTTTCTCAGTGGTTTTAATTTTCAG 3112
 T V P W D I F K Q Y I I A C D Y K Y F S F Y V A A T F S V V L I S A 1038

CCGGAGAAAAATATTTATTGAGTTATTGGTCACAGCTTAATAGTGAACAGAATGACACAGTTGAACAGTATTTTTCTTAGGTACATATGCTACTCTTGG 3212
G E K Y L L S Y W S Q L N S E Q N D T V E P V F F L G T Y A T L G 1071

TGTGTTTCTGGTTTCTTGACTTATATGGGTGCACCTTGTCTATCTGGAGCTATTGTATTGTCAAAGTTCTACTTACTTCCACAATAAAATGGCAGAGTCT 3312
V V S G F L T Y M G A L V I W S Y C I V K G S T Y F H N K M A E S 1104

GTTTTGAGATCACCAATGTCGTTTTTCGATACTACACCAATTGGAAGAATTTTGACAGATTTACTGAAGACATTGGTAAGATTGATATGAATCTTCCAT 3412
 V L R S P M S F F D T T P I G R I L N R F T E D I G K I D M N L P W 1138

GGACTATTATATCATTATAACAACCTTACTTAACGGGTTTGTACCTTTGGAGTGATCTTGTCAATTTTACCATTAATGTTAGTTGTAATCGTTTCGTT 3512
 T I I S F I T T L L N G F V T F G V I L S F L P L M L V V I V S L 1171

ATTATTGTTTACAATTATTTCCGTATCAGGTTTGTTCAACTACTAGAGAATTGAAAAGATTAGAATCCATTGCTAAGTCACCAGTTTGGCAACAATT 3612
 L F V Y N Y F R I R F V P T T R E L K R L E S I A K S P V L A T I 1204

CAAGAGTCGATCAATGGGTAGAACTATTTAAAGCTTTCCACCAAAGAGAACGTTTTGTTTACAAGAGCAAGAACTTATTGATGAAAAGACATTGATTG 3712
Q E S I N G V E T I K A F H Q R E R F V Y K S K K L I D E K T L I G 1238

GTGTTGTGCAACAAAATTGTAATAGATGGTTATCAATGAGATTACAACCATTTCACTAGTATCATGTTTTTCTAGCATTGTTAGCCGTTGTGACGTT 3812
 V V Q Q N C N R W L S M R L Q T I S S S I M F F T A L L A V V T L 1271

GGGAGTAAACACCCCTATACTTCTAGTATTTGGGTTTTGTTATGACATATCCATGAGTATCACTTACATCTTAAACTCACTTGTGAGAATTTGGGCT 3912
 G G K H P I L P S I L G F V M T Y S M S I T Y I L N S L V R I W A 1304

GAAATGCAAGCTGGTGGTGTGCTATTGAGAGAATTATCGAGTATTGTGATTGCCTTCAGAAGCTCCAATGATCATTGAAGATAAAAAGACCTCAAGACT 4012
 E M Q A G G V A I E R I I E Y C D L P S E A P M I I E D K R P Q D S 1338

CTGGCCAGCACATGGTGTAGTCAAGTTTAAGAAATACAGCACAGCATAAGAAAGCATTGGATCCTGTTTTGAGAGAGATTGAATTAACATCAATTC 4112
 W P A H G V V K F K K Y S T A Y R K H L D P V L R E I E L T I N S 1371

AAAGGAAAAAGTCGATATGTTGGTGAACCGGGCAGGAAAGTCTTTCATTGACATTAGCTTTGTTTGAATAATCGAAGCAACAGGTGGTAACATTGAA 4212
 K E K V G I V **G R T G A G K S S L T L A L F R I I E A T G G N I E** 1404
 WalkerA

ATTGATGGTGTGATACTAGCCAAATCGGATTATATGATCTCAGACATCATTGACCATTATCCCTCAAGAAGCACATACATTTAGAGCTTCAGTCAGAG 4312
 I D G V D T S Q I G L Y D L R H H L T I I P Q E A H T F R A S V R E 1438

AAAACTGGATCCATTCCGAGAATACAGCGATGACAACTTTGGAAGTGTGGAATTGGCACATTGAAAGAACATGTTGCCAAAATGAAACTGACCC 4412
 N L D P F G E Y S D D K L W K V L E L A H L K E H V A K M E T D P 1471

CACCGAAGAAGAGAAGAAGGCTAGTAAAAACCCAGACGAATTGTCAAGAAGGTGGACTTGTGCTCAAATTGAAGAAGGAGGTCTAATTATCTTCT 4512
 T E E E K K A S K N P D E L S K K V G L D A Q I E E G G S N **L S S** 1504

GGTCAAAAACAATTGTTATGTTTAGCAAGAGCATTGTTGAATGAACTAGTAAAATCTTAGTGCTAGATGAAGCCACTGCTGCAGTGATTGTTTCAAACCG 4612
G Q K Q L L C L A R A L L N E T S K I L V L D E A T A A V D F Q T D 1538
 ABC signature WalkerB

ACAAATTTATCAAGAAACAATTAGAACGGAATTTAAGGATAAAACTATTTTGACAATTGCTCATAGAATTGATACATTATGGATAGTGACAAGATCTT 4712
 K I I Q E T I R T E F K D K T I L T I A H R I D T I M D S D K I L 1571

AGTGTAGATAGTGAAAAGTTGCAGAAATTCGATTACCTCAAACCTTGTGGAAGAACAAGACAGTATTTTCTACTCTCTGGCAAAGAAGGTGGATAC 4812
 V L D S G K V A E F D S P Q N L L K N K D S I F Y S L A K E G G Y 1604

ATAGATTAGTATATATCGGTGCGATATATATTCATATAGTGATTTTTTTATTTATACAATAATATTTTTTTTAGTTTCACTTCTTTTCAACTATTTAA 4912
 I D * ↓ XBATYCT
 1607

ATGCTTCAAATTCGTTTACATAAACCTTAAGTAGTTGAGAGAGATCAGCTCTTGTTCGACAACCTGTTAATCCGTTCTTCAGACAACGGGTTTT 5012
 * Ende von caNTG1

TAGCAACTTCTGTTTACACCCTTACATAACCCGCTCTGGCCAATGTGCATATATCGCAATTTGCAGCACGTGGTACACAAATCACTTGTCCAAAACCA 5112
 XHOABC/ABCREV

```

ACAACCAATGGATTATATCTGTCCAATAATCCTTTGGTAACCAATCTTGTAGTTCTATTTCGAGCCTTTTCAGGTGTATTAGCTTTTGGAGAAACCCAGC 5212
      ClaI.
CCCACATGAGCGCCAATCGATGCAAATGAACATCAACACCAATTCGGCATTAAATACCCCTACCACCTTTGTAAAAGAAGAAAACCCCATTTTTGGTCCCAC 5312
ACCTGGAAGTGCACAAATCTCTCTATCGTTTTTGGTATATCGCCACCATGATTCTCCATTAGTATAGAACAGGTTTTTCTAATGTACTGTGCTTTCCTA 5412
TTATGGAATCCAACTTTTTTTATATAAGCATCAATTTTCAGATTGAGCAATTTTAGTACACTTTCAATGCACAATCCATCTGGGTGCACCTTTTAACAATC 5512
CATTGTGCAAGTTTTTCATGGCCTCGTAATTCACCTTCGTCCTTTGTTTGGCAGCATAACATCAATGATATTTAAAAGTTGAAAGCGATATATTTTTGGGTT 5612
TCTGGTTTTAATGTTTCTATTGATAGTGTGGCATTTCGTTTCCAACTTGGGTATCCACGGGTGCAAAATATTTACTTCTCATCCAACTAATTGATTA 5712
TAGATTTCTGACCATTTTGGAGACCGTTACACTTGGCCATGTCTTCGGGATCTACTTTTGTGAATACATTTGGGGCAAGTTCTGTAGTTTCAGATTCTGA 5812
      XhoI
TCTCAACTTCAATATGTTCCAATTTTATTCTCTTACTCGAGCCAGATG 5860
      XHOAPA

```

Abbildung 39: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *caMLT1*-Gens mit angrenzenden Bereichen.

Die Position des zur primären Sequenzbestimmung eingesetzten p137-Phagemidfragments ist durch einen unterbrochenen Unterstrich gekennzeichnet. Die mittels 5'-RACE bestimmten Transkriptionsstartpunkte sind mit „:“ und die mittels 3'-RACE bestimmten Polyadenylierungsstellen mit „↓“ markiert. In der Region 1,2 kb stromaufwärts des Translationsstarts (Pos. +1) sind die ermittelten TATA- sowie Poly(dA-dT)-Sequenzen unterstrichen und eine potentielle CCAAT-Box grau hinterlegt. Weitere mögliche *cis*-regulatorische Elemente sind durch Umrahmung hervorgehoben und ihre Orientierung ist mit (+) und für den komplementären Strang mit (-) gekennzeichnet. Putative Transmembransegmente sind in der *caMlt1*-Proteinsequenz durch Umrahmung (nach dem Analyseprogramm PSORTII) oder eine graue Markierung (nach dem Analyseprogramm PredictProtein) hervorgehoben. Die für ATP-bindende Proteine typischen Domänen (Motive Walker A und B, ABC-Signatur) sind angegeben. Weiterhin sind Restriktionsschnittstellen durch einen doppelten und Primer durch einen punktierten Unterstrich markiert sowie Transkriptionsstops durch einen Stern.

Sequenz der *caPLB5*-Region:

```

-1143
AAACACAGATGTTGAGTTGGAAGGGTTCATTTATGGCATGAAAAGAATTGTAACCTCACTGGTAATGATCAGTTTACCTGGGCACCAGATTCGGAATT -1044
      AMPLI5
AACCGAGATTGGATTGGAACAGGCCAAGGAAAACAGAGAATTTTGAAATCAGAGCTATTGTTAGGAGCCCCATTCTAGTAAATTCATACCTTCGCCA -944
TTACAAAGAGCGTGCAGCACATTAGTTATAACTTGGCATGATCTAAAACAGTAGAGACGAGGCCAATAGTGTGTGAAAAATTGAGAGAGAAAATTGGGA -844
      AMPLI1
AAAACCTAAGTGACAAACGTTCTACGAGATCTGAAATTCACGAAAAGTTCGGTGACACTTATGGGTTTATAACAGACGGCTTAGAAGAGGAAGATATATA -744
TTTTACTGAGACAAGAGAAAACCATGCCAGAACAGTCTCTACGCCTAAACGGATATTTACAAGATTTGTTTGAACAAGACTGCAAATCGGGCAAAGTTGAC -644
AAAAAAGTGGCAGTTGATAACATTTTCATCAGCACCAGTCCACATTCTGGCACAATTAGATCTGTTATTAATGTGGTTCGATAGGAATTTTACAGTGT -544
CCACGGGCGGTATGCTTCTATAGTAGTTAAGGCTACCAGACGGAATTTAAAAGTTTGACCAAAATCCGGAATGTTTTATATGCAGTACCAACAGGTGTTA -444
      GATA(-)
      Ende von caPMU5 *
      GATA(-)
TCGTGATTACCTGACATATATATGAAGAAAACCATCATATTCTTTAATACTTTTATCAATTGCTATATAATTAACAAACCATCTTACCAGATTAGG -344

```



```

CACATCGAACACTCGCATGAGTTACAATTCAAACCTTTCCACTTCAAGTTATCTTATTCTGACCAAGAGAAAATTTGGTCTATCAGGAATGGGTTTGAA 1857
T S N T R M S Y N S N F S T F K L S Y S D Q E K F G A I R N G F E 619

CCGGTAACAAGAAATAATTTAACGGACGACGAAAATTTGGTCAACGTGTGTGGCTGTGCAATAATTAGAAGACAACAAGAACGGTTAGGTGAGGAGCAGT 1957
T V T R N N L T D D E N W S T C V G C A I I R R Q Q E R L G E E Q S 653

CCGATGAATGAAAAATGTTTCCAAGAATATTGTTGGACTGGTGGATTCAAAGACGCTGCCTCTGTCTCTAGTGTAGTGGAATTTTCAGGACTTGCAGC 2057
D E C K K C F Q E Y C W T G G F K D A A S V S S V S G I S G L A A 686

TAAAACCCACACAAGTGGCGGTACATCTTCTACGACCCAAACAAACCAGTACCCTACCGGATCATCTGCAAATGGAGGTTCTTCGTCTACTGGATCCTCT 2157
K T H T S G G T S S T T Q Q T S T T T G S S A S N G G S S S T G S S 719
(SC5314 Allele)

TCGTCCTCGAAAAAGAAAAATGGTGGAGACTTGGTTAATGGTGGTGTACCTTCTTCAATTTTCCTTGTTTTAAATAGTTGCTAGGATTAATTATAGCGT 2257
S S S K K K N G G D L V N G G V P S S I F L V F N S L L G L I I A Y 753
ω ω+1 ω+2

ATTGTAGTGAGAAAACCAATACCAAAGACAATACAAAAATTTAGTTTTTAAAAATTTAAATCTATTGATACTATTATTGTACATATTAAGCAAATTC 2357
I * 754

TTGCCTATACAGAGTGGTTCTTCTTACCTTTTTTCAATTGGAACCTTGCTAAAATGGGTACATGATCAGAAGGGAAGTTGGCATCAGGGAACCCAATCGA 2457
* Ende von caCCR4

ATGACTGGTATATTCTTCATCAACTCTTCCAAGTAAACCTTTCACTTGCAAAGTTGGCGTTGAATACCATATATAATCAATATTGTCGGTAAAAGCAGGA 2557

GTCAAATTTGGTAAAAGTAGTTCGCCACAGCTTCATATGCAGATTTTAAATTTGAACGGATGATGGAATCCGTCTTCTGTAAACTTACCATAGTCTCTAC 2657

CATTCAATCTTCATGACCTTTTGATGCACCAGTGGAAAA 2696
AMPLI3/6

```

Abbildung 40: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *caPLB5*-Gens mit angrenzenden Bereichen.

Die mittels 5'-RACE bestimmten Transkriptionsstartpunkte sind mit „;“ und die mittels 3'-RACE bestimmte Polyadenylierungsstelle ist mit „;↓“ markiert. In der Region 493 bp stromaufwärts des Translationsstarts (Pos. +1) sind die ermittelten TATA-Sequenzen unterstrichen. Mögliche *cis*-regulatorische GATA-Elemente sind durch Umrahmung hervorgehoben und ihre Orientierung ist mit (+) und für den komplementären Strang mit (-) gekennzeichnet. Transkriptionsstops sind durch einen Stern markiert. Restriktionsschnittstellen sind durch einen doppelten und Primer durch einen punktierten Unterstrich gekennzeichnet. In der für Lysophospholipase / Phospholipase B typischen katalytischen Domäne sind die konservierten Motive umrahmt und die für die Phospholipaseaktivität essentiellen Aminosäuren durch Fettdruck hervorgehoben. Putative NH₂- und COOH-terminale Signalpeptide sind doppelt unterstrichen, ebenso wie die mittels DGPI-Analyse ermittelte potentielle ω-Spaltstelle an Position 720-722 (GPI-Verankerung). Putative Kex2p-Spaltsequenzen sind mit „Δ“ markiert. Angegeben sind zudem eine mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstelle sowie eine ATP/GTP-Bindungsstelle (in Fett- und Kursivdruck). Identifizierte Alleldifferenzen zwischen den beiden sequenzierten *caPLB5*-Allelen sowie zu den veröffentlichten SC5314-Genomsequenzen sind grau hinterlegt.

3. Erklärungen

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Januar 2005

Stephanie Theiß

4. Publikationen zur Dissertation

Originalarbeiten:

Theiss, S., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof, N. Agabian, J. Hacker and G. A. Köhler (2002) Functional analysis of a vacuolar ABC transporter in wild-type *Candida albicans* reveals its involvement in virulence. *Mol Microbiol* **43**, 571-84.

Theiss, S., I. Ganchimeg, M. Kretschmar, T. Nichterlein, L. A. Murillo, J. Hacker, N. Santosh, N. Agabian and G. A. Köhler (2004) Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Eingereicht bei IJMM*.

Köhler, G.A., X. Gong, S. Bentink, S. Theiss, G. Pagani, N. Agabian and L. Hedstrom (2004) *Candida albicans* IMP Dehydrogenase: the functional basis of mycophenolic acid resistance. *Eingereicht bei JBC*.

Übersichtsarbeiten:

Heinz, W., A. El Barkani, S. Theiss and O. Kurzai (1998) Klinik und Pathogenese der Candidose, Würzburg. *Hygiene und Mikrobiologie* **2**, 23-24

Theiss, S., G. A. Köhler, M. Kretschmar, T. Nichterlein and J. Hacker (2000) New molecular methods to study gene functions in *Candida* infections. *Mycoses* **45**, 345-50

5. Lebenslauf

- Name: Stephanie Theiß
- Geburtsdatum: 18.09.1969
- Geburtsort: München
- ab Juli 2004 Mutterschutz und Erziehungszeit
- Wissenschaftliche Anstellungen: Juli 2001 – Juni 2004 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. M. Frosch (Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays in *Neisseria meningitidis*; Betreuung der zentralen Microarray-Abteilung des Kompetenzzentrums PathoGenoMik)
- Jan. 1996 – Dez. 2000 am Institut für molekulare Infektionsbiologie bzw. Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg bei Prof. Dr. J. Hacker (Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter der Betreuung von Dr. G. Köhler)
- Auslandsaufenthalt: Okt. 1995 – Dez. 1995, Praktikum am Cell Research Institute der University of Texas at Austin, USA bei Prof. Dr. D. Brown
- Hochschulbildung: WS 1988/89 – SS 1995 Studium der Biologie (Abschluss: Diplom) an der Universität Würzburg; Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik und Biochemie; Experimentelle Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. J. Kreft, Thema: „Analyse des *actA*-Gens von *Listeria ivanovii*“
- Schulbildung: 1983 – 1988 wirt.-wissenschaftl. Gymnasium, Würzburg (Abschluß: Abitur)
1979 – 1983 math.-naturwissenschaftl. Gymnasium, Freiburg i. Br.
1977 – 1979 Grundschule, Freiburg i. Br.
1975 – 1977 Deutsche Grundschule, Tokyo/Japan