

**Departamento de  
Microbiología y Genética  
IMB**

**Universidad de  
Salamanca**



**Institut für Mikrobiologie  
Abteilung für molekulare  
Mykologie**

**Heinrich-Heine-Universität-  
Düsseldorf**



**RUTAS DE GLICOSILACIÓN EN *Candida albicans*:  
CIRCUITOS REGULADORES Y EFECTOS SOBRE  
VIRULENCIA**

**PROTEINGLYKOSYLIERUNG BEI *Candida albicans*:  
REGULATORISCHE SIGNALWEGE UND  
VIRULENZEIGENSCHAFTEN**

Memoria presentada por la Lda. M<sup>a</sup> Pilar Domínguez Cantero  
para optar al grado de Doctor en Farmacia

Salamanca, 2010

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf  
vorgelegt von M<sup>a</sup> Pilar Domínguez Cantero aus Salamanca

Düsseldorf, 2010

aus dem Institut für Mikrobiologie, Abteilung für molekulare Mykologie  
Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referenten: Prof. Dr J. F. Ernst und Prof. Dr A. Domínguez Olavarri

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2010

La presente memoria ha sido realizada bajo un acuerdo de Cotutela firmado entre la Universidad de Salamanca (Salamanca, a 5 de septiembre de 2008) y la Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf (Düsseldorf, a 9 de septiembre de 2008).



Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Salamanca y Dr. Joachim F. Ernst, Professor en la Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada “Rutas de glicosilación en *Candida albicans*: circuitos reguladores y efectos sobre virulencia” presentada por la Lda. M<sup>a</sup> Pilar Domínguez Cantero para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, y en el Institut für Mikrobiologie, Abteilung für molekulare Mykologie en la Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente firma la presente certificación, en Salamanca a    de junio de 2010

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Fdo. Dr. Joachim F. Ernst



Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

### **CERTIFICA**

Que la memoria titulada “Rutas de glicosilación en *Candida albicans*: circuitos reguladores y efectos sobre virulencia” presentada por la Lda. M<sup>a</sup> Pilar Domínguez Cantero para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ángel Domínguez Olavarri en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y bajo la dirección del Dr. Joachim F. Ernst en el Institut für Mikrobiologie, Abteilung für molekulare Mykologie, de la Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.

Y para que conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a de junio de 2010

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri



El presente trabajo ha sido financiado por las siguientes becas:

Beca IP3 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. Referencia: AP2005-4212.

FEMS Research Fellowship.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos:

Glycoshield: surface modulation of the fungal and host response using a genomic approach.

Redes del Espacio Europeo de Investigación (esquema ERA-NET).GEN2006-27775-C2-E/PAT.

"Histona acetyltransferasas en *Candida albicans* efecto sobre dimorfismo y virulencia. Una aproximación Post-genómica" (SA 141A08). Junta de Castilla y León.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (ER 47/9-1; SPP 1160).



“Cada año de la vida, como el reposo de cada noche, tiene simas de sueño profundo y otras, cimas, de vigilancia intermedia. Se pierden, en el recuerdo, horas, días enteros: trozos totales de existencia. .... Sólo quedan jornadas, páginas aisladas, que se empeñan, como un plomo, en hundirse y echar raíz.”

*Las buenas conciencias*

Carlos Fuentes



---

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Candida albicans</i>	1
1.2 Die Zellwand der Pilze	6
1.3 Glykosylierung	7
1.3.1 <i>N</i> -Glykosylierung	7
1.3.2 <i>O</i> -Glykosylierung	9
1.3.3 <i>O</i> -Mannosylierung	9
1.4 Die Pmt-Proteine	10
1.4.1 Pmt-Proteine in <i>C. albicans</i>	12
1.4.2 Pmt-Proteine in anderen Pilzen	14
1.5 <i>O</i> -Mannosylierung in höheren Eukaryoten	16
1.6 Signalwege und Regulation der Glykosylierung	17
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Chemikalien	23
3.2 Geräte und Maschinen	23
3.3 Stämme und Medien	24
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> -Stamm	24
3.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	24
3.3.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> -Stamm	24
3.3.4 <i>Candida albicans</i> -Stämme	24
3.3.5 Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i>	29
3.3.6 Medien zur Anzucht von Hefen	29
3.3.7 Allgemeine Wachstumsbedingungen	30
3.3.8 Wachstumsanalyse auf festem Medium	30
3.3.8.1 Sensibilitätstest	30
3.3.8.2 Viabilitätstest	31
3.4 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	31
3.5 In dieser Arbeit verwendete Plasmide	34
3.6 In dieser Arbeit verwendete Lösungen	36
3.7 Transformation	38
3.7.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.7.2 Transformation von <i>E. coli</i>	39
3.7.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39
3.7.4 Transformation von <i>C. albicans</i>	40
3.8 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren	40
3.8.1 Plasmid-Isolierung	40
3.8.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	41

---

3.8.3 Ligation	41
3.8.4 Ligationsfällung	41
3.8.5 Restriktionsverdau von DNA	41
3.8.6 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i>	41
3.8.7 Isolierung gesamter RNA aus <i>C. albicans</i>	42
3.8.8 Konzentrationsabschätzung der Nukleinsäuren	43
3.8.9 Southern-Blot	43
3.8.9.1 DNA-Verdau	43
3.8.9.2 Markierung einer Sonde	44
3.8.9.3 Auftrennung der DNA-Banden	44
3.8.9.4 Transfer auf eine Nylon-Membran	44
3.8.9.5 Hybridisierung mit der markierten Sonde	45
3.8.10 PCR	45
3.8.10.1 Standard-PCR	45
3.8.10.2 <i>C. albicans</i> Kolonie-PCR	46
3.8.10.3 Mutagenese-PCR	46
3.8.10.4 qPCR	46
3.8.10.4.1 Theoretische Begründung	46
3.8.10.4.2 Effizienzberechnung mittels einer Verdünnungsreihe	48
3.8.10.4.3 Reaktionsvorbereitung	48
3.8.10.4.4 Statistische Behandlung der Daten	49
3.8.10.4.5 Bestimmung der Effizienz	50
3.8.10.4.6 Normalisierung gegen Aktin: relativer Transkriptspiegel	50
3.8.11 5'RACE (5' Rapid Amplification of cDNA Ends)	50
3.9 Proteinbiochemische Methoden	51
3.9.1 Messung der Luziferase-Aktivität	51
3.9.1.1 Das <i>RLUC</i> -Reportergen	51
3.9.1.2 Herstellung von Rohextrakten	52
3.9.1.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität	52
3.9.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.9.1.5 Datenanalyse	53
3.9.2 Das <i>lacZ</i> -Reportergen	53
3.9.2.1 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ( <i>lacZ</i> -Assay)	53
3.9.2.2 Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	54
3.10 Die Drei-Hybrid Analyse	55
3.11 Deletion des <i>ORF19.6813</i>	56
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1 Transkription der <i>PMT</i> -Gene	57
4.1.1 <i>PMT</i> -Transkriptspiegel in <i>pmt</i> -Mutanten	58
4.1.2 Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene bei verschiedenen Wachstumstemperature	60

---

4.1.3 Der relative Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in der Hyphenform	61
4.1.4 Der relative Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in Anwesenheit von Tunicamycin, Congo Rot und dem Pmt1-Inhibitor	63
4.1.5 Der relative Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in Glykosylierungs- und Zellwandmutanten	65
4.2 Untersuchungen zur Regulation der <i>PMT</i> -Gene auf Promotorebene	68
4.2.1 Sequenzanalyse der intergenischen Region stromauf- und stromabwärts der <i>PMT</i> -Gene	68
4.2.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der <i>PMT</i> -Gene	70
4.2.3 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der <i>PMT</i> -Homologen bei <i>Y. lipolytica</i>	75
4.2.4 Untersuchung des <i>PMT1</i> -Promotorbereiches mithilfe der <i>RLUC</i> - und <i>lacZ</i> -Reportergene	77
4.2.4.1 <i>PMT1</i> -Promotorregulation bei Zellwand-destabilisierenden Substanzen	79
4.2.4.2 Regulation der <i>PMT1</i> -Promotordeletionen durch Tunicamycin	80
4.2.4.3 <i>PMT1</i> -Promotorregulation während der Hyphenbildung	83
4.2.4.4 Regulation des <i>PMT1</i> -Promotors in Glykosylierungs- und Zellwand-Mutanten	84
4.2.5 Untersuchung des <i>PMT2</i> -Promotorbereiches mithilfe des <i>RLUC</i> -Reportergens	86
4.2.5.1 Der <i>ORF19.6813</i>	88
4.2.5.2 Deletion des <i>ORF19.6813</i>	89
4.2.6 Untersuchung des <i>PMT4</i> -Promotorbereiches mithilfe des <i>RLUC</i> -Reportergens	92
4.3 Aktivierung von Signalwegen bei defekter <i>O</i> -Mannosylierung	94
4.3.1 Aktivität des Calcium/Calcineurin-Signalweges bei defekter <i>O</i> -Mannosylierung	97
4.3.1.1 Sensitivität der <i>pmt</i> -Mutanten gegenüber Cyclosporin A	97
4.3.1.2 Viabilitätstest der <i>cnal1</i> -Mutante in Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors	99
4.3.1.3 Der Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in der <i>cnal1</i> -Mutante	99
4.3.1.4 Der Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in Anwesenheit von CsA	101
4.3.2 Aktivität des Cek1-Signalweges bei defekter <i>O</i> -Mannosylierung	102
4.3.3 Suche nach Transkriptionsfaktoren, die bei defekter <i>O</i> -Mannosylierung benötigt werden	104
4.3.4 Untersuchungen zur Regulation der <i>PMT</i> -Gene durch <i>Ace2</i>	106
4.3.4.1 Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in der <i>ace2</i> -Mutante	107
4.3.4.2 Überexpression von <i>ACE2</i> in der <i>pmt1</i> -Mutante	108
4.3.4.3 Der RAM-Signalweg	110
4.3.5 Transkriptspiegel der <i>PMT</i> -Gene in Anwesenheit von Tunicamycin und CsA	112
<b>5 Diskussion</b>	<b>115</b>
5.1 Regulation der <i>PMT</i> -Gene auf der Transkriptebene	115
5.1.1 Die <i>PMT2</i> - und <i>PMT4</i> -Gene werden induziert als Antwort auf defekte Pmt1-spezifische <i>O</i> -Mannosylierung	115
5.1.2 <i>PMT4</i> in der Hefeform und <i>PMT1</i> in der Hyphenform sind bei 37 °C die am höchsten exprimierten <i>PMT</i> -Gene	116
5.1.3 <i>PMT</i> -Gene und Glykosylierungs- und Zellwanddefekte	117
5.2 Regulation der <i>PMT</i> -Gene auf der Promotorebene	119
5.2.1 Die <i>PMT</i> -Gene besitzen sehr unterschiedlichen Promotorregionen	119
5.2.2 Das <i>PMT1</i> -Gen wird unter Stressbedingungen auf der Promotorebene reguliert	120

5.2.3 Die <i>PMT2</i> - und <i>PMT4</i> -Gene werden nicht auf der Promotorebene reguliert	121
5.2.4 Das „CAACCA“-Motiv am 5'-Ende der <i>PMT1</i> - und <i>PMT5</i> -Transkripte könnte eine Bindestelle für ein Regulatorprotein sein	121
5.3 Aktivierung von Signalwegen bei Defekter <i>O</i> -Mannosylierung	122
5.3.1 Die Blockierung des Pmt1-Proteins aktiviert die Signalwege in zwei Phasen	122
5.3.2 Der Calcineurin-Weg reguliert die Expression der <i>PMT1</i> -, <i>PMT2</i> - und <i>PMT4</i> -Gene über unbekannte Zielproteine	123
5.3.3 Der Cek1-Weg reprimiert die <i>PMT1</i> -Expression unter Normalbedingungen und wird benötigt, um die <i>PMT2</i> - und <i>PMT4</i> -Expression zu steuern, wenn Pmt1 blockiert wird	126
5.3.4 Regulation der <i>PMT</i> -Gene durch den Transkriptionsfaktor Ace2	128
5.4 Modell	129
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>7 Summary</b>	<b>135</b>
<b>Resumen en español</b>	<b>137</b>
<b>8 Introducción</b>	<b>139</b>
8.1 <i>Candida albicans</i>	139
8.2 Epidemiología	140
8.3 La pared celular fúngica	141
8.4 Glicosilación	141
8.4.1 <i>N</i> -glicosilación	142
8.4.2 <i>O</i> -glicosilación	142
8.4.3 <i>O</i> -manosilación	142
8.5 Las proteínas Pmt	143
8.5.1 Las proteínas Pmt en <i>C. albicans</i>	143
8.5.2 Las proteínas Pmt en otros hongos	144
8.6 <i>O</i> -manosilación en eucariotas superiores	145
8.7 Rutas de señalización celular y regulación de la glicosilación	145
<b>9 Objetivos</b>	<b>147</b>
<b>10 Resultados y discusión</b>	<b>149</b>
10.1 Transcripción de los genes <i>PMT</i>	149
10.1.1 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en los mutantes <i>pmt</i>	149
10.1.2 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en función de la temperatura de incubación	150
10.1.3 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en la forma de hifa	150
10.1.4 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> tras el tratamiento de los cultivos con tunicamicina, rojo Congo y el inhibidor de Pmt1	151
10.1.5 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en mutantes de glicosilación y pared celular	152
10.2 Regulación de los genes <i>PMT</i> a nivel de la región promotora	153
10.2.1 Análisis de las regiones intergénicas aguas arriba y abajo de los genes <i>PMT</i>	154
10.2.2 Determinación del punto de inicio del transcrito de los genes <i>PMT</i>	154

---

10.2.3 Identificación de los genes homólogos a los genes <i>PMT</i> en <i>Y. lipolytica</i> y del punto de inicio de su transcrito	156
10.2.4 Análisis de la región promotora de <i>PMT1</i>	156
10.2.5 Análisis de la región promotora de <i>PMT2</i>	158
10.2.6 Análisis de la región promotora de <i>PMT4</i>	159
10.3 Activación de rutas de señalización celular en respuesta a una <i>O</i> -manosilación defectuosa	160
10.3.1 La ruta de calcineurina	161
10.3.2 Participación de la ruta de la MAP quinasa Cek1 en respuesta a defectos de la <i>O</i> -manosilación	163
10.3.3 Análisis de una colección de mutantes de factores de transcripción en respuesta a un bloqueo de la <i>O</i> -manosilación	164
10.3.3.1 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en el mutante <i>ace2</i>	164
10.3.3.2 Sobreexpresión de <i>ACE2</i> en el mutante <i>pmt1</i>	165
10.3.3.3 La ruta RAM de señalización celular	166
10.4 Transcrito relativo de los genes <i>PMT</i> en presencia de tunicamicina y ciclosporina A simultáneamente	166
<b>11 Conclusiones</b>	<b>169</b>
<b>12 Literaturverzeichnis</b>	<b>171</b>
<b>13 Anhang</b>	<b>187</b>
<b>14 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>199</b>



---

## 1 Einleitung

Wir sind im „omics“-Zeitalter der Lebenswissenschaften, in dem biologische Komponenten nicht individuell sondern in ihrer Gesamtheit analysiert werden. Hierbei werden unter anderem Gene, Proteine, Stoffwechselfvorgänge und Glykostrukturen untersucht. Glykostrukturen spielen eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen, beispielsweise Zelladhäsion, Sekretion und Abbau von Proteinen, sowie bei Rezeptoraktivierung und Endozytose (Ohtsubo & Marth, 2006). Glykostrukturen haben sowohl strukturelle als auch funktionelle Bedeutungen. Glykane sind die vielfältigsten Biopolymere, die pro Gewichtseinheit mehr Information als Proteine oder Nukleinsäuren tragen können (Alavi & Axford, 2008). Anfangs wurde angenommen, dass die Proteinglykosylierung nur sekretorische Proteine betrifft, später wurde sie aber auch bei Kernproteinen und cytoplasmatischen Proteinen entdeckt. Glykosylierungsreaktionen werden durch Glykosyltransferasen und Glykosydasen katalysiert. Diese Enzyme sind hoch konserviert, allerdings ist die phänotypische Variation zwischen Organismen sehr groß (Varki, 2006). Viele Wirt-Pathogen Interaktionen beruhen auf der gegenseitigen Erkennung der oberflächlichen Glykostrukturen. Der Pilz *Candida albicans* besitzt eine reiche Glykoproteinschicht außerhalb der Zellwand, deren Störung schädlich für den Pilz ist und die Erkennung seitens des menschlichen Immunsystems begünstigt. In dieser Arbeit wird die Regulation einer bestimmten Familie von Glykosylierungsgenen bei *C. albicans* untersucht, die Protein-*O*-Mannosyltransferase (*PMT*) Gene.

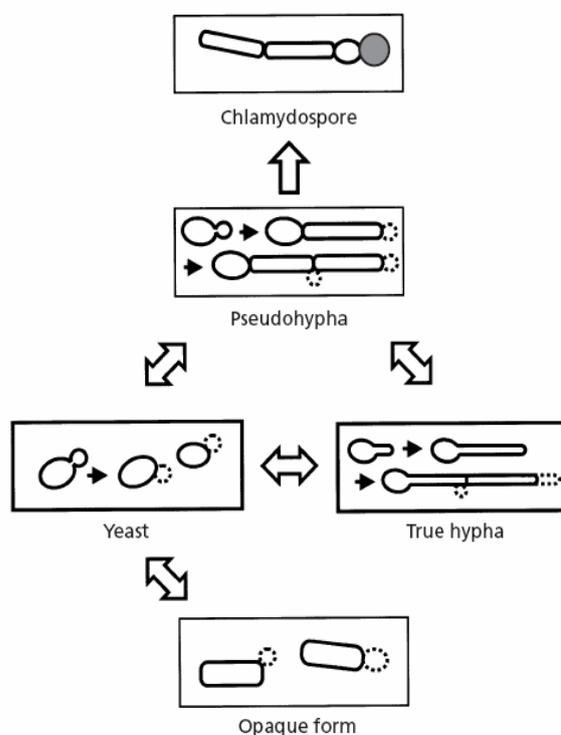
### 1.1 *Candida albicans*

*C. albicans* ist der bedeutendste Erreger von oberflächlichen und systemischen Pilzkrankungen des Menschen. Mehrere Charakteristika machen *C. albicans* einzigartig und beeinflussen seine Virulenz, besonders sein Polymorphismus, sein diploider Chromosomensatz, seine klonale Art der Vermehrung, und seine Anpassungsfähigkeit (Larriba & Calderone, 2008).

- Polymorphismus:

Die Regulation der Zellmorphologie ist für alle Organismen von Bedeutung (Walton *et al.*, 2006). *C. albicans* hat die Fähigkeit in verschiedenen morphologischen Formen zu wachsen: als Hefezelle, als Hyphenzelle, und als Pseudohyphenzelle. Dazu kommen die

stäbchen förmige „Opaque“-Form, die für die Paarungs-Kompetenz wichtig ist, und die Chlamydosporen. Letztere sind wahrscheinlich dickwandige Ruhe- oder Überdauerungsformen (Citiulo *et al.*, 2009) (Abb. 1). Der Wandel zwischen den Wachstumsformen hängt von externen und internen Faktoren ab (Whiteway & Bachewich, 2007). *C. albicans* wird häufig als dimorpher Pilz bezeichnet, da die kugeligen Hefe- und filamentösen Hyphen- und Pseudohyphen-Zellen am häufigsten vorkommen. Die Hefen sind kugelige Zellen (bei *C. albicans* auch Blastosporen genannt), die sich durch Knospung vermehren. Echte Hyphen wachsen ununterbrochen apikal und bilden ein Filament, das durch Septen in einzelne Zellen getrennt wird. Bei der Pseudohyphen-Form handelt es sich um elongierte Hefezellen, die sich nach der Cytokinese nicht trennen.



**Abb. 1: *C. albicans* Morphologien.** Die häufigste morphologische Formen von *C. albicans* sind die Hefeform und die Hyphenform, außerdem kann er auch Pseudohyphen und Chlamydosporen bilden und zwischen den „White“- und „Opaque“-Formen wechseln (Ernst, 2000).

**Fig. 1: Morfología de *C. albicans*.** Las dos formas morfológicas más comunes de *C. albicans* son levadura e hifa, no obstante, puede formar también pseudohifas y clamidosporas, y sufrir un cambio fenotípico espontáneo denominado blanco-opaco (Ernst, 2000).

Der reversible Wandel der Zellmorphologie, der von großer Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans* ist, kann sehr schnell stattfinden. Der Wechsel von der Hefeform in das filamentöse Wachstumsform wird durch zahlreiche Stimuli induziert, z. B. niedrige Zelldichte, Serum, GlcNAc, eine erhöhte Temperatur von  $\geq 37$  °C, bestimmte nährstoffarme Medien, Kontakt mit einer Oberfläche und neutralen pH (Ernst, 2000; Shapiro *et al.*, 2009). Die Chlamydosporen-Bildung wird durch nährstoffarmes Medium, niedrige Sauerstoffkonzentration und Dunkelheit begünstigt (Citiulo *et al.*, 2009). Sowohl die Hefeform als auch die filamentöse Form sind in

infiziertem Gewebe nachweisbar, während Chlamydosporen nur sehr selten in Patientenmaterial beobachtet werden (Uhl *et al.*, 2003; Citiulo *et al.*, 2009).

Eine der Hauptkomponenten der morphogenetischen Regulation von *C. albicans* ist der Efg1 Transkriptionsfaktor. Dieses Protein wirkt als Aktivator oder als Repressor der Morphogenese in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen (Ernst, 2000).

- Klonale Vermehrung:

Pujol *et al.* (1993) verglichen den Enzym polymorphismus von 21 Genloci bei *C. albicans*. Sie verglichen ihre experimentellen Ergebnisse mit den erwarteten Werten aus Segregations- und Rekombinationsmustern bei zufälliger Verteilung von Markern. Aus dem stabilen Heterozygotiemuster von *C. albicans*-Isolaten ergab sich eine hauptsächlich klonale Vermehrung. Diese Vermehrungsform wurde durch die relative Stabilität von chromosomalen Heterozygotiemarkern bestätigt (Gräser *et al.*, 1996). In den letzteren Jahren wurde aber ein „Mating Type-like“ (*MTL*) Locus bei *C. albicans* beschrieben, der den Loci von *S. cerevisiae* und anderer Ascomyceten ähnlich ist; außerdem wurden Paarung und Karyogamie nachgewiesen (Hull *et al.*, 2000). Diese Vorgänge sind bei natürlichen Isolaten aus verschiedenen Gründen jedoch relativ selten. Der *C. albicans* *MTL*-Locus ist heterozygot (*MTLa/MTL $\alpha$* ) und ist auf Chromosom 5 lokalisiert. Um zu paaren, müssen die Zellen homozygot werden (*MTLa/a* oder *MTL $\alpha$ / $\alpha$* ), und danach müssen sie von der „White“- in die „Opaque“-Form wechseln, um paarungsfähig zu werden, was nur unter bestimmten Bedingungen abläuft (Soll, 2009). Möglicherweise erleichtert die Biofilmbildung von homozygoten „White“-Zellen ihre Paarung mit „Opaque“-Zellen. Durch die Paarung von homozygoten Diploiden mit unterschiedlichen Paarungstypen (unter Umständen auch desselben Paarungstyps) kommt es zur Bildung von tetraploiden Zellen, die durch Chromosomenverlust und Rekombinationsvorgänge in den diploiden Zustand übergehen. Durch diese Vorgänge kann das genetische Material von *C. albicans* in geringem Umfang umgeordnet werden, obwohl die klonale Vermehrung überwiegt.

- Weitere genetische Besonderheiten:

*C. albicans* ist obligat diploid, und die doppelte Gendosis wird für den Phänotyp des Wildtyps benötigt (Uhl *et al.*, 2003). Heterozygotie ist häufig und erhöht dadurch die genetische Diversität (Larriba & Calderone, 2008). *C. albicans* hat einen speziellen

---

Kodongebrauch, der von dem Standardgebrauch abweicht: das Kodon CUG wird als Serin statt Leucin translatiert (Fitzpatrick *et al.*, 2006).

- Anpassungsfähigkeit:

Es wird vermutet, dass es ca. 1.5 Millionen Pilzarten gibt. Trotzdem sind nur wenige davon fähig, menschliche Krankheiten auszulösen. Dafür brauchen sie besondere Anpassungsmechanismen, deren Antwort an die wechselnden Mikro-Umweltbedingungen des Organismus schnell sein soll (Brown *et al.*, 2009; Brock, 2009). *C. albicans* überlebt in der Magen-Darm-Trakt als Kommensale, wo der pH einen breiten Bereich (pH 2-8) zeigt (Davis, 2009); als Pathogen muss sich *C. albicans* nicht nur an die Bedingungen der Oberfläche des Wirtes, sondern auch an die systemischen Bedingungen anpassen, wie z.B. die Glukoseanreicherung, limitierte Eisenbioverfügbarkeit und hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration im Blut (Brock, 2009; Kornitzer, 2009), den unterschiedlichen Sauerstoffdruck der Organe, ROS und NO Radikale in Macrophagen (Brown *et al.*, 2009), limitierten Nährstoff in Phagosomen und nekrotischen Geweben (Brock, 2009), usw.. Die Nische-abhängige Genexpression von *C. albicans* begünstigt seine Überlebensfähigkeit (Kumamoto, 2008). *C. albicans* hat auch mehrere Mechanismen gegen Antimykotika entwickelt. Dazu gehören die Mutationen in den Zielproteinen (Mutationen in Erg11 gegen Azole), Überproduktion von Transportern (ABC- und Mdr1-Transporter gegen Triazole) und Aktivierung verschiedener Stress Signalwege (Cowen & Steinbach, 2008).

- Epidemiologie und Pathogen-Wirt Interaktion von *C. albicans*:

*C. albicans* befindet sich unter normalen Bedingungen auf menschlichen Haut- und Schleimhautoberflächen. Das Zerstören des Gleichgewichts der Mikroflora oder das Schwächen des Immunsystems können die Entstehung einer Infektion begünstigen. Durch *Candida*-Species verursachte klinische Krankheiten werden in zwei Gruppen eingeteilt: Schleimhaut-Infektionen und systemische Infektionen. Jede Infektionsart hat ihre eigenen Risikofaktoren. Systemische Kandidosen werden durch intravenöse Katheter, Breitspektrum-Antibiotika, die Verletzung der Magen-Darm-Schleimhaut und Neutropenie begünstigt (Shoham & Levitz, 2005).

Nosokomiale Erkrankungen sind in Industrieländern ein bedeutender Grund für Morbidität und Mortalität geworden. *C. albicans*-Infektionen gehen in den letzten Jahren etwas zurück, während non-*albicans*-Kandidosen und non-*Candida*

Pilzinfektionen (Aspergillosis, Zygomycosis, Fusariosis) zunehmen (Lass-Flörl, 2009). *C. albicans* ist trotzdem der Hauptverursacher von Kandidosen (56.4 %). Es folgen *C. glabrata* (13.6 %), *C. parapsilosis* (13.3 %) und *C. tropicalis* (7.2 %). In Patienten mit Infektionen durch zwei *Candida*-species war *C. albicans-C. glabrata* die häufigste Kombination (Tortorano *et al.*, 2004).

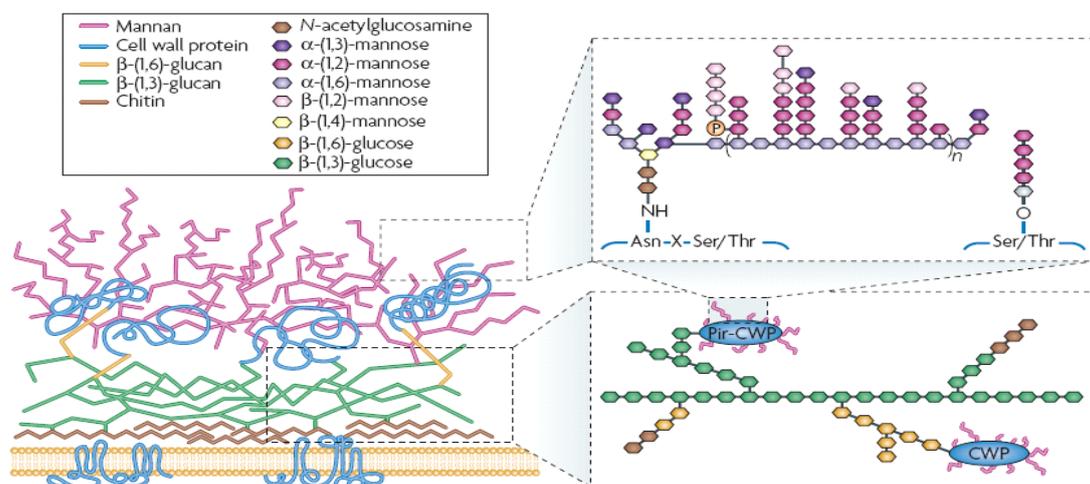
Drei Sorten von Antimykotika werden zur Behandlung von Kandidosen eingesetzt: Polyene, Azole und Echinocandine. Amphotericin B (AmpB) gehört zu den Polyenen. Es bindet an das Ergosterol der Zellmembran und stört die Permeabilität der Membran. AmpB war eines der ersten Antimykotika und sein Effekt kann je nach Dosis und Pathogen sowohl fungistatisch als auch fungizid sein. Seine größten Nachteile sind die niedrige Bioverfügbarkeit bei oraler Einnahme (< 5 %) und die Nierentoxizität. Azole hemmen die Ergosterol-Biosynthese, indem sie das Enzym Lanosterol-14- $\alpha$ -Demethylase inhibieren. Azole sind fungistatisch und das Spektrum ihrer Aktivität variiert zwischen den einzelnen Wirkstoffen (Deck & Guglielmo, 2006). Echinocandine (Caspofungin, Anidulafungin und Nikafungin) hemmen die  $\beta$ 1,3-D-Glukan Synthase. Die  $\beta$ 1,3-D-Glukan Synthase besteht aus zwei Untereinheiten, den Rho1 und Fks-Proteinen. Fks-Proteine werden von *FKS1*, *FKS2*, und *FKS3* kodiert, und Mutationen in diesen Genen führen zur Echinocandin-Resistenz. Nachteil von Echinocandinen ist ihr eingeschränktes Wirkungsspektrum, da sie aktiv gegen *Candida* (fungizid) und *Aspergillus* sp. (fungistatisch) sind, während *Zygomycetes*, *Cryptococcus* und *Trichosporum* sp. dagegen resistent sind. Echinocandine können weder in das zentrale Nervensystem noch in das Auge eindringen und sind daher bei pilzbedingter Meningitis oder Endophthalmitis nicht geeignet (Bal, 2010).

Sowohl Human- als auch Pilzzellen sind Eukaryoten, aber nur Pilzzellen besitzen eine Zellwand. Die angeborene Immunabwehr des Menschen mit  $\beta$ -Glukan-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren (MR) und Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) erkennt Teile der Pilzzellwand. Dectin 1 ist ein PRR (Pattern recognition receptor), der  $\beta$ -Glukan erkennt. Wenn *C. albicans* sich in der Hefeform befindet, erkennen diese Rezeptoren den Pilz wegen des hohen und zugänglichen  $\beta$ 1,3-Glukananteils von Knospungsnarben. Die Hyphenform wird nicht erkannt, weil Knospungsnarben fehlen und  $\beta$ -Glukan nicht zugänglich ist (Fernandes *et al.*, 2008). Zuletzt erkennen MR und TLR4 *N*-Mannanen bzw. *O*-Mannanen (McKenzie *et al.*, 2010).

## 1.2 Die Zellwand der Pilze

Die Zellwand besteht größtenteils aus einem dreidimensionalen Netz aus Polysacchariden. Sie ist eine dynamische Struktur, deren Zusammensetzung das Ergebnis von Kultur- und Stress-Bedingungen der Pilze ist. Die Hemmung der Zellwandsynthese führt zum Tod des Pilzes. Säugerzellen haben keine Zellwände und daher ist die Pilzzellwand ein wichtiges Ziel für antimykotische Substanzen.

Die drei wichtigsten Funktionen der Zellwand sind der Widerstand gegenüber dem cytoplasmatischen Turgordruck, der Erhalt der Zellform und der direkte Kontakt mit der Umgebung. Strukturelle Zellwandkomponenten sind Chitin (lineares Polymer aus  $\beta$ 1,4-GlcNAc),  $\beta$ 1,3-Glukan,  $\beta$ 1,6-Glukan (Glukose-Polymere), und Mannoproteine, die in zwei Schichten verteilt sind: auf der Innenseite eine Schicht aus Chitin und Glukan und auf der Außenseite eine Schicht aus Mannoproteinen. Die Zellwandproteine werden in kovalent gebundene Proteine (GPI-CWP und Pir-Proteine) und nicht kovalent gebundene Proteine klassifiziert. Eine weitere Glykostruktur ist das Phospholipomannan, das aus einem Lipidanteil und einer  $\alpha$ 1,2-Mannose Kette besteht (Abb. 2) (Kapteyn *et al.*, 2000; Chaffin, 2008).



**Abb. 2: Zellwand-Struktur der Pilze.** Chitin und  $\beta$ -Glukan lokalisieren in der inneren Schicht der Zellwand. Der äußere Schicht besteht aus Mannoproteinen, welche kovalent (GPI-CWP und Pir-CWP) und nicht kovalent gebunden sein können (Netea *et al.*, 2008).

**Fig. 2: Estructura de la pared celular fúngica.** La quitina y el  $\beta$ -glucano se encuentran en la capa interna de la pared celular. La capa externa está formada por manoproteínas, que pueden estar ancladas mediante un enlace covalente (proteínas Pir y con enlace GPI) o asociadas mediante un enlace no covalente (Netea *et al.*, 2008).

Die Zellwand wird insbesondere während des Zellzyklus, spezifischer Zellentwicklungsprozesse (Paarung, Pseudhyphen-Wachstum, Sporulation) und während der Antwort auf Zellwandstress synthetisiert (Smits *et al.*, 2001).

Die Zellwand ist eine essentielle und speziell aufgebaute Organelle der Pilze, die im Rahmen der Immunabwehr durch den Wirt angegriffen wird. Wenn diese Struktur geschädigt wird, aktiviert der Pilz eine Reihe von Signalwegen, um die Integrität der Zellwand zu erhalten. Die Antwort besteht aus einer Erhöhung der Synthese von Glukan, Chitin und Zellwandproteinen, der Aktivierung von alternativen Mechanismen zur Stabilisierung der Zellwand und aus der Umverteilung des Aktin-Cytoskeletons um die ganze Zelle herum und nicht nur an den aktiven Wachstumszonen (Smits *et al.*, 2001). Zellwandproteine sind häufig glykosyliert, und Defekte in der Glykosylierung führen zu Proteinmissfaltung, Instabilität und niedriger enzymatischer Aktivität (Wagener *et al.*, 2008). Daher ist die Glykosylierung wichtig für die korrekte Bildung und für den Erhalt der Zellwand. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in der Resistenz einiger *pmt*-Mutanten von *S. cerevisiae* gegenüber dem Killer Toxin K1. Dieses Toxin interagiert mit  $\beta$ 1,6-Glukan, das in *pmt*-Mutanten verändert ist (Gentsch & Tanner, 1996).

### 1.3 Glykosylierung

In der Natur kommen zahlreiche Glykanstrukturen vor, die geringe bis entscheidende Bedeutung für das Wachstum, das Überleben und die Entwicklung von Zellen und Organismen haben (Varki *et al.*, 1999).

Glykane können vielfältige strukturelle und funktionelle Eigenschaften haben. Von besonderer Bedeutung für Pathogen-Wirt Interaktionen ist die spezifische Erkennung von Glykanstrukturen durch Rezeptorproteine, z.B. Lectine.

In dieser Arbeit werden *N*-Glykosylierung und *O*-Glykosylierung zusammengefasst, es muss aber erwähnt werden, dass auch andere Arten der Glykosylierung vorkommen, wie z.B. Phosphoglykosylierung, C-Mannosylierung und Glipeptidation.

#### 1.3.1 *N*-Glykosylierung

*N*-Glykane sind Asparagin (*N*)-gebundene Oligosaccharide. Alle eukaryotischen Zellen bilden diese Art von Glykostrukturen. Der Oligosaccharid-Kern besteht aus

Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und wird an Dol-P synthetisiert. Die ersten sieben Schritte finden auf der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Dann wird Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-Dol in das Lumen des ER transloziert, wo die Synthese fortgesetzt wird. Der vollständige Kern (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-Dol) wird *en bloc* auf das Protein durch den OST-Komplex transferiert. Das Sequon, das durch den OST-Komplex erkannt wird, ist Asn-X-Thr/Ser, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann; tatsächlich werden aber nur etwa 30 % der potenziellen N-Stellen glykosyliert (Varki *et al.*, 1999). Die proteingebundene Kernstruktur wird im ER prozessiert, indem die drei endständigen Glc-Moleküle und ein Man-Molekül abgespalten werden.

Die Synthese der Kernregion und die Übertragungsabläufe auf das sekretorische Protein sind bei Eukaryoten hoch konserviert. Im Gegensatz dazu steht die Vielfalt der Modifikationen, die im Golgi stattfinden und z.B. bei Pilzen und Säugerzellen sehr unterschiedlich sind. Hierbei werden durch Glykosyltransferasen verschiedene Zucker in abweichender Anzahl und glykosydischer Bindung an die Kernregion angehängt.

	N-GLYKOSYLIERUNG	O-GLYKOSYLIERUNG	
		niedere Eukaryoten	höhere Eukaryoten
Aminosäure	Asn	Ser/Thr	Ser/Thr auch Hyp, Hyl, Tyr
Sequon	Asn-X-Ser/Thr	Unbekannt	Unbekannt
1. Zucker	Glc <sub>3</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub> -	Man	GalNAc
Verknüpfung	Oligosaccharid-Prekursor wird <i>en bloc</i> transferiert	Oligosaccharide werden einzeln transferiert	Oligosaccharide werden einzeln transferiert
Ort der Reaktion	ER	ER	Golgi
Modifikationen der Kette	ER, Golgi, bei Pilzen wird hauptsächlich Man verknüpft; bei höheren Eukaryoten kann die Modifikation als Man-reich, Hybrid oder Komplex klassifiziert werden	Golgi, Man wird angeheftet	Golgi, GlcNAc, Fuc, Gal, Man und Sialicäure werden angeheftet
Struktur	Sehr komplex, mehrfach verzweigt	Lineal	Diverzweigt

**Tabelle 1:** Vergleich der Prozesse der N-Glykosylierung und O-Glykosylierung.

### 1.3.2 *O*-Glykosylierung

Während *N*-gebundene Oligosaccharide eine gemeinsame Kernstruktur unabhängig von dem Ursprung teilen, zeigen *O*-gebundene Oligosaccharide mehr Vielfalt in Eukaryoten sowohl in den Zuckermolekülen als auch in der Zuckerverknüpfung (Oka *et al.*, 2005).

Die Zuckermoleküle werden an den Hydroxylrest der Aminosäuren Serin und/oder Threonin angekoppelt. Am häufigsten werden die Zuckermoleküle GalNAc, GlcNAc, Man und Fuc gebunden, obwohl die Verknüpfung von Xyl, Gal, Glc und Ara auch beschrieben wurde. Ebenso kann nicht nur der Hydroxylrest der Aminosäure Ser und Thr als Akzeptor gelten, sondern auch derjenige von Hyp, Hyl und Tyr. Jedes Zuckermolekül wird einzeln gebunden und die resultierenden Strukturen sind normalerweise nur diverzweigt und nicht so ausgebreitet wie bei der *N*-Glykosylierung. *O*-Glykosylierung bezieht sich in der Regel auf die Verknüpfung von GalNAc an Ser/Thr bei höheren Eukaryoten. Bei Hefen wird hauptsächlich Mannose auch an Ser/Thr angeheftet und repräsentativ für Pflanzen ist die Bindung von Gal und Ara an Hyp (Spiro, 2002; Varki *et al.*, 1999).

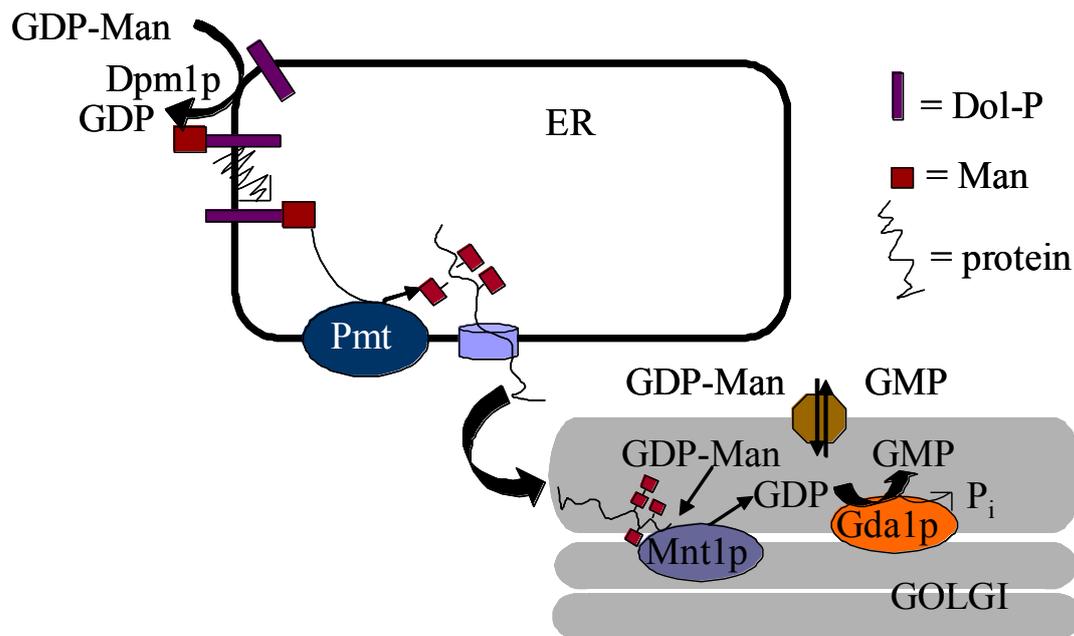
### 1.3.3 Protein-*O*-Mannosylierung

*O*-Mannosylierung kommt hauptsächlich bei Pilzen vor, obwohl in den letzten Jahren auch *O*-mannosylierte Proteine bei Säugern identifiziert wurden. Die Protein-*O*-Mannosyltransferase (Pmt) katalysiert die Verknüpfung des ersten Mannose-Restes an die Aminosäuren Serin und/oder Threonin der Akzeptorproteine. Das Man-Molekül wird von Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man) auf der lumenalen Seite des ER während der Translokation des sekretorischen Proteines durch die Sec61-Pore übertragen.

Dol-P-Man entsteht aus dem Donor GDP-Man und Dol-P durch das Dpm1 Enzym. Während der Verknüpfung an das Protein, wird die anomere Konfiguration des Zuckers von  $\beta$ - zu  $\alpha$ -glykosidischer Bindung geändert, in einem bisher noch nicht gut verstandenen Prozess (Ernst & Prill, 2001). Die Mannose-Kette kann im Golgi bis auf sieben Moleküle verlängert werden; hauptsächlich bestehen bei *C. albicans* Ser/Thr verknüpfte Zucker aber nur aus 1-2 Mannoseresten. Für die Verlängerung der Mannosylketten sind die Mnt1 und Mnt2 Mannosyltransferasen verantwortlich (Munro *et al.*, 2005). An der Kettenverlängerung bei *S. cerevisiae* sind weitere Transferasen beteiligt, z. B. spielen die  $\alpha$ 1,3-Mannosyltransferasen und die KTR-Proteine dabei eine

Rolle. Golgi Mannosyltransferasen verwenden den aktivierten GDP-Man Zucker. Dieser wird in dem Golgi im Austausch gegen GMP importiert, aus dem dann bei der Transferasereaktion im Golgi GDP durch die Gdal GTPase gespalten wird (Abb. 3) (Herrero *et al.*, 2002).

Bei *S. pombe* und *Aspergillus* sp. wurde beschrieben, dass die lineare Mannosylkette durch laterale Modifikationen auch verzweigt werden kann (Lommel & Strahl, 2009).



**Abb. 3: Prozess der O-Mannosylierung.** Das erste Mannosemolekül wird in dem ER an das Protein verknüpft. Wenn das Protein in den Golgi gelangt, kann die O-Glykosylkette auf bis zu sieben Mannose-Reste verlängert werden. In *C. albicans* werden typischerweise nur ein oder zwei Mannose-Moleküle durch das Mnt1-Protein angeheftet.

**Fig. 3: O-manosilación.** La primera molécula de manosa se añade a la proteína en el RE. La cadena se puede alargar hasta siete residuos de manosa, en el aparato de Golgi. En *C. albicans* normalmente sólo se añaden una o dos moléculas más mediante la proteína Mnt1.

## 1.4 Die Pmt-Proteine

Pmt-Proteine, die zuerst in Pilzen beschrieben wurden, werden in die drei Pmt1-, Pmt2-, und Pmt4-Unterfamilien klassifiziert. Bei *S. cerevisiae* wurden sieben Pmt-Proteine identifiziert, während bei *C. albicans* fünf Isoformen, und bei anderen Pilzen nur jeweils eine pro Unterfamilie vorkommen. Homologe Proteine wurden später bei *Drosophila melanogaster*, Mäusen und dem Menschen entdeckt. Keine Homologen sind

dagegen aus *Caenorhabditis elegans* und Pflanzen bekannt (Gentzsch & Tanner, 1996; Prill *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008).

Die Zielsequenz für die *O*-Mannosylierung sowie die dermeisten Pmt-Zielproteine sind noch unbekannt. Bei *S. cerevisiae* wurden die Proteine Kre9, Cts1, Bar1, Pir2 und Aga2 durch Pmt1/Pmt2 *O*-mannosyliert. Zielproteine von Pmt4 sind Kex2, Gas1, Axl2 und Fus1 (Gentzsch & Tanner, 1997). Mid2 und Ccw5/Pir4 werden durch beide glykosyliert (Lommel *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2003). Eine detaillierte Analyse der Proteine, die von Pmt4 glykosyliert werden, ergab, dass alle Zielproteine Membran-assoziiert sind. Das Signal für die Erkennung seitens Pmt4 ist nicht die lineare Sequenz des Proteins, sondern die Existenz einer Ser/Thr-reichen Domäne im ER Lumen, in Nachbarschaft zu einer Transmembranregion (Hutzler *et al.*, 2007).

Das am besten charakterisierte Pmt-Protein ist Pmt1 bei *S. cerevisiae*. Es handelt sich um ein Transmembranprotein mit sieben Transmembrandomänen, wobei der N-Terminus sich im Cytosol und der C-Terminus im Lumen des ER befindet. In der Transmembrandomäne 2 befindet sich ein Arg Rest (Arg-138), der essentiell für die Bildung und Stabilität der Pmt1/Pmt2 Komplexe ist (Girrbach *et al.*, 2000). Zwei große lumenale Schleifen, Schleife 1 und Schleife 5, sind von großer Bedeutung für die enzymatische Aktivität. In Schleife 5 befinden sich drei konservierte Motive: A, B, und C, die ebenfalls in anderen Pmt-Isoformen vorkommen. In Motiv A von Pmt4 befindet sich eine 7 Aminosäure-Insertion, die Sequenz LSHS ist nur in Motiven A und B von Pmt1 konserviert und Pmt1-Homologe enthalten einen Cystein-Rest in Motiv C (Girrbach *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2007). Schleife 5 fehlt in den Pmt-Proteinen von Bakterien, und könnte daher speziell bei Eukaryoten eine Funktion haben (Abb. 4) (Lommel & Strahl, 2009).

Bei *S. cerevisiae* bilden Pmt-Proteine verschiedene Komplexe aus. Pmt1 interagiert mit Pmt2, während Pmt5 mit Pmt3 interagiert. Falls eines davon fehlt, kann Pmt1 mit Pmt3, und Pmt5 mit Pmt2, interagieren. Pmt4 bildet im Gegensatz nur Homodimere aus (Girrbach & Strahl, 2003).

Die *O*-Mannosylierung im ER ist auch ein defensiver Mechanismus, da sie die Solubilität von falsch gefalteten Proteinen verbessert, um ihre Aggregation zu verhindern (Kuroda *et al.*, 2008). Bei *S. cerevisiae* wurde durch die Aktivierung des UPR-Weges eine Erhöhung der Expression der *PMT1*-, *PMT2*-, *PMT3*- und *PMT5*-Gene nachgewiesen (Travers *et al.*, 2000).

### 1.4.1 Pmt-Proteine in *C. albicans*

Bei *C. albicans* sind fünf Pmt isoformen identifiziert worden: Pmt1 und Pmt5 (Pmt1-Unterfamilie), Pmt2 und Pmt6 (Pmt2-Unterfamilie) und Pmt4 (Pmt4-Unterfamilie). *PMT2* ist ein essentielles Gen und die Doppelmutante *pmt1 pmt4* ist nicht lebensfähig. Die *pmt1*-Mutante ist Temperatur-sensitiv (42 °C) und sie bildet Aggregate (Prill *et al.*, 2005). Die Deletion jedes *PMT*-Gens löst eine Reihe von spezifischen Phänotypen aus. In Bezug auf die Morphogenese wurde festgestellt, dass alle Mutanten außer der *pmt5*-Mutante weniger oder keine Hyphen auf bestimmten festen Medien (Lee-, Spider-Medium) ausbilden können (Timpel *et al.*, 1998; Prill, 2004). Bei eingebetteten oder unter hypoxischen Bedingungen war in den Mutanten, mit Ausnahme der *pmt1*-Mutante, die Filamentbildung wieder möglich. Auffallend war, dass die *pmt2/PMT2*-Heterozygote, und den *pmt4*- und *pmt4 pmt6*-homozygoten Mutanten in Agar sogar eine stärkere Hyphen-Bildung als der Wildtyp zeigten (Prill *et al.*, 2005). Die Überproduktion von Efg1 und anderen Signalkomponenten wie Cek1 konnte in einer *pmt6*-Mutante den Filamentierungsdefekt wieder aufheben; dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die durch Pmt6 vermittelte O-Mannosylierung eine Rolle in Signalwegen der Morphogenese spielt (Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Die Bildung von Chlamydosporen wurde aber durch *pmt*-Mutationen nicht betroffen. Der heterozygote *pmt2/PMT2*-Stamm und die *pmt1*- und *pmt4*-Mutante zeigten verschiedene Sensitivitäten gegen destabilisierende Agenzien und Antimykotica. *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten zeigten starke Veränderungen in der Zellwand im Vergleich zu dem Wildtyp, z. B. eine Erhöhung des  $\beta$ -1,3-Glukan und Chitinspiegels und eine drastische Reduktion von Mannoproteinen (Prill *et al.*, 2005). Die Rolle der Pmt-Proteine in der Virulenz von *C. albicans* wurde in drei Infektionsmodellen untersucht: zwei Gewebe-Modellen, RHE (reconstituted human epithelium) und EHOM (engineered human oral mucosa), und einem systemischen Modell, HDC (hematogenously disseminated candidiasis). Bei RHE handelt es sich um ein mehrschichtiges Epithel aus der TR146-Zelllinie, das aber nicht alle Charakteristika eines echten Epithels besitzt. Im Unterschied dazu hat das EHOM-Epithelium eine gut organisierte Epidermis-ähnliche Struktur. *pmt*-Mutanten waren außer der *pmt5*-Mutante nicht in der Lage die Zellen zu schädigen. Demgegenüber waren die *pmt4*- und *pmt6*-Mutanten genauso virulent wie der Wildtyp in Bezug auf das EHOM-Modell, während die *pmt1*- und *pmt5*-Mutanten eine verringerte Virulenz in diesem Modell zeigten. Die verringerte Virulenz der *pmt5*

---

Mutante in dem EHOM Modell ist bisher sein einziger annotierter Phänotyp. In dem systemischen Infektionsmodell wurde nachgewiesen, dass die *PMT1*-, *PMT2*-, *PMT4*- und *PMT6*-Gene wichtig für die vollständige Virulenz sind (Rouabhia *et al.*, 2005).

Die Interaktion der Pmt-Isoformen von *C. albicans* wurde untersucht und es konnte durch das Split-Ubiquitin-System gezeigt werden, dass Pmt2, Pmt4 und Pmt6 Homodimere bilden. Homodimerbildung konnte auch von Pmt1, aber nicht durch das Split-Ubiquitin System, sondern durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden (Schmidt, 2007; Pilkahn-Reh, 2009). Zusätzlich bilden Pmt1- und Pmt2-Isoformen auch Heterodimere.

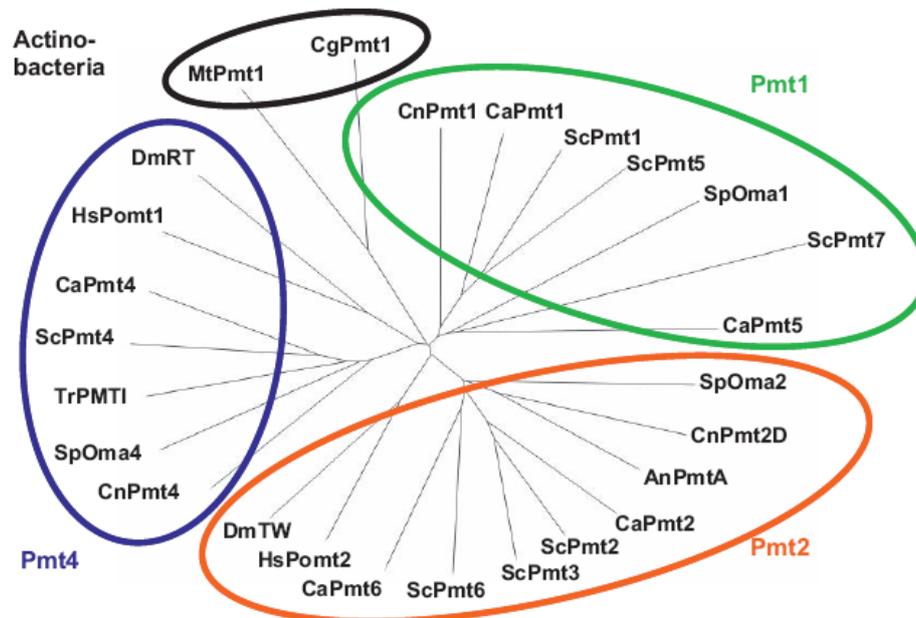
Die bisherigen Untersuchungen haben deutliche Unterschiede der Dimerbildung von Pmt-Proteinen bei *C. albicans* und *S. cerevisiae* gezeigt. Während bei *S. cerevisiae* der Austausch von Arginin-142, einer konservierten Aminosäure in der zweiten Transmembranregion gegen Glutamat, die Homodimerbildung verhinderte und die Deletion der großen lumenalen Schleifen keinen Einfluss hatte (Girrbach & Strahl, 2003), werden bei *C. albicans* genau entgegengesetzte Verhältnisse beobachtet (Misselwitz, 2007). Die funktionelle Bedeutung der Dimerbildung ist noch unbekannt.

Die Fähigkeit von *C. albicans* zur Biofilm-Bildung wurde als Virulenzfaktor erkannt (Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2006). *C. albicans*-Biofilme entstehen auf einer Oberfläche und bestehen aus Hefezellen in einer inneren Schicht und Hyphenzellen in einer äußeren Schicht, die von einer extrazellulären Matrix umgeben werden (Stichernoth & Ernst, 2009). *O*-Mannosylierung spielt auch hier eine Rolle, so wurde beschrieben, dass *pmt1*- und *pmt2/PMT2*-Stämme stark in ihrer Fähigkeit Biofilme zu bilden, beeinträchtigt sind, während *pmt4*- und *pmt6*-Mutanten teilweise defekt waren (Peltroche-Llacsahuanga *et al.*, 2006). Kürzlich wurde nahe gelegt, dass die Gasbedingungen die Biofilm-Bildung stark beeinflussen. Während die *pmt1*-Mutante unter allen Bedingungen keinen Biofilm bildete, konnten *pmt2/PMT2*-Stämme und die *pmt4*-Mutante zwar keinen Biofilm unter oxischen Bedingungen bilden, jedoch war dieses unter hypoxischen Bedingungen möglich (Stichernoth & Ernst, 2009).

### 1.4.2 Pmt-Proteine in anderen Pilzen

Pmt-Proteine wurden auch in anderen pathogenen und non-pathogenen Pilzen beschrieben (Abb. 5).

*Schizosaccharomyces pombe* hat drei Pmt-Proteine, Ogm1/Oma1, Ogm2/Oma2 und Ogm4/Oma4, jeweils eins pro Pmt-Unterfamilie. Die Deletion der einzelnen Gene ergibt lebensfähige Mutanten, aber die Doppeldeletion *ogm1+ ogm4+* und die Dreifachdeletion *ogm1+ ogm2+ ogm4+* sind nur unter osmotisch-stabilisierenden Bedingungen lebensfähig. *O*-Mannosylierung bei Ogm1 und Ogm4 ist für die Zellmorphologie und Paarung nötig. Eine Besonderheit der *O*-Mannosylierung bei *S. pombe* ist die Verknüpfung von einem oder zwei Gal Resten an der Mannosekette (Tanaka *et al.*, 2005; Willer *et al.*, 2005).



**Abb. 4: Phylogenetischer Baum der Pmt Proteine.** Die ClustalW Analyse verteilt die Pmt Proteine in drei Unterfamilien: Pmt1, Pmt2 und Pmt4. Cn: *Cryptococcus neoformans*, Ca: *Candida albicans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Tr: *Trichoderma reesei*, Hs: *Homo sapiens*, Mt: *Mycobacterium tuberculosis*, Cg: *Corinebacterium glutamicum* (Lengeler *et al.*, 2008).

**Fig. 4: Árbol filogenético de las proteínas Pmt.** La comparación de la secuencia aminoacídica en el programa ClustalW divide a las proteínas Pmt en tres subfamilias: Pmt1, Pmt2 y Pmt4. (Lengeler *et al.*, 2008).

---

Bei *Cryptococcus neoformans* wurden drei *PMT*-Gene identifiziert. *PMT1* und *PMT4* auf Chromosom 5 und *PMT2* auf Chromosom 10. Jedes *Pmt*-Protein gehört zu der entsprechenden *Pmt*-Unterfamilie. Die Sequenzidentität zu anderen *Pmt*-Proteinen zeigte die drei konservierten Sequenzmotiven. Die *C. neoformans pmt4*-Mutante wächst in kleinen Aggregaten, und Chitin wird zwischen den verbundenen Zellen angelagert. Dagegen zeigte die *pmt1*-Mutante weder Zellaggregation noch eine defekte Chitin-Verteilung. Diese Daten unterscheiden sich von den entsprechenden *C. albicans* Phänotypen (Olson *et al.*, 2007; Willger *et al.*, 2009). *FKS1*, das Gen für die Glukansynthese, wird bei 39 °C und AmpB im Wildtyp induziert, aber nicht in der *pmt4*-Mutante, was darauf hinweist, dass *Pmt4* für die Zellintegrität unter bestimmten Stress-Bedingungen nötig ist. Willger *et al.* (2009) konnten auch zeigen, dass die Synthese von Melanin in einer *pmt4*-Mutante betroffen wurde.

*Aspergillus fumigatus* ist ein thermotoleranter Pilz, der zwischen 30 und 50 °C wachsen kann. In diesem Pilz konnten drei *Pmt*-Proteine, *Pmt1*, *Pmt2* und *Pmt4*, identifiziert werden. Die *Afpmt1*-Mutante zeigte ein langsames Wachstum bei 42 und 50 °C, und dieser Defekt wurde durch osmotische Stabilisierung aufgehoben. Ein Wachstumsdefekt wurde ebenfalls bei 37 °C und mit CW beobachtet. Da in der Anwesenheit von Hygromycin B der Wachstumsdefekt mit 1 M Sucrose nicht beseitigt wurde, scheint in der *pmt1*-Mutante die Proteinsynthese inhibiert zu werden. Die *Afpmt1*-Mutante bildete weniger Conidiosporen bei 37 und 42 °C und keine bei 50 °C, jedoch war die Virulenz unverändert (Zhou *et al.*, 2007).

Bei *A. fumigatus* wurde auch ein *Mnt1*-Homolog beschrieben (Wagener *et al.*, 2008). Die entsprechende Mutante war lebensfähig, wuchs aber nicht bei 48 °C, bzw. nur mit osmotischer Stabilisierung. Sporenbildung und Konidien-Auskeimung waren in der Mutante nicht beeinträchtigt. Bei 48 °C konnte die Mutante zwar auskeimen, aber die gebildeten Keimschläuche waren kürzer und zeigten amorphe Strukturen an den Hyphenspitzen. Die Analyse durch Elektronenmikroskopie zeigte, dass die Zellwand an dieser Stelle instabil war und es zur Ruptur der Zelle und dem Ausfluss ihres Inhalts kam.

Bei *Aspergillus nidulans* wurden drei *Pmt*-Proteine beschrieben: *pmtA* (Unterfamilie 2), *pmtB* (Unterfamilie 1) und *pmtC* (Unterfamilie 4). Wie bei *S. pombe* gezeigt, waren alle drei Mutanten lebensfähig. Bei einer höheren Temperatur zeigten sie sowohl Zellwand- als auch morphologische Defekte. Die Zellwanddefekte entsprachen der niedrigen *O*-

Glykosylierung des AN5660 Proteins, eines Homologs des *S. cerevisiae* Wsc1-Sensorproteins (Kriangkripiat & Momany, 2009).

Bei *Trichoderma reesei* ist die *O*-Mannosylierung essentiell für die Proteinsekretion. Es wurde ein Pmt-Homolog beschrieben, PMTI, das in die Pmt4-Unterfamilie klassifiziert wurde. Die Aktivität des Proteins wurde in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Es wurde dabei gezeigt, dass PMTI ein funktionelles Homolog des Pmt2 ist, weil es einen aktiven Komplex mit ScPmt1 bildete und Chitinase (Zielprotein von Pmt2) glykosylierte (Zakrzewska *et al.*, 2003).

Neurdings wurden Pmt-Proteine bei *Ustilago maydis* beschrieben (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009). Dieser Basidiomycet bildet eine nicht pathogene haploide Hefeform und ein dikaryotisches filamentöses Stadium, das infektiös für Mais ist. *PMT2* ist essentiell für das Wachstum, während die Doppeldeletion *pmt1 pmt4* lebensfähig ist. Die Mutanten zeigten keine Zellwand-, Zellzyklus- oder Paarungsdefekte. Nur die *pmt4*-Mutante hatte eine erniedrigte Fähigkeit, Appressorien zu bilden und konnte daher nicht in die Pflanzkutikula eindringen.

### 1.5 *O*-Mannosylierung in höheren Eukaryoten

*O*-Mannosylierung kommt sehr selten in Säugetierproteinen vor.  $\alpha$ -Dystroglykan ist das am besten untersuchte *O*-mannosylierte Protein.  $\alpha$ -Dystroglykan ist Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein Komplexes, der  $\beta$ -Dystroglykan, Dystrophin und andere Moleküle enthält. Dieser Komplex ist ein Transmembranlinker zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Zytoskeletton. Die Mannosylketten des  $\alpha$ -Dystroglykans binden an die extrazellulären Proteine Laminin, Neurexin und Agrin. Wenn diese Interaktion nicht stattfinden kann, werden die normale Muskelfunktion und die Migration der Neuronen in dem entwickelnden Gehirn gestört (van Reeuwijk *et al.*, 2004). Die Unterglykosylierung des  $\alpha$ -Dystroglykan wird mit angeborener Muskeldystrophie, Hirnfehlbildung und strukturellen Augenabnormalitäten assoziiert. Verschiedene Syndrome entstehen mit diesen Fehlbildungen: das Walker-Warburg Syndrom (WWS), die Muskel-Auge-Krankheit (MEB) und die Fukuyama angeborene Muskeldystrophie (FCMP), von denen WWS das schwerste Syndrom ist.

In Menschen wurden zwei *PMT*-Homologe beschrieben, *POMT2* (Pmt2-Unterfamilie) und *POMT1* (Pmt4-Unterfamilie) (Abb. 5). Die entsprechenden Proteine befinden sich

in der ER Membran (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006). Beide Proteine bilden einen Komplex, der für die POMT-Aktivität notwendig ist. Bei Hefen bilden Pmt1-Unterfamilie Isoformen Komplexe mit Pmt2-Unterfamilie Isoformen, während Pmt4 Homodimere bildet. Die neue Kombination in Menschen zeigt, dass sich die Pmt-Assoziation in der Evolution geändert hat (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006). Neuerdings wurde von Manyá *et al.* (2009) veröffentlicht, dass POMT1 und PMT2 *N*-glykosyliert sind. Die einzelnen Deletionen der *N*-Glykosylstellen beeinflussten POMT-Aktivität nicht hochgradig, aber die Deletion von allen *N*-Glykosylstellen eliminierte sie. Bei Ratten und Mäusen kommen zwei *Pomt2* Transkripte vor, somatische *sPmt2* und Testikel *tPmt2*, die bei Säugetieren konserviert zu sein scheinen (Manyá *et al.*, 2006; Lommel *et al.*, 2008). Während *sPMT2* an der Protein-*O*-Mannosylierung teilnimmt, wird für *tPMT2* eine Lectin-Typ Aktivität, da es in dem Akrosom lokalisiert ist, vermutet. Diese Rolle wäre für die Interaktion von Sperma und Eizelle bei der Fertilisation wichtig.

Bei *Drosophila melanogaster* werden die *PMT*-Homologe rotated abdomen (*rt* [*POMT1*]) und twisted abdomen (*tw* oder *DmPOMT2* [*POMT2*]) bezeichnet. Mutationen in diesen Genen führen zu einer Drehung des Unterleibs im Uhrzeigersinn, und zu Defekten in der embryonischen Muskelentwicklung. Beide Proteine kolokalisieren im ER (Lyalin *et al.*, 2006).

Moore *et al.* (2008) entdeckten kürzlich *POMT* Homologe und weitere Gene, deren Produkte die Mannosylkette modifizieren, auch im Zebrafisch.

## 1.6 Signalwege und Regulation der Glykosylierung

Bei *S. cerevisiae* sind zwei Signalwege beschrieben worden, die durch defekte *O*-Glykosylierung aktiviert werden: der SVG (STE vegetative growth)-Weg (Lee & Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009) und der CWI (Zellwand-Integrität)-Weg (Philip & Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004).

Ste11 ist eine MAP (mitogen activated protein)-KKK, die an der Paarung und invasivem Wachstum bei hoch osmolaren Bedingungen beteiligt ist. In einer Suche nach synthetisch letalen Mutationen, die einen synthetisch letalen Phänotyp mit einer *ste11*-Mutation ergeben, wurde die *och1*-Mutation identifiziert (Lee & Elion, 1999). Och1 ist eine  $\alpha$ -1,6-Mannosyltransferase, die den *N*-Glykosylkern im Golgi modifiziert.

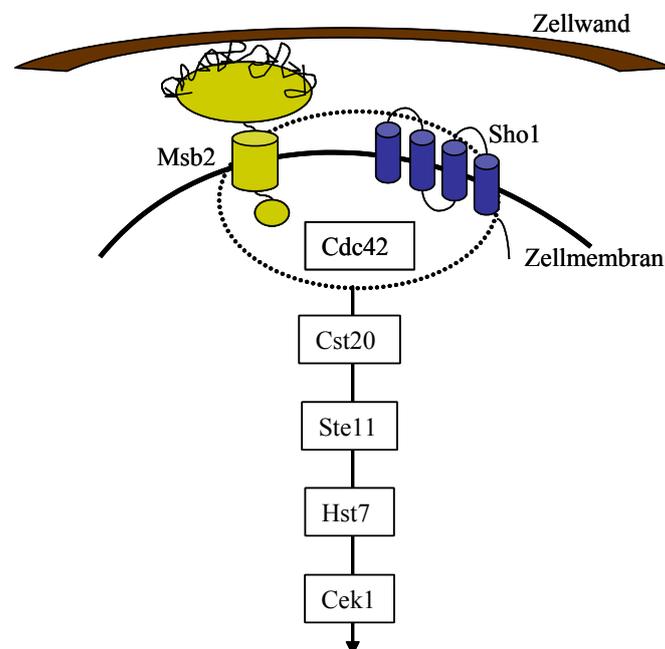
---

Die *och1*-Mutante zeigt nicht nur mehrere Zellwanddefekte, die durch osmotische Stabilisierung gerettet werden können, sondern auch Zelltrennungsdefekte, was andeutet, dass auch das vegetative Wachstum betroffen wird (Lee & Elion, 1999). Weitere Analysen von Signalweg-Komponenten ergaben, dass Defekte von *Ste20*, *Ste7*, *Kss1* und *Ste12* in dem genetischen Hintergrund der *och1*-Mutante nicht lebensfähig waren bzw. langsamer wuchsen und daher wurde ein neuer Signal-Weg, der SVG-Weg, als Antwortweg für die defekte *N*-Glykosylierung vorgeschlagen. Cullen *et al.* (2000) erweiterten die Analyse in dieser Richtung und beobachteten, dass der SVG-Weg nicht nur in der *och1*-Mutante, sondern auch in anderen Glykosylierungsmutanten (*pgi1*, *pmi40*, *dpm1*, *alg1*, *mnn10* und *spt14*) und nach der Behandlung mit Tunicamycin (ein Inhibitor der *N*-Glykosylierung) aktiviert wurde. Sie konnten auch zeigen, dass der Sho1-Osmosensor in Abhängigkeit der äußeren Osmolarität den Weg anschaltete. Zielgene dieses Weges sind *FKS2* und *CHS1*, die als Glukan- bzw. Chitin-Synthase an der Zellwandbiogenese teilnehmen.

Kürzlich wurde beschrieben, dass die Kss1 MAP-Kinase von *S. cerevisiae* aktiviert wird, wenn die Pmt4-spezifische *O*-Mannosylierung und die *N*-Glykosylierung von Msb2 defekt sind (Yang *et al.*, 2009). Msb2 ist ein Mucin, dessen extrazelluläre Domäne hoch glykosyliert ist, und dessen zytosolische Domäne die RAS/RHO GTPase reguliert (Vadaie *et al.*, 2008). Bei *C. albicans* zeigt Msb2 die gleiche Struktur wie bei *S. cerevisiae*. Die *C. albicans msb2*-Mutante ist sensitiv gegenüber Zellwanddestabilisierenden Substanzen (Congo rot, Caspofungin, Zymolyase, Tunicamycin) und zeigt Defekte in dem invasiven Wachstum auf Festmedium (Román *et al.*, 2009). Sho1 wird für die Aktivierung von Cek1, einer MAP Kinase (*C. albicans* homologes Protein zu Kss1 von *S. cerevisiae*) unter exponentiellem Zellwachstum und Zellwandänderung benötigt. Defekte in der Zellwand der *sho1*-Mutante, eine höhere Sensitivität gegen Congo rot, Calcofluor und die Bildung von Aggregaten wurden ebenfalls nachgewiesen (Román *et al.*, 2005). Obwohl keine physische Interaktion festgestellt wurde, wird vermutet, dass Msb2, Sho1 und Cdc42 interagieren, um den Cek1-Weg anzuschalten (Abb. 5) (Román *et al.*, 2009). Cek1p begeht somit in dem exponentiellen Wachstum, filamentösen Wachstum und der Zellwandbiogenese Teil (Csank *et al.*, 1998; Eisman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Li *et al.* (2009) berichteten, dass sich in der *cek1*-Mutante das Molekulargewicht und die Verteilung des Zellwandmannans ändert. Wenn die *N*-

Glykosylierung inhibiert wird, entstehen Zellwanddefekte, welche durch Msb2 detektiert und zu Cek1 weitergeleitet werden (Román *et al.*, 2009).

Der CWI-Weg ist bei *S. cerevisiae* der Hauptweg der Regulation der Zellwandbildung. Er besteht aus Oberflächen-Sensoren der Wsc-Familie und Mid2, die das Rho1-Protein aktivieren, welches die Pkc1-Kaskade aktiviert. Der MAP Kinase-Kern des Pkc-Weges besteht aus den Bck1/Slk1, Mkk1/Mkk2 und Mpk1/Slk2 Proteinen. Als Folge werden die  $\beta$ -Glukan-Synthese und andere Zellwandkomponenten, das Aktin-Cytoskeleton und die Sekretion an der Wachstumszone reguliert (Levin, 2005). Lommel *et al.* (2004) beschrieben, dass die Plasmamembran-Sensoren der Wsc-Familie und Mid2 bei Pmt1, Pmt2 und Pmt4 modifiziert werden. Die Überexpression von *PMT1* konnte die Glykosylierungsdefekte von Wsc1 aber nicht von Mid2 in einer *pmt2 pmt4*-Mutante supprimieren (Lommel *et al.*, 2004). Auch die Überproduktion der Kinasen der Pkc1-Kaskade konnte den Phänotyp der *pmt2 pmt4*-Mutante aufheben. Eine defekte *O*-Mannosylierung der Wsc1-, Wsc2- und Mid2-Proteine führte zu defekter Proteinprozessierung, so dass vermutet wurde, dass *O*-Mannosylreste die Proteinfaltung beeinflussen und infolgedessen die Interaktion der Sensoren mit der Zellwand begünstigt wird (Philip & Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004). In *C. albicans* wurden bisher keine Wsc- oder Mid2-Homologe identifiziert (Prill, 2004).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Cek1-Weges in *C. albicans*. Siehe Text.

**Fig. 5:** esquema de la ruta de señalización de la MAP quinasa Cek1. Véase el texto.



---

## 2 Zielsetzung

Die Familie der *PMT*-Gene kodiert für fünf Isoformen der Protein-O-Mannosyltransferasen, die wichtig für das Wachstum, die Morphogenese und die Virulenz von *C. albicans* sind. Die Deletion jeder Pmt-Isoform verursacht einen unterschiedlichen Phänotyp, der durch die Überproduktion der anderen Isoformen nicht komplementiert werden kann. Ebenso zeigte die Transkriptomanalyse der *pmt*-Mutanten, dass die einzelne Deletionen Einfluss auf verschiedene Gengruppen ausüben.

Um die Regulation der *PMT*-Gene genauer zu charakterisieren, war das Ziel dieser Arbeit:

- 1.-Die Kartierung und Quantifizierung der Transkripte der fünf *PMT*-Gene im *C. albicans* Wildtyp-Stamm und in den *pmt*-Mutanten.
- 2.-Die Bestimmung der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene unter Bedingungen, die einen Phänotyp in den *pmt*-Mutanten verursachen, z.B. bei Zellwandstress oder bei defekter Glykosylierung.
- 3.-Eine Feinanalyse der Promotoren von *PMT*-Genen.
- 4.-Die Analyse der Aktivierung von Signalwegen bei defekter O-Mannosylierung.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Hefeextrakt, Trypton, Pepton (DIFCO Laboratories); Glukose (Caesar & Lorentz GmbH); Amonium Sulfate (ACROS Organics); Maleinsäure (Merk); Natrium Acetat (Merk); TriSodium Citrat (AnalaR NORMAPUR); SDS (SERVA); N-Lauroyl-Sarcosine Sodium Salt (SERVA); Blocking Reagent (Roche); Agarose (Gibco BRL); Natrium Hydroxide (AnalaR NORMAPUR); Natrium Chloride (J.T. Backer); Kalium Chloride (ACROS Organics); Glycerin (Roth); PEG 3350 (Sigma-Aldrich); Lithium Acetate (Sigma); Congo Rot (Sigma); Tunicamycin (Sigma); Calcofluor White (Sigma); Ciclosporin A (Sigma); Hygromycin B (CalbBiochem); DMSO (Roth); Propan-2-ol (AnalaR NORMAPUR); EDTA (AppliChem); Deoxyribonucleic acid from Herring Sperm (Sigma); DMF (Fisher Scientific); Horse Serum (Sigma); Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad); T4 DNA Ligase (Fermentas); Amersham Hybond<sup>TM</sup>-N (GE Healthcare); Klenow Enzyme (Roche); Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments (Roche); Expand High Fidelity PCR System (Roche); dNTP Set, 100 mM Solutions (Fermentas); *Taq* DNA Polymerase (Fermentas);  $\lambda$  DNA (Fermentas); *Renilla* Luciferase Assay System (Promega); PfuTurbo<sup>®</sup> DNA Polymerase (Stratagene); DEPC (Sigma); Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen); Turbo DNA-free<sup>TM</sup> (Ambion); RNA Clean-up Kit-5<sup>TM</sup> (Zymo Research); RETROscript<sup>®</sup> (Ambion); Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Super-Mix-UDG (Invitrogen); AffinityScript<sup>TM</sup> QPCR cDNA Synthesis kit (Stratagene); Brilliant<sup>®</sup> II SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix; FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE kit (Ambion); Oligo(dT) (Ambion); Qiagen PCR Purification Kit (Quiagen); Qiagen Gel Extraction Kit (Quiagen); pMOS*Blue* Blunt-ended PCR cloning Kit (GE Healthcare); pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega); Restriktionsenzyme (NE Biolabs, Roche, NBI Fermetas).

### 3.2 In dieser Arbeit verwendete Geräte und Maschinen

Mikro-Dismembrator S (Braun Biotech International); Biofuge fresco (Heraeus); Rotina38R Zentrifuge Hettich; Zentrifuge Sigma 3E-1; Novaspec<sup>®</sup>II (Pharmacia Biotech); Thermomixer Comfort (Eppendorf); Mx3000P (Stratagene); Fluoroskan Ascent FL (Labsystems); Axioskop 40 (Zeiss); INVIVO<sub>2</sub> 200 (Ruskin); Absorbance Microplate Reader Elx800<sup>TM</sup> (BioTek); GLF-1083 Schüttelwasserbad; NanoDrop 2000 (Thermo Scientific); Gene-Pulser (BioRad); Thermocycler (Biometra); VX 2E (Janke & Kukul); LVB 2016 VacuGene (Pharmacia).

### 3.3 In dieser Arbeit verwendete Stämme

#### 3.3.1 *Escherichia coli* Stamm

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$ F'	F'[[ $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15] $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>U169 recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> $\Gamma_K^-$ $m_K^+$ <i>supE44 thi-1 gyrA</i>	(Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

#### 3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
L40coat	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52 leu2-3, 112 his3-200 trp1-1 ade2 LYS2:: (lexA op)-</i> <i>HIS3 LexA-MS2 coat (TRP1)</i>	SenGupta <i>et al.</i> , 1996
R40coat	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52 leu2-3, 112 his3-200 trp1-1 ade2 LYS2:: (lexA op)-</i> <i>HIS3 LexA-MS2 coat (TRP1)</i>	SenGupta <i>et al.</i> , 1996

#### 3.3.3 *Yarrowia lipolytica* Stamm

Stamm	Genotyp	Quelle
SA-1	Wildtyp, <i>MATB</i>	Torres-Guzmán & Domínguez, 1997

#### 3.3.4 *Candida albicans* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
SC5314	WT	Fonzi & Irwin, 1993
CAI4	<i>ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434</i>	Fonzi & Irwin, 1993
CAF2-1	<i>ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Fonzi & Irwin, 1993
BWP17	<i>ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434 his1<math>\Delta</math>::hisG/his1<math>\Delta</math>::hisG</i> <i>arg4<math>\Delta</math>::hisG/arg4<math>\Delta</math>::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
SPCa2	<i>pmt1<math>\Delta</math>::hisG/pmt1<math>\Delta</math>::hisG ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa4	<i>pmt2<math>\Delta</math>::hisG/PMT2 ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa6	<i>pmt4<math>\Delta</math>::hisG/pmt4<math>\Delta</math>::hisG ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa10	<i>pmt5<math>\Delta</math>::hisG/pmt5<math>\Delta</math>::hisG ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
SPCa8	<i>pmt6<math>\Delta</math>::hisG/pmt6<math>\Delta</math>::hisG ura3<math>\Delta</math>::<math>\lambda</math>imm434/URA3</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
CAP1-3121	Wie CAI4, aber <i>pmt1<math>\Delta</math>::hisG/pmt1<math>\Delta</math>::hisG</i>	Timpel <i>et al.</i> , 1998
CAP4-2164	Wie CAI4, aber <i>pmt4<math>\Delta</math>::hisG/pmt4<math>\Delta</math>::hisG</i>	Prill <i>et al.</i> , 2005
HLC52	Wie CAI4, aber <i>efg1<math>\Delta</math>::hisG/efg1<math>\Delta</math>::hisG-URA3-hisG</i>	Lo <i>et al.</i> , 1997
IIHB6	Wie CAI4, aber <i>tpk1<math>\Delta</math>::hisG/tpk1<math>\Delta</math>::hisG-URA3-hisG</i>	Bockmühl <i>et al.</i> , 2001
TPO7.4	Wie CAI4, aber <i>tpk2<math>\Delta</math>::hisG/tpk2<math>\Delta</math>::hisG-URA3-hisG</i>	Sonneborn <i>et al.</i> , 2000

CNC13	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG hog1Δ::hisG/hog1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	San José <i>et al.</i> , 1996
CK43B-16	Wie CAI4, aber <i>cek1Δ::hisG/cek1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Csank <i>et al.</i> , 1998
CM1613	Wie CAI4, aber <i>mkc1Δ::hisG/mkc1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Navarro-García <i>et al.</i> , 1995
N2	Wie CAI4, aber <i>skn7Δ::hisG/skn7Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Singh <i>et al.</i> , 2004
NGY357	Wie CAI4, aber <i>och1Δ::hisG/och1Δ::hisG RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	Bates <i>et al.</i> , 2006
DSY2091	Wie CAF4-2, aber <i>cnalΔ::hisG/cnalΔ::hisG-URA3-hisG</i>	Sanglard <i>et al.</i> , 2003
DSY2115	Wie CAF4-2, aber <i>cnalΔ::hisG/cnalΔ::hisG LEU2::CNA1::URA3</i>	Sanglard <i>et al.</i> , 2003
DSY2195	Wie CAF4-2, aber <i>crz1Δ::hisG/crz1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Karababa <i>et al.</i> , 2006
MKY360	Wie CAI4, aber <i>crz1Δ::hisG/crz1Δ::hisG crz2Δ::hisG/crz2Δ::hisG- URA3-hisG</i>	Karababa <i>et al.</i> , 2006
BAB3	Wie CAI4, aber <i>gda1Δ::hisG/gda1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Herrero <i>et al.</i> , 2002
NAC4	Wie CAI4, aber <i>alg5Δ::hisG/alg5Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Martín & Domínguez, pers. Mitteilung
CRM695	Wie CAI4, aber <i>chs7Δ::hisG/chs7Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Sanz <i>et al.</i> , 2005
CRM693	Wie CAI4, aber <i>chs7Δ::hisG/chs7Δ::hisG</i>	Sanz <i>et al.</i> , 2005
NGY24	Wie CAI4, aber <i>mnt1Δ::hisG/mnt1Δ::hisG</i>	Buurman <i>et al.</i> , 1998
MK106	Wie SC5314, aber <i>ace2::FRT/ace2::FRT</i>	Kelly <i>et al.</i> , 2004
CAMM- 292-4	Wie CAI4, aber <i>cbk1Δ::hisG/cbk1Δ::hisG-URA3-hisG</i>	McNemar & Fonzi, 2002
FCCa30	<i>msb2::hisG/msb2::hisG ura3Δ::λimm434/URA3</i>	F. Cottier, 2007
REP3	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG</i>	Román <i>et al.</i> , 2005
REP21	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434 his1Δ::hisG/his1Δ::hisG sho1::hisG/sho1::hisG-URA3-hisG msb2::FRT/msb2::FRT</i>	Román <i>et al.</i> , 2009

In dieser Arbeit hergestellte *C. albicans* Transformanten:

Transformanten vom *PMT1*-Promotor:

Name	Genotyp	Quelle
PdCP1.W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.W2	Wie PdCP1.W1	Diese Arbeit
PdCP1.W3	Wie PdCP1.W1	Diese Arbeit
PdCP1.W4	Wie PdCP1.W1	Diese Arbeit
PdCP1.Del1W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1pDel1-RLUC-URA3</i> (pPdC42/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit

PdCP1.Del1W3	Wie PdCP1.Del1W1	Diese Arbeit
PdCP1.Del1W4	Wie PdCP1.Del1W1	Diese Arbeit
PdCP1.2Del2W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1p2Del2-RLUC-URA3</i> (pPdC48/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.2Del2W2	Wie PdCP1.2Del2W1	Diese Arbeit
PdCP1.2Del2W3	Wie PdCP1.2Del2W1	Diese Arbeit
PdCP1.3Del2W4	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1p3Del2-RLUC-URA3</i> (pPdC46/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.3Del2W5	Wie PdCP1.3Del2W4	Diese Arbeit
PdCP1.3Del2W6	Wie PdCP1.3Del2W4	Diese Arbeit
PdCP1.Del3W4	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1pDel3-RLUC-URA3</i> (pPdC44/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.Del3W5	Wie PdCP1.Del3W4	Diese Arbeit
PdCP1.Del3W6	Wie PdCP1.Del3W4	Diese Arbeit
PdCP1.2Del4W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1p2Del4-RLUC-URA3</i> (pPdC47/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.2Del4W2	Wie PdCP1.2Del4W1	Diese Arbeit
PdCP1.2Del4W4	Wie PdCP1.2Del4W1	Diese Arbeit
PdCP1.3Del4W4	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1p3Del4-RLUC-URA3</i> (pPdC49/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.3Del4W5	Wie PdCP1.3Del4W4	Diese Arbeit
PdCP1.3Del4W6	Wie PdCP1.3Del4W4	Diese Arbeit
PdCP1.Del5W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT1pDel5-RLUC-URA3</i> (pPdC45/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.Del5W2	Wie PdCP1.Del5W1	Diese Arbeit
PdCP1.Del5W3	Wie PdCP1.Del5W1	Diese Arbeit
PdCC1.W2	Wie CAP1-3121, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCC1.W3	Wie PdCC1.W2	Diese Arbeit
PdCC1.W4	Wie PdCC1.W2	Diese Arbeit
PdCC1.W5	Wie PdCC1.W2	Diese Arbeit
PdCC4.W1	Wie CAP4-2164, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCC4.W2	Wie PdCC4.W1	Diese Arbeit
PdCC4.W3	Wie PdCC4.W1	Diese Arbeit
PdCNAC.W4	Wie NAC4, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/ <i>Bst11071</i> integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCNAC.W5	Wie PdCNAC.W4	Diese Arbeit
PdCNAC.W6	Wie PdCNAC.W4	Diese Arbeit

PdCCRM.W1	Wie CRM693, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCCRM.W2	Wie PdCCRM.W1	Diese Arbeit
PdCCRM.W4	Wie PdCCRM.W1	Diese Arbeit
PdCMNT.W1	Wie NGY24, aber <i>RPS10-PMT1p-RLUC-URA3</i> (pPdC1/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCMNT.W2	Wie PdCMNT.W1	Diese Arbeit
PdCMNT.W3	Wie PdCMNT.W1	Diese Arbeit
PdCP1.L5	Wie CAI4, aber <i>PMT1p-lacZ-URA3</i> (pPdC38/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.L6	Wie PdCP1.L5	Diese Arbeit
PdCP1.L7	Wie PdCP1.L5	Diese Arbeit
PdCP1.L8	Wie PdCP1.L5	Diese Arbeit
PdCP1.38Δ1	Wie CAI4, aber $\Delta$ <i>PMT1p-lacZ-URA3</i> (pPdC55/Bst11071 integriert in <i>PMT1</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP1.38Δ2	Wie PdCP1.38Δ1	Diese Arbeit

#### Transformanten vom *PMT2* Promotor:

Name	Beschreibung	Quelle
PdCP2.1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC17/Agel integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.2	Wie PdCP2.1	Diese Arbeit
PdCP2.7991	Wie CAI4, aber <i>RPS10-799PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC18/Agel integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.7992	wie PdCP2.7991	Diese Arbeit
PdCP2.7999	wie PdCP2.7991	Diese Arbeit
PdCP2.6691	Wie CAI4, aber <i>RPS10-669PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC40/Agel integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.5391	Wie CAI4, aber <i>RPS10-539PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC19/Agel integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.5393	Wie PdCP2.5391	Diese Arbeit
PdCP2.5397	Wie PdCP2.5391	Diese Arbeit
PdCP2.5398	Wie PdCP2.5391	Diese Arbeit
PdCP2.3333	Wie CAI4, aber <i>RPS10-333PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC20/Agel integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.3335	Wie PdCP2.3333	Diese Arbeit
PdCP2.3336	Wie PdCP2.3333	Diese Arbeit

PdCP2.140	Wie CAI4, aber <i>RPS10-140PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC21/AgeI integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.539W1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-539PMT2p-RLUC-URA3</i> (pPdC19/SwaI integriert in <i>PMT2</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.539W3	Wie PdCP2.539W1	Diese Arbeit
PdCP2.539W4	Wie PdCP2.539W1	Diese Arbeit
PdCP2.Del1W10	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT2pDel1-RLUC-URA3</i> (pPdC50/SwaI integriert in <i>PMT2</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP2.Del1W11	Wie PdCP2.Del1W10	Diese Arbeit
PdCP2.Del1W12	Wie PdCP2.Del1W10	Diese Arbeit

Transformanten vom *PMT4*-Promotor:

Name	Beschreibung	Quelle
PdCP4.1	Wie CAI4, aber <i>RPS10-PMT4p-RLUC-URA3</i> (pPdC11/Bg/II integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP4.4	Wie PdCP4.1	Diese Arbeit
PdCP4.12	Wie PdCP4.1	Diese Arbeit
PdCP4.16	Wie PdCP4.1	Diese Arbeit
PdCP4.5002	Wie CAI4, aber <i>RPS10-500PMT4p-RLUC-URA3</i> (pPdC13/Bg/II integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP4.5004	Wie PdCP4.5002	Diese Arbeit
PdCP4.5006	Wie PdCP4.5002	Diese Arbeit
PdCP4.3708	Wie CAI4, aber <i>RPS10-370PMT4p-RLUC-URA3</i> (pPdC14/Bg/II integriert in <i>RPS10</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP4.3709	Wie PdCP4.3708	Diese Arbeit
PdCP4.37010	Wie PdCP4.3708	Diese Arbeit
PdCP4.370L2	Wie CAI4, aber <i>370PMT4p-lacZ-URA3</i> (pPdC30/PshAI integriert in <i>PMT4</i> -Locus)	Diese Arbeit
PdCP4.370L3	Wie PdCP4.370L2	Diese Arbeit

In dieser Arbeit hergestellte *C. albicans* Mutanten:

Name	Genotyp	Quelle
PDCCa01	Wie CAI4, aber <i>ORF19.6813/ orf19.6813Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Diese Arbeit
PDCCa02	Wie CAI4, aber <i>ORF19.6813/ orf19.6813Δ::hisG-URA3-hisG</i>	Diese Arbeit
PDCCa03	Wie CAI4, aber <i>ORF19.6813/ orf19.6813Δ::hisG</i>	Diese Arbeit
PDCCa04	Wie CAI4, aber <i>orf19.6813Δ::hisG-URA3-hisG/ orf19.6813Δ::hisG</i>	Diese Arbeit
PDCCa05	Wie CAI4, aber <i>orf19.6813Δ::hisG/ orf19.6813Δ::hisG</i>	Diese Arbeit
PDCCa06	Wie CAI4, aber <i>orf19.6813Δ::hisG/ orf19.6813Δ::hisG</i>	Diese Arbeit

### 3.3.5 Medium zur Anzucht von *E. coli*

LB: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

Festes Medium wurde durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt.

### 3.3.6 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose

YPGal: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Galaktose

SD: 0,67 % YNB, 2 % Glukose

YP: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton

YP + 10% Serum: 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 10 % Pferde-Serum

CAA-Medium: 0,67 % YNB, 2 % Casaminosäure

FOA-Medium: 0,17 % YNB, 2 % Glukose, 0,1 % Prolin, 0,001 % Uridin, 0,002 % 5-Fluoro-Orotic Acid (FOA)

Lee-Medium: 0,5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei), 0,5 % NaCl, 1,25 % Glukose, 0,05 % Alanin, 0,13 % Leucin, 0,1 % Lysin, 0,01 % Methionin, 0,00714 % Ornithin, 0,05 % Phenylalanin, 0,05 % Prolin, 0,05 % Threonin, 0,0001 % Biotin. Alle Komponenten, außer Biotin, wurden gemischt und autoklaviert. Biotin wurde steril filtriert und nach der Autoklavierung zugegeben (Lee *et al.*, 1975).

Spider-Medium: 1 % Nutrient Broth, 1 % Mannit, 0,2 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Plus 1,35 % Agar für festes Medium. Jede Komponente wurde einzeln autoklaviert und nachher gemischt.

Für festes Medium wurde Agar mit Nutrient Broth autoklaviert.

Festes Medium wurde durch Zugabe von 2 % Agar hergestellt.

### 3.3.7 Allgemeine Wachstumsbedingungen

Falls anders vermerkt, wurden die folgenden Wachstumsbedingungen benutzt:

- *E. coli* wurde bei 37 °C inkubiert. Ampicillin-Resistenz wurde durch Zugabe von 0,5 mg/ml Ampicillin selektiert.
- Die Hefestämme wurden bei 30 °C auf festem Medium inkubiert.
- Die flüssigen Hefe Vorkulturen wurden bei 30 °C und 120 Upm über Nacht inkubiert.
- Die flüssigen Hefe Hauptkulturen wurden bei 30 °C und 120 Upm während 4 Stunden oder bis zur gewünschten OD<sub>600</sub> inkubiert.
- Hypheninduktion von *C. albicans* in flüssigem Medium: Zellen aus einer 5 ml Übernachtkultur bei 30 °C in YPD-Medium wurden geerntet (5 min, 4000 Upm, RT), mit Wasser gewaschen und in 5 ml YP-Medium resuspendiert. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt und 50 ml der Hauptkultur (YP + 10 % Serum) wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Die Kultur wurde 2 Stunden bei 37 °C und 110 Upm inkubiert.
- Glycerol-Stock: 800 µl einer Übernachtkultur in selektivem Medium wurden zu 800 µl 50 % Glycerol zugegeben, gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.8 Wachstumsanalysen auf Festmedium

#### 3.3.8.1 Sensibilitätstest

Die Stämmen wurden bei 30 °C über Nacht wachsen gelassen. Die OD<sub>600</sub> der Kultur wurde bestimmt und 400 µl wurden zu einer OD<sub>600</sub> = 2 eingestellt. Es folgte eine Verdünnungsreihe 1/10 von fünf Schritten. 5 µl jeder Verdünnung wurden auf die Platten aufgetragen. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden fotografiert. Die getesteten Substanzen und ihre Konzentrationen werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Substanz	Konzentration	Stammlösung	Lösungsmittel
OGT 2371 (Pmt1-Inhibitor)	4 µM	10 mM	DMSO
Congo Rot	125 µg/ml		dH <sub>2</sub> O
Tunicamycin	2 µg/ml	10 mg/ml	DMSO
Cyclosporin A	4 µg/ml; 16 µg/ml	5 mg/ml	Abs. Ethanol
Hygromycin B	250 µg/ml; 200 µg/ml	50 mg/ml	
Calcofluor	10 µg/ml	25 mg/ml	dH <sub>2</sub> O
Clotrimazol	2 µg/ml	50 mg/ml	dH <sub>2</sub> O

### 3.3.8.2 Viabilitätstest

5 ml Kultur wurden bei  $OD_{600} = 0,1$  überimpft. Nach 12, 24 und 48 Stunden wurden 100  $\mu$ l entnommen,  $1/10$  bis  $1/10^4$  verdünnt und 100  $\mu$ l davon auf eine YPD Platte ausplattiert. Die Platten wurden 24 h bei 30 °C inkubiert. Zuletzt wurden die CFU gezählt. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

## 3.4 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Schnittstellen werden unterstrichen; eine Hälfte von den Oligonukleotiden für die Mutagenese-PCR wird kursiv geschrieben.

qPCR Oligonukleotide der <i>PMT</i> -Gene für die Bestimmung des RTS in den <i>pmt</i> -Mutanten und bei 25, 30 und 37 °C (Subanović, 2005)	
ACT1-for (RT)	5'-CAACTGGGACGATATGGAAAAA-3'
ACT1-rev (RT)	5'-TTCGGTCAACAAAACCTGGATGT-3'
pmt1-for (RT)	5'-GGTGGGTTTGCCAGAAAATA-3'
pmt1-rev (RT)	5'-GCTCCAACAGCTCCAAAAAG-3'
pmt2-for (RT)	5'-TTACCTCAATGGGGGTTTCAG-3'
pmt2-rev (RT)	5'-GGAGCTGGTGGTAAACTGC-3'
pmt4-for (RT)	5'-GGCTTCACCTTTGAAACCAA-3'
pmt4-rev (RT)	5'-TTTGAACCTGGAACATGCAA-3'
pmt5- for (RT)	5'-TTGGTTTTACGTGTGGTTGC-3'
pmt5-rev (RT)	5'-AGGTCCTTCGTTTGAAGGT-3'
pmt6-for (RT)	5'-CGGTGATGTTGAAAGCAATG-3'
pmt6-rev (RT)	5'-TGTATCTCCAGCGGGTCTTC-3'

qPCR Oligonukleotide der <i>PMT</i> -Gene für den Rest der Bestimmungen (Subanović, 2005)	
ACT1(RT)-f	5'-TTGGATTCTGGTGATGGTGT-3'
ACT1(RT)-r	5'-TGGACAAATGGTTGGTCAAG-3'
PMT1(RT)-f	5'-GCTGCTGAACCTGTTGAAGA-3'
PMT1(RT)-r	5'-CATCAGCAACTTGTGGGTCT-3'
PMT2(RT)-f	5'-CCATGATGGCTACTAACAATG-3'
PMT2(RT)-r	5'-CCCATCCACACATTCTAATACC-3'
pmt4-for (RT)	5'-GGCTTCACCTTTGAAACCAA-3'
pmt4-rev (RT)	5'-TTTGAACCTGGAACATGCAA-3'
PMT5(RT)-f	5'-CCCTTATGCATCTCCTCCAT-3'
PMT5(RT)-r	5'-CACCAAATATGGCCAGGAAT-3'
PMT6(RT)-f	5'-ATTTGTTGGTTGTTGGCATC-3'
PMT6(RT)-r	5'-TGATTGACTGTTTGCTGGGT-3'

5'RACE PMT-Oligonukleotide ( <i>C. albicans</i> )	
PMT1 outer	5'-CAATGGCTCCAACAGCTCCA-3'
PMT1 inner	5'-AACCCACCAAAATGGACTTC-3'
PMT2 outer	5'-CCAGCCAAATAACCAGATAAACCA-3'
PMT2 inner	5'-CGTGTTCGTAAATAATAGGA-3'
PMT4 outer	5'-TGTAAGAGTCACCAATGGCTT-3'
PMT4 inner	5'-CAACTTTATTTGGAGTGCCTA-3'
PMT5 outer	5'-CCAATGCCACAAATACCACTGA-3'
PMT5 inner	5'-AGTTTCCCTAAAGGTGGATGA-3'
PMT6 outer	5'-GCGAGCCAAACTTCCCAAAT-3'
PMT6 inner	5'-TATCGTCACGTTACCCAGGGAGT-3'

5'RACE Oligonukleotide für <i>Y. lipolytica</i> PMT-Homologe	
YALI0E15081g (NCBI RefSeq XM_503966.1)	
3966 outer rev	5'-GCAAAACCACCAAAGTGG-3'
3966 inner rev	5'-CACGAAGATGAGCACTCG-3'
YALI0C23364g (NCBI RefSeq XM_502178.1)	
2178 outer rev	5'-AGAGCCAGGGCGGTGAAG-3'
2178 inner rev	5'-TCGATGTGGTGGCCTTTC-3'
YALI0E05929g (NCBI RefSeq XM_503607.1)	
3607 outer rev	5'-GTTTCGCTGGAGGTAGTAG-3'
3607 inner rev	5'-TCAGAAACGCCAGCAGAG-3'
YALI0D10549g (NCBI RefSeq XM_502660.1)	
2660 outer rev	5'-TCAATGTCGTTGGCGATGAC-3'
2660 inner rev	5'-AGTAGTGGCCCAGCAGCAC-3'

PMT1-Promotorbereich Oligonukleotide	
<i>Xma</i> I-PMT1pfor	5'-AATACCCGGGATAAGCCTTGTCTTGGTCAT-3'
2.PMT1prev <i>Afl</i> III	5'-TTATCTTAAGATTGAATGGGAAACTAAAAT-3'
-165 <i>Afl</i> IIIPMT1rev	5'-TTATCTTAAGGGTGGTTGTTGTTGTTGT-3'
2.-194Pmt1rec <i>Afl</i> III	5'-TTATCTTAAGAAAAATGAAAAATCTTGAAAAAG-3'
PMT1Del1 for	5'-CAAAAGTGTGAGAGCAAGATTCTTTTCAAG-3'
PMT1Del1 rev	5'-CTTGAAAAAGAATCTTGCTCTCACACTTTTG-3'
2-PMT1Del2 for	5'-CAAACACGTAAAGCGGAAGAGAGAGTGGGAAACTAAAAG
2-PMT1Del2 rev	5'-CTTTTAGTTTCCCACTCTCTCTCCGCTTTACGTGTTTG-3
3-PMT1Del2 for	5'-GTAATCTACTATGGAAGAAAAAAAAAAGAAGACAC-3'
3-PMT1Del2 rev	5'-GTGTCTTCTTTTTTTTTTCTTCCATAGTAGATTAC-3'
PMT1Del3 for	5'-CAGATAAATCTCAGAGCACATATTCTATTAGATC-3'

PMT1Del3 rev	5'-GATCTAATAGAATATGTGCTCTGAGATTTATCTG-3'
2-PMT1Del4 for	5'-GGTTATACCCATCAATCCTCATAATTATTCAAC-3'
2-PMT1Del4 rev	5'-GTTGAATAATTATGAGGATTGATGGGTATAACC-3'
3-PMT1Del4 for	5'-GATAAAGTTACAACCTTTCATATAAAAACAAGCCTTAC-3'
3-PMT1Del4 rev	5'-GTAAGGCTTGTTTTATATGAAAGTTGTAACCTTATC-3'
PMT1Del5 for	5'-CGAATATTTTTTCAGATTTTGCTTGAGTTTAGTTAAG-3'
PMT1Del5 rev	5'-CTTAAACTAAACTCAAGCAAAATCTGAAAAATATTCG-3'
<i>KpnI</i> PMT1 for	5'-CGGGGGTACCATAAGCCTTGTCTTGGTCATAG-3'
<i>PstI</i> Pmt1 rev	5'-TATTCTGCAGATTGAATGGGAAACTAAAAT-3'
PMT1-3Del4Δ678-669 for	5'-GTTTTATATGGATTGATGGGTATTTAAATATAAATGGACAACAGGGTC-3'
PMT1-3Del4Δ678-669 rev	5'-GACCCTGTTGTCCATTTATATTTAAATACCCATCAATCCATATAAAAC-3'

#### PMT2-Promotorbereich Oligonukleotide

<i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGCTTGTACCAAAGATATCAAC-3'
-799 <i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGATGATGATGATTTCACTTTGG-3'
-669 <i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGCTAATACCCAACCTTGGTGG-3'
-539 <i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGCCAAAATTGTCTAGTGATGG-3'
-333 <i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGGTAGTAAGTGTACGTGGTC-3'
-140 <i>XmaI</i> PMT2for	5'-AATACCCGGGCCACTTTCTACTCTTTGAAC-3'
<i>AflIII</i> -PMT2prev	5'-TTATCTTAAGTATGATTGTTGTCTTTCTTTTG-3'
PMT2 Del1 for	5'-GTTGTTATTGTTGTCCACTTTCTACTC-3'
PMT2 Del1 rev	5'-GAGTAGAAAGTGGGACAACAATAACAAC-3'

#### PMT4-Promotorbereich Oligonukleotide

<i>XmaI</i> PMT4pfor	5'-AATACCCGGGAGTTGATGCTACCGTCTACG-3'
-500 <i>XmaI</i> PMT4pfor	5'-AATACCCGGGAGTTATTTCCCACCACAACC-3'
-370 <i>XmaI</i> PMT4pfor	5'-AATACCCGGGATGCCACTAACACGTTGTC-3'
<i>AflIII</i> PMT4prev	5'-TTATCTTAAGTTTACTAGAATTGACACAAC-3'
-370 <i>KpnI</i> PMT4for	5'-CGGGGGTACCATGCCACTAACACGTTGTC-3'
<i>PstI</i> PMT4rev	5'-AAAAGTGCAGTTTACTAGAATTGACACAAC-3'

#### ACE2-Gen Oligonukleotide

<i>BglII</i> ACE2 for	5'-GGAAGATCTATGCATTGGAAATTTCTGAAC-3'
<i>BglII</i> ACE2 rev	5'-GGAAGATCTCTATTGCAACATTA AAAACTC-3'

<b>ORF19.6813 Oligonukleotide</b>	
ORF19.6813(RT)for	5'-CTTGGTGGATCAATTGGG-3'
ORF19.6813(RT)rev	5'-TTGGTAAATCGTTTTTCGG-3'
<i>Xma</i> I-5'UTR-ORF19.6813for	5'-AATACCCGGGAGTAAAACCAGACTTTGATTTG-3'
TDH3 seq for	5'-GGTTACTCCACCAGAGTTG-3'
hisG rev	5'-AGAACCATTTAACAGACACG-3'

<b>3-Hybrid-Analyse</b>	
<i>Xma</i> IPMT1 3Hrev	5'-TCCCCCGGGATTGAATGGGAAACTAAAAT-3'
<i>Xma</i> I <i>Not</i> I PMT1 3Hfor	5'-TCCCCCGGGGCGGCCGCGTTCAAGATTCTTTTCAAG-3'

### 3.5 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
pES2	<i>RLUC</i> Reporter gen integriert in pCI10	Szafranski E, pers. Mitteilung
pAU36	<i>URA3</i> , <i>lacZ</i> , <i>ACT1</i> , Amp	Uhl & Johnson, 2001
pBI-1	<i>PCK1</i> -Promotor, <i>URA3</i> , <i>LEU2</i> , ARS	Rademacher F, Dissertation 1998
pACTII- DOM34	<i>DOM34</i> wurde in der <i>Bgl</i> III Schnittstelle des pACTII Plasmides kloniert	Lengeler K, pers. Mitteilung
pIII/MS2-1	2 $\mu$ , Amp, <i>URA3</i> , MS2	SenGupta <i>et al.</i> , 1996
pIII/MS2-2	2 $\mu$ , Amp, <i>URA3</i> , MS2	SenGupta <i>et al.</i> , 1996
pAD-IRP	<i>LEU2</i> , <i>GAL4p-IRP</i>	SenGupta <i>et al.</i> , 1996
pIIIA-IRE- MS2	<i>URA3</i> , 5'IRE-MS2 3'	SenGupta <i>et al.</i> , 1996
pPdC1	<i>PMT1</i> -Promotorbereich -1147 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>Xma</i> I/ <i>Afl</i> II)	Diese Arbeit
pPdC2	<i>PMT1</i> -Promotorbereich -1147 bp/-168 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>Xma</i> I/ <i>Afl</i> II)	Diese Arbeit
pPdC3	<i>PMT1</i> -Promotorbereich -1147 bp/-189 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>Xma</i> I/ <i>Afl</i> II)	Diese Arbeit
pPdC11	<i>PMT4</i> -Promotorbereich -1000 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>Xma</i> I/ <i>Afl</i> II)	Diese Arbeit

pPdC13	<i>PMT4</i> -Promotorbereich -500 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC14	<i>PMT4</i> -Promotorbereich -370 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC17	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -1000 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC18	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -799 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC19	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -539 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC20	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -333 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC21	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -140 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC30	<i>PMT4</i> -Promotorbereich -340 bp/-1 bp integriert in pAU36 (Schnittstellen <i>KpnI/PstI</i> )	Diese Arbeit
pPdC32	pIII/MS2-1 + <i>PMT1</i> -Promotorbereich -221 bp/-1 bp; gleiche Richtung wie MS2 (Schnittstelle <i>XmaI</i> )	Diese Arbeit
pPdC33	pIII/MS2-1 + <i>PMT1</i> -Promotorbereich -221 bp/-1 bp; Gegenrichtung zum MS2 (Schnittstelle <i>XmaI</i> )	Diese Arbeit
pPdC34	pIII/MS2-2 + <i>PMT1</i> Promotorbereich -221 bp/-1 bp; Gegenrichtung zum MS2 (Schnittstelle <i>XmaI</i> )	Diese Arbeit
pPdC35	pIII/MS2-2 + <i>PMT1</i> -Promotorbereich -221 bp/-1 bp; gleiche Richtung wie MS2 (Schnittstelle <i>XmaI</i> )	Diese Arbeit
pPdC38	<i>PMT1</i> -Promotorbereich -1147 bp/-1 bp integriert in pAU36 (Schnittstellen <i>KpnI/PstI</i> )	Diese Arbeit
pPdC40	<i>PMT2</i> -Promotorbereich -669 bp/-1 bp integriert in pES2 (Schnittstellen <i>XmaI/AflII</i> )	Diese Arbeit
pPdC42	Wie pPdC1, aber Deletion Del1 (-330/-218 bp)	Hamed S, pers. Mitteilung
pPdC44	Wie pPdC1, aber Deletion Del3 (-594/-481 bp)	Diese Arbeit
pPdC45	Wie pPdC1, aber Deletion Del5 (-809/-713 bp)	Diese Arbeit
pPdC46	Wie pPdC1, aber Deletion 3-Del2 (-481/-410 bp)	Diese Arbeit
pPdC47	Wie pPdC1, aber Deletion 2-Del4 (-657/-594 bp)	Diese Arbeit
pPdC48	Wie pPdC1, aber Deletion 2-Del2 (-410/-330 bp)	Diese Arbeit
pPdC49	Wie pPdC1, aber Deletion 3-Del4 (-713/-657 bp)	Diese Arbeit
pPdC50	Wie pPdC19, aber Deletion Del1 (-229/-139 bp)	Diese Arbeit
pPdC51	pGEM plus 5'UTR- <i>ORF19.6813</i> -3'UTR	Diese Arbeit
pPdC52	pPdC51 plus <i>URA3</i> Kassette ( <i>EcoRV</i> Schnittstelle)	Diese Arbeit

pPdC54	<i>ACE2</i> in pBI-1 integriert ( <i>Bg/II</i> Schnittstelle)	Diese Arbeit
pPdC55	Wie pPdC38, aber Deletion der -678/-699 bp	Diese Arbeit
pPdC2-His	Wie pPdC2, aber <i>URA3</i> -Marker gegen <i>HIS1</i> -Marker getauscht	Hilbig J, pers. Mitteilung
pPdC3-His	Wie pPdC3, aber <i>URA3</i> -Marker gegen <i>HIS1</i> -Marker getauscht	Hilbig J, pers. Mitteilung

### 3.6 In dieser Arbeit verwendete Lösungen

<b>0,5 M EDTA pH 8</b> ddH <sub>2</sub> O pH mit NaOH eingestellt autoklaviert	<b>1 M Tris·HCl pH 7,4</b> ddH <sub>2</sub> O pH mit HCl eingestellt autoklaviert	<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b> ddH <sub>2</sub> O 0,1 % DECP Übernacht bei 37 °C autoklaviert
<b>P1</b> 50 mM Tris·HCl pH 8 10 mM EDTA nach Autoklavierung Zugabe von 100 µg/ml RNase A	<b>P2</b> 200 mM NaOH 1 % SDS nicht autoklaviert	<b>P3</b> 3,0 M KAc pH 5,5 mit AcOH eingestellt autoklaviert
<b>50 % Glycerol (v/v)</b> ddH <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>10 % SDS</b> dH <sub>2</sub> O nicht autoklaviert	<b>3 M NaAc</b> ddH <sub>2</sub> O pH mit AcOH eingestellt autoklaviert
<b>5 M KAc</b> dH <sub>2</sub> O pH mit AcOH eingestellt autoklaviert	<b>LATE</b> 0,1 M LiAc 10 mM Tris·HCl pH 7,5 1 mM EDTA autoklaviert	<b>PLATE</b> 40 % PEG 3350 in LATE (w/v) autoklaviert
<b>SCE</b> 1,2 M Sorbitol 0,1 M Na <sub>3</sub> Citrat·H <sub>2</sub> O 10 mM EDTA pH 7,0 autoklaviert	<b>SCE/DTT/Zymolyase</b> SCE 200 µg/ml Zymolyase (100T) 20 mM DTT	<b>RNase-Lösung</b> 150 mM NaAc pH 5,9 200 µg/ml RNase A 10 mM Tris·HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0

<b>1 M LiAc</b> dH <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>50 % PEG 3350 (w/v)</b> PEG in der Hälfte des dH <sub>2</sub> O übernacht rühren lassen, bis Endvolumen nachfüllen Autoklaviert	<b>Prähybridisierungslösung</b> 5X SSC 1X NRB2 0,02 % SDS 0,1 % N-Lauroyl-Sarcosine
<b>20X SSC</b> 3 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat·H <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>NRW1</b> 2X SSC 0,1 % SDS nicht autoklaviert	<b>NRW2</b> 0,1X SSC 0,1 % SDS nicht autoklaviert
<b>NRB1</b> 100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,6 mit NaOH Plätzchen eingesetzt autoklaviert	<b>10 % NRB2</b> 10 % Blocking Reagent in NRB1 autoklaviert	<b>NRB3</b> 100 mM Tris·HCl pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>0,5 % Bentonit (w/v)</b> in DEPC-H <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>LiCl Puffer</b> 4 M LiCl in DEPC-H <sub>2</sub> O 20 mM Tris·HCl, pH 7,4 10 mM EDTA	<b>70 % Ethanol in DEPC- H<sub>2</sub>O</b>
<b>Z Puffer</b> 60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub>	<b>1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> dH <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>1 M DTT</b> in dH <sub>2</sub> O gelöst bei -20 °C gelagert
<b>RNase A</b> 10 mg/ml ddH <sub>2</sub> O 10 min bei 95 °C gekocht bei -20 °C gelagert	<b>Zymolyase</b> 2,5 mg/ml dH <sub>2</sub> O bei -20 °C gelagert	<b>NBT</b> 50 mg/ml in 70 % DMF
<b>X-Phos</b> 50 mg/ml in 100 % DMF	<b>X-Gal</b> 20 mg/ml in DMSO	<b>4 mg/ml ONPG</b> in Z-Puffer vor dem Gebrauch frisch angesetzt

<b>Blau Marker</b> 50 % Glycerol 1 mM EDTA 0,4 % Bromophenol blue 0,4 % Xylene cyanol EDTA, Bromophenol und Xylene mischen, danach mit dem Glycerol	<b>50X TAE</b> 242 g/l Tris base 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 57,1 ml Glacial AcOH x ml dH <sub>2</sub> O autoklaviert	<b>Phosphate Puffer pH 7,0</b> 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> wurden vorbereitet und zusammengemischt bis dem erwünschten pH erreicht wurde
<b>25 mg/ml Ampicillin</b> in dH <sub>2</sub> O steril filtriert	<b>0,4 % Uridin</b> in dH <sub>2</sub> O steril filtriert	<b>0,2 % FOA (w/v)</b> in dH <sub>2</sub> O erwärmen zu lösen, filtrieren
<b>2 mg/ml Carrier DNA</b> in autoklaviertem dH <sub>2</sub> O zum Rühren lassen, bis es gelöst wird bei -20 °C gelagert	<b>RF1</b> 100 mM RbCl (Stock 0,5 M) 50 mM MnCl <sub>2</sub> (Stock 1 M) 30 mM KAc (Stock 5 M) 10 mM CaCl <sub>2</sub> (Stock 1M) 15 % Glycerin (v/v) pH 5,8 mit AcOH steril filtriert	<b>RF2</b> 10 mM MOPS (Stock 1 M) 10 mM RbCl (Stock 0,5 M) 75 mM CaCl <sub>2</sub> (Stock 1 M) 15 % Glycerin (v/v) pH 6,8 mit NaOH eingestellt steril filtriert

### 3.7 Transformation

#### 3.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

- Elektroporationskompetente Zellen

Ein Liter LB-Medium wurde mit der Übernachtskultur inokuliert und bis OD<sub>600</sub> 0,7-0,8 bei 37 °C inkubiert. Nach einer halben Stunde bei 4 °C, wurden die Zellen 15 min bei 4 °C und 4000 Upm zentrifugiert, und zweimal mit sterilem kaltem destiliertem Wasser gewaschen. Zellen wurden dann in 20 ml 10% Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und in 3 ml 10% Glycerin wieder resuspendiert. 80 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

- Chemisch kompetente Zellen (Hanahan, 1983)

50 ml LB-Medium wurden aus einer Übernachtskultur auf einer  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,4-0,6$  inkubiert. Die Zellen wurden dann 2 Stunden auf Eis gestellt und 10 min bei 4 °C und 7000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml RF1 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 4 ml RF2 aufgenommen. Zuletzt wurde das Pellet weitere 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.7.2 Transformation von *E. coli*

- Elektroporation

40 µl elektrokompente Zellen wurden mit 10-200 ng Plasmid-DNA gemischt und auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit 1 mm Durchmesser. Für die Transformation wurde an der Gene-Pulser-Apparatur (BioRad) eine Kapazität von 25 µF, ein Widerstand von 200 Ω und eine Spannung von 1,3 kV eingestellt. Nach dem Puls wurden 900 µl LB zur Regeneration hinzugefügt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei RT und 3500 Upm abzentrifugiert und auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

- Chemische Transformation

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1-10 ng DNA zugegeben. Nach einem 30 minütigen Schritt auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C während 45 s und eine weitere Inkubation auf Eis während 2 min. 900 µl LB wurde zur Regeneration zugegeben. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei RT und 3500 Upm abzentrifugiert und auf LB-Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.7.3 *S. cerevisiae*-Transformation nach Gietz und Woods (2002)

Aus einer Vorkultur wurden 50 ml Hauptkultur auf eine  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,6 wurden die Zellen geerntet und mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 0,1 M LiAc resuspendiert, pelletiert und in neuen 400 µl 0,1 M LiAc resuspendiert. Es wurden 50 µl Aliquots aufgeteilt und abzentrifugiert. In dieser Reihenfolge wurden 240 µl 50 % PEG 3500, 36 µl 1 M LiAc, 25 µl Carrier-DNA (2 mg/ml) und Plasmid-DNA (0,1-10 µg in 50 µl

destilliertem Wasser) zugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und 30 min bei 30 °C inkubiert. Es folgte ein 30 minütiger Hitzeschock bei 42 °C. Zuletzt wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl Wasser aufgenommen und auf das Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden 3 bis 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **3.7.4 *C. albicans*-Transformation nach einer modifizierten Lithium Acetate Methode (Wilson *et al.*, 1999)**

50 ml YPD-Medium wurden aus einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und während 4-5 Stunden bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Zellen wurden geerntet (5 min, 3500 Upm, RT) und mit LATE-Puffer gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden sie in 500 µl LATE-Puffer resuspendiert. Zu dem Transformationsansatz wurden 25 µl Carrier-DNA (2 mg/ml) und 1-5 µg die zu transformierende DNA zugefügt. Zu dem Kontrollansatz wurden die Carrier DNA und Wasser zugegeben. Zuletzt wurden 100 µl Zellen hinzupipettiert. Die Ansätze wurden 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl PLATE-Puffer wurden die Proben über Nacht bei 30 °C inkubiert. Ein einstündiger Hitzeschock bei 42 °C folgte. Die Zellen wurden geerntet und auf Selektionsmedium ausplattiert.

### **3.8 Präparation, Konstruktion, und Analyse von Nukleinsäuren**

#### **3.8.1 Plasmid-Isolierung**

- Mini-Präparation

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde durch die alkalische Methode (Sambrook *et al.*, 1989) isoliert. Dafür wurden die Zellen aus 2 ml LB + Amp geerntet (3 min bei 13000 Upm) und in 300 µl P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl P2 wurde die Zellmembran lysiert. Anschließend wurden 300 µl P3 zugegeben. KAc bildet einen unlöslichen Niederschlag von SDS/Lipide/Proteinen und neutralisiert die Lösung. Chromosomale-DNA wird in dem Niederschlag aufgegriffen und Plasmid-DNA wegen der pH-Erhöhung renaturiert. Die Lösung wurde 20 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen und mit 700 µl gefällt (20 min, 13000 Upm). Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen (5 min, 13000 Upm), trocken gelassen und in 30 µl Wasser resuspendiert.

- **Midi-Präparation**

Der Prozess erfolgte wie oben beschrieben, obwohl etwas modifiziert. Zellen wurden aus 100 ml Medium geerntet und in 4 ml P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 ml P2 wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere 4 ml von P3 wurden zugegeben und die Proben 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20 min bei 4 °C und 11000 Upm). Der Überstand wurde auf ein Falcon übertragen und 10 ml Isopropanol wurden addiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurde die Lösung 30 min bei 4 °C und 11000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser resuspendiert.

### **3.8.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Es wurde das Qiagen DNA Kit nach Anweisung der Hersteller benutzt.

### **3.8.3 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in der Regel in einem Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) in einem gesamten Volumen von 20 µl. Es wurden 2 Weiss U von T4 DNA Ligase pro Ansatz benutzt. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### **3.8.4 Ligationsfällung**

Nach dem Ligationsschritt wurde eine Fällung durchgeführt. Dafür wurde das Volumen mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt, und 5 Probevolumen von Butanol zugegeben. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13000 Upm während 30 min wurde der Überstand verworfen und die DNA unter Vakuum getrocknet. Zuletzt wurde sie in 10 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.8.5 Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsenzyme wurden nach Anweisung der Hersteller eingesetzt.

### **3.8.6 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans***

*C. albicans* Zellen aus einer Übernachtskultur bei 30 °C wurden bei 125 Upm geerntet. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 2000 Upm und RT wurden die Zellen in 5 ml destilliertem Wasser resuspendiert, und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 500 µl SCE/DTT/Zymolyase-Lösung resuspendiert, und auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen. Die Suspension wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die

erhaltenen Sphäroplasten wurden pelletiert und in 500 µl EDTA pH 8 aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 50 µl 10 % SDS und ein Inkubationsschritt bei 65 °C für 30 min, so wurden die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert. Danach wurden die Proben bei RT leicht zum Abkühlen stehen gelassen und 100 µl KAc wurden zugegeben, um die Proteine zu fällen. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden auf Eis während 90 min gestellt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 Upm und 4 °C während 15 min erfolgte, um die Zellreste und Proteine von der DNA in der wässrigen Phase zu trennen. Das Letztere wurde aufgenommen und die DNA wurde mit 800 µl Ethanol gefällt (15 min, 4 °C, 13000 Upm). Der Überstand wurde verworfen und 400 µl Rnase-Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C während einer Stunde wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die DNA aus der wässrigen Phase wurde über Nacht mit 800 µl Ethanol gefällt. Zuletzt wurde sie zentrifugiert (30 min, 4 °C, 13000 Upm), trocken gelassen und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.8.7 Isolierung gesamter RNA aus *C. albicans*

- Vorbereitung des Zellmaterials

Die Zellen der Hauptkultur wurden bei 4 °C und 3500 Upm geerntet und auf Eis gestellt, um den Zellmetabolismus zu stoppen. Dann wurden sie in kleinen Tropfen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

- Extraktion der RNA

Die Lyse der Zellen erfolgte durch eine mechanische Methode. Teflon Behälter und Wolframcarbid Kugeln wurden in Bentonit-Lösung während 15 min gewaschen und mit DEPC-H<sub>2</sub>O abgespült. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Zelltropfen wurden hineingelegt und 2 min bei 2000 Upm in dem Micro-Dismembrator geschüttelt. Der Gries wurde in 2 ml Trizol<sup>®</sup> resuspendiert. Trizol<sup>®</sup> ist eine Monophase-Lösung von Phenol und Guanidinium Isothiozyanate, welche die Integrität der RNA gewährleistet, während andere Zellkomponenten denaturiert werden. Der Prozess basiert auf der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987). Nach einem einminütigen Vortex-Schritt wurden die Proben 5 min bei RT stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu begünstigen. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 13000 Upm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. 0,4 Probenvolumen von Chloroform wurden zugegeben, 15 s mit der Hand geschüttelt, und 10 min bei RT stehen gelassen. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und

13000 Upm wurde die obere farblose Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Zugabe von Chloroform und folgendem Zentrifugationschritt separierten die Lösung in einer rötlichen, organischen Phase, in der sich die DNA und Proteine anreichern, einer Interphase und einer farblosen wässrigen Phase, in der sich die RNA anreichert. Um die RNA zu fällen, wurde 0,5 Probenvolumen von Isopropanol hinzugefügt und 15 min bei RT stehen gelassen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13000 Upm wurde während 10 min das Pellet mit 1 ml eiskalt 70 % Ethanol gewaschen und noch einmal 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. 5 min bei 37 °C trocknen gelassen. Anschließend wurde es in 500 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 500 µl LiCl Puffer wurde die RNA über Nacht gefällt. Die Proben wurden dann 30 min bei 4 °C und 13000 Upm zentrifugiert und zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, jeweils mit 1 ml und 500 µl. Zuletzt wurde die RNA bei RT trocknen gelassen und in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.8.8 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

- Photometrisch

Es wurde in der Regel eine 1/10<sup>3</sup> Verdünnung hergestellt und die OD bei 260 und 280 nm bestimmt. Wenn das Nanodrop Photometer benutzt wurde, wurden direkt 2 µl der Lösung auf das Gerät pipettiert.

$A_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

- Abschätzung im Agarosegel

Als Standard wurde unverdaute λ DNA in Konzentrationen von 10, 20 und 40 ng/µl vorbereitet, und 10 µl jeder Konzentration auf das Gel aufgetragen. 5 µl jeder Probe wurden normalerweise beladen.

### 3.8.9 Southern Blot

#### 3.8.9.1 DNA-Verdau

Ca. 1,5 µg DNA wurden 2 Tage in einem Endvolumen von 200 µl mit 20 U des entsprechenden Enzyms verdaut. Es folgte über Nacht eine Fällung mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen 100 % Ethanol bei -20 °C. Anschließend wurde die DNA zentrifugiert (30 min bei 13000 Upm) und in 22 µl TE pH 8 resuspendiert.

### 3.8.9.2 Markierung einer Sonde

- Random Markierung

Das Zielfragment wurde aus dem entsprechenden Plasmid geschnitten und gereinigt. 15 µl wurden 10 min bei 95 °C denaturiert und 2 µl Hexanucleotid Mix, 2 µl DIG-dUTP Mix und 2U Klenow Enzym wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und mit 1/10 Volumen 0,2 M EDTA pH 8 gestoppt. Es folgte ein Fällungsschritt (1/10 Volumen 4 M LiCl, 2,5 Volumen 100 % Ethanol) während mindestens 4 Stunden. Zuletzt wurde die Probe 30 min bei 4 °C, 13000 Upm zentrifugiert und in 20 µl TE pH 8 resuspendiert.

- DIG-PCR Markierung

Es wurde das DIG-PCR Kit von Roche nach Anweisung der Hersteller verwendet. Ein paar Modifikationen wurden trotzdem vorgenommen. DIG-dUTP wurde 1/5 mit dem Nukleotid-Mix verdünnt und es wurden 50 statt 30 Zyklen programmiert. Als Template wurden 10 pg des entsprechenden Plasmides benutzt.

- Sondentest

1 µl der markierten Sonde wurde in einer Verdünnungsreihe  $1/10^2$ ,  $1/10^3$ , und  $1/10^4$  verdünnt. 1 µl jeder Verdünnung wurde auf die Membran pipetiert und fixiert. Die Membran wurde dann 30 min bei RT mit 1 µl Anti-DIG-Antikörper in 5 ml 1 X NRB2 inkubiert. Nach zwei 15 minütigen Waschschritten mit NRB1, und einer kurzen Spülung in NRB3, wurde die Membran mit 11 µl NBT und 9 µl X-Phos in 2 ml NRB3 in der Dunkelheit entwickelt.

### 3.8.9.3 Auftrennung der DNA-Banden

Die verdauten DNA Proben wurden auf ein 0,7-0,8 %igen Agarosegel aufgetragen und über Nacht laufen gelassen. Vor dem Transfer wurden die DNA Banden mit UV Licht visualisiert und photographiert.

### 3.8.9.4 Transfer auf eine Nylon-Membran

- Transfer durch Vakuum-Blot

Zuerst wurde das Gel 15 min in 0,25 M HCl geschüttelt, um große Banden zu depurinieren. Die Vakuumblokkammer (LKB 2016 VacuGene, Pharmacia) wurde aufgebaut, und der Transfer erfolgte bei einem Druck von 40 cm H<sub>2</sub>O. Es wurde

beachtet, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran vorhanden waren. Es folgte ein Denaturierungsschritt und Neutralisationsschritt, jeweils während drei Minuten und anschließend der Transferschritt während 45 min mit 20X SSC. Die Membran wurde dann kurz trocknen gelassen und die DNA wurde während 3 min unter UV Licht auf der Membran fixiert.

- Transfer durch „Downward“ Kapillar-blotting

Das Gel wurde 15 min in 0,25 M HCl geschüttelt, um große DNA Banden zu depurinieren. Danach wurde es weitere 15 min in 0,4 M NaOH geschüttelt. Es wurde ein Kapillar-Transfer-Stapel gebaut. Der Transfer wurde für mindestens 2 Stunden mit dem neutralen Puffer 20X SSC durchgeführt. Die Membran wurde dann kurz trocknen gelassen und die DNA wurde während 3 min unter UV Licht auf der Membran fixiert.

#### 3.8.9.5 Hybridisierung mit der markierten Sonde

Al dann die DNA auf der Membran fixiert wurde, wurde diese mindestens eine Stunde in einer geschlossenen Tüte mit 30 ml des Hybridisierungspuffers in einem Wasserbad bei 68 °C inkubiert. Die Sonde wurde bei 95 °C denaturiert und in 10 ml Hybridisierungspuffer gelöst. Die Membran wurde mit der Sonde übernacht auch bei 68 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Blot zweimal bei RT in NRW1 (5 min), und zweimal bei 68 °C in NRW2 (15 min) gewaschen. Die Membran wurde dann kurz in NRB1 abgespült und eine Stunde bei RT auf einem Schüttler in 1 % NRB2 blockiert. Anschließend wurde sie wieder kurz in NRB1 abgespült und 45 min bei RT in einer Plastiktüte mit 4 µl Anti-Dig Antikörper in 20 ml 1X NRB2 inkubiert. Nach zwei Waschsritten für 15 min in NRB1 erfolgte die Entwicklung der Membran. Zuletzt wurde sie in NRB3 abgespült und mit 45 µl NBT und 35 µl X-Phos in 10 ml NRB3 in der Dunkelheit entwickelt.

### 3.8.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 3.8.10.1 Standard-PCR (Mullis & Fallona, 1987)

Die Amplifizierung von DNA wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra durchgeführt. Falls anders vermerkt, wurde sie angesetzt, wie folgenderweise beschrieben:

- als DNA-Template wurde *C. albicans* DNA aus dem Stamm CAF2-1 benutzt. Um DNA Fragmente zu amplifizieren, deren fehlerfreie Sequenz wichtig war,

wurde die „High Fidelity-Polymerase“ von Roche verwendet, sonst wurde die Taq-Polymerase von Fermentas eingesetzt.

- Der PCR-Ansatz hatte ein Endvolumen von 50 µl: 5 µl 10X Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Oligonukleotid vorwärts (20 µM), 1 µl Oligonukleotid rückwärts (20 µM), 10-100 ng DNA-Template, X µl ddH<sub>2</sub>O; 1 U Polymerase.
- PCR-Programm:

SCHRITT	TEMPERATUR/ °C	ZEIT/ s	
DNA Denaturierung, 1 Zyklus	95	120	
DNA Amplifizierung, 30 Zyklen	Denaturierung	95	
	Oligonukleotide	X	
	Anlagerung		
	Kettenverlängerung	68	30/500 bp
Abschluss der Reaktion, 1 Zyklus	72	420	

#### 3.8.10.2 *C. albicans* Kolonie-PCR

Eine geringe Menge Zellmaterial wurde in 40 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und 10 min bei 95 °C erhitzt. 4 µl davon wurden in einer Standard-PCR eingesetzt. Der erste Denaturierungszyklus wurde bis 10 min verlängert.

#### 3.8.10.3 Mutagenese-PCR

Es wurde das „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene nach Anweisung der Hersteller benutzt.

#### 3.8.10.4 qPCR

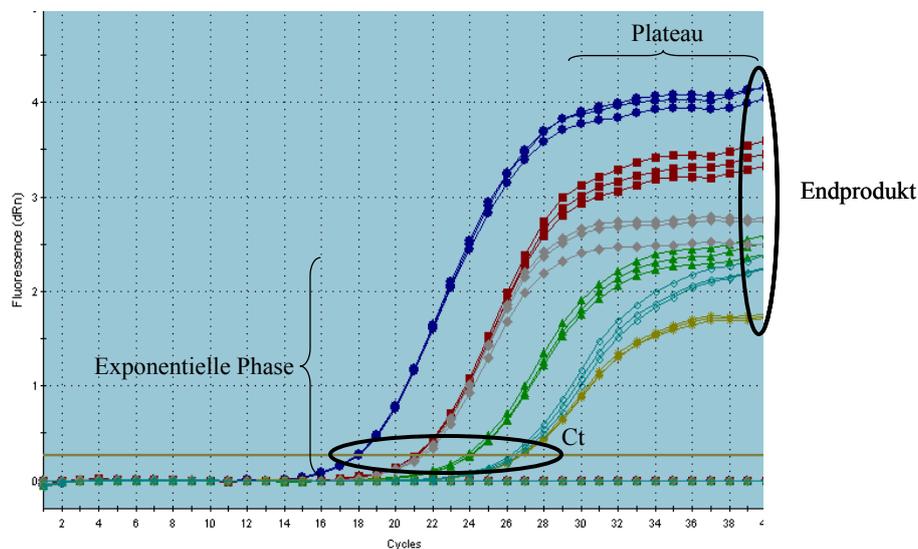
PCR in Echtzeit hat die bisherigen verwendeten klassischen Methoden (Northern Blotting, *in situ* Hybridisierung und RNase-Protektion Versuche) zur Quantifizierung der Gen-Transkription dank ihrer Sensibilität und Flexibilität ersetzt. Außerdem hat die Trennung der Reverse Transkription/PCR Schritte den Vorteil, dass stabile cDNA Pools generiert werden, welche zeitlos gelagert werden können.

##### 3.8.10.4.1 Theoretische Begründung

Eine PCR-Reaktion ist eine exponentielle Amplifizierung eines gezielten DNA-Molekülsbestands der Anfangsmenge  $N_0$ . Die Gleichung, die den Prozess beschreibt, ist  $N_n = 2^n N_0$ , wo „n“ die Zyklennummer ist, und „ $N_n$ “ die Molekülnummer bei Zyklus n. „2“ entspricht einer 100 % Effizienz, welche ein Idealfall ist. Unter Echtbedingungen

erreicht die Effizienz diesen Wert nicht, da es in jeder Reaktion Inhibitoren und Katalysatoren gibt. Im Laufe des Prozesses werden die Reagenzien aufgebraucht und die Polymerase inaktiviert, deswegen ist der Amplifizierungsfaktor eine Nummer zwischen 1 (keine Amplifizierung) und 2 (perfekte Amplifizierung). Daher kommt es, dass das Endprodukt nicht genau repräsentativ des Ausgangsprodukt ist (Peccoud & Jacob, 1998).

Wenn statt der Endproduktmessung (Standard-PCR), das Produkt in der exponentiellen Phase (PCR in Echtzeit) gemessen wird erhöht sich die Präzision, mit der die Molekül-Anfangsmenge geschätzt wird (Abb. 6).



**Abb. 6: qPCR.** Das Endprodukt entspricht nicht der Ausgangsmenge, weil die Reagenzien aufgebraucht sind und die Polymerase inaktiviert wird. Dagegen wird die PCR quantitativ, wenn das synthetisierte Produkt an dem  $C_t$ -Wert gemessen wird.

**Fig. 6: qPCR.** El producto final no es representativo del producto inicial, porque los reactivos se van agotando y la polimersa es inactivada. Por el contrario, si el producto sintetizado es medido en el ciclo umbral ( $C_t$ ), la reacción es todavía cuantitativa.

PCR in Echtzeit registriert die Amplifizierung der Zielmoleküle während des ganzen Prozesses. Das System basiert auf der Erkennung der ausgestrahlten Fluoreszenzerhöhung eines zugegebenen Fluorogens, welches mit dem Amplicon in verschiedenen Arten interagieren kann, je nach entsprechender chemischer Struktur. Die Fluoreszenzerhöhung ist proportional zu dem synthetisierten Amplicon. Das Profil der Reaktion kann in drei Phasen eingeteilt werden: eine Anfangsphase, in der die

emittierte Fluoreszenz niedriger als der Hintergrund ist, eine exponentielle Phase und ein Plateau.

Ein wichtiger Punkt ist derjenige, an dem die Fluoreszenz des synthetisierten Produktes gerade den Hintergrund überschritten hat. Der Zyklenwert dieses Punktes ( $C_t$ -Wert) hängt von der Anfangskonzentration des Zielmoleküls ab. Die obige Gleichung wird leicht modifiziert, um die Effizienz der Reaktion zu berücksichtigen. Diese lautet jetzt:  $N_{C_t} = N_0(E)^{C_t}$ , wobei „ $N_{C_t}$ “ die Anzahl der Moleküle am  $C_t$ -Wert und „ $E$ “ die Effizienz des Prozesses bedeuten.

#### 3.8.10.4.2 Effizienzberechnung mittels einer Verdünnungsreihe (Rasmussen, 2001)

Die Effizienz der PCR in Echtzeit kann durch direkte und indirekte Methoden berechnet werden. Zu den Ersten gehören die Bestimmung der absoluten Fluoreszenzerhöhung und die Verdünnungsreihen. Indirekte Methoden basieren auf der Anpassung mathematischer Modelle an die Kurve der PCR. Die Wahl der einen oder der anderen Methode hängt von der späteren statistischen Verarbeitung der Daten ab.

Von einer Verdünnungsreihe von der Basis 10 ausgehend, kann eine  $C_t$  gegen  $\log[cDNA]$  Graphik hergestellt werden, deren Eichgerade die Amplifikationseffizienz ist.

Das Verhältnis  $C_t/\log[cDNA]$  lässt sich einfach erschließen, wenn die Gleichung  $N_{C_t} = N_0(E)^{C_t}$  Gleichung linearisiert wird. Dafür wird der Logarithmus zur Basis 10 gesetzt:  $\log N_{C_t} = \log N_0 + C_t \cdot \log E$  oder  $C_t = -(1/\log E) \cdot \log N_{C_t} + (\log N_0 / \log E)$  [allgemein als  $y = ax + b$  bezeichnet]. Die Ausgangsmenge des Standards ist gegeben und entspricht  $\log N_{C_t}$ .  $N_{C_t}$  und  $E$  sind Konstanten.  $C_t$  ist der Wert, der gemessen wird, und infolgedessen das  $y$  Element. Die Eichgerade ist  $a (-1/\log E)$ .

Die Amplifikationseffizienz soll zwischen den analysierten Genen vergleichbar sein, um verlässliche Daten zu erzielen.

#### 3.8.10.4.3 Reaktionsvorbereitung

- DNase I Behandlung der RNA:

Obwohl das Protokoll, um die RNA zu isolieren, sehr spezifisch ist, wurden die Proben mit DNase I behandelt. Dafür wurden 8  $\mu g$  RNA mit 1  $\mu l$  Turbo DNase I (2U/ $\mu l$ ) (Ambion) in einem Endvolumen von 20  $\mu l$  eingesetzt. Die Reaktion wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die RNA mit dem RNA Clean-Up Kit-5<sup>TM</sup> gereinigt. 80 µl bindende-Puffer wurden dazugegeben und die Probe wurde auf die Zymo-Spin<sup>TM</sup> Säule übertragen. Nach einem einminütigen Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen und die Proben mit 200 µl Wasch-Puffer gewaschen. Danach wurden die Proben noch einmal zentrifugiert, um restlichen Wasch-Puffer zu eliminieren. Zuletzt wurde die RNA in zwei Schritten in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT.

- cDNA Synthese:

Es wurden sowohl das RETROscript® Kit (Ambion) als auch das AffinityScript<sup>TM</sup> QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) nach Anwendung der Hersteller verwendet. cDNA wurde aus 1 µg RNA synthetisiert. Um genug Volumen für die Bestimmung der Effizienz zu haben, wurden die 20 µl cDNA zuerst 1/12,5 verdünnt und danach noch zweimal 1/10. Die NoRT-Kontrolle wurde nur 1/12,5 verdünnt.

- qPCR:

Alle RT-qPCR Experimente wurden mit zwei unabhängigen RNA Proben durchgeführt. Jede Probe wurde dreimal in einem Endvolumen von 25 µl, welches aus 10 µl cDNA, 12,5 µl SYBR Master Mix und 1,25 µl jedes Oligonukleotids (0,4 µM) bestand, angefertigt. Zu jeder Probe wurden eine NoRT-Kontrolle und eine Wasser-Kontrolle eingeschlossen. Das PCR-Programm lief wie folgenderweise beschrieben: ein Zyklus von 10 min bei 95 °C; 40 Zyklen bei 95 °C/15 s, 60 °C/1min, 60 °C/30 s; und ein Endzyklus von 30 min bei 95 °C für die Schmelzkurve. All die Messungen wurden mit der Mx3000P<sup>®</sup> Apparatur der Firma Stratagene durchgeführt.

#### 3.8.10.4.4 Statistische Behandlung der Daten

Dreifache Ct Rohwerte, bei dem gleichen Schwellenwert bestimmt, ihren Mittelwert und Standardabweichung wurden von der Mx3000P<sup>®</sup> Software zu einer Exel Datei exportiert. Diejenigen Werte mit einer Standardabweichung größer als 0,3 wurden eliminiert. Es gibt keinen Konsens über die Divergenz zwischen den einzelnen Ct-Werten und dem Mittelwert. Eine Standardabweichung <0,16 gilt als ideal, ist in der Praxis jedoch schwer zu erreichen. Eine Standardabweichung von 0,5 entspricht einem Unterschied von einem Zyklus zwischen zwei Wells, was bedeutet, dass ein Well die doppelte Menge im Vergleich zu dem anderen enthält. Die Grenze der

Standardabweichung bei 0,3 wird in verschiedenen Arbeiten zitiert (Bubner & Baldwin, 2004; Introduction to quantitative PCR, Stratagene).

#### 3.8.10.4.5 Bestimmung der Effizienz

Die Ct-Mittelwerte einer vierfachen Verdünnungsreihe (Verdünnungsschritte 1/10) wurden gegen willkürliche cDNA Einheiten dargestellt, und die Trendlinie hinzugefügt. Die Eichgerade auf dem Logarithmus zur Basis e wurde auf den Logarithmus zur Basis 10 durch den Faktor 2,303 umgerechnet und die Effizienz mit der Gleichung  $E=10^{(-1/\text{Eichgerade})}$  berechnet (Pfaffl, 2001).

#### 3.8.10.4.6 Normalisierung gegen Aktin: relativer Transkriptspiegel

Die Normalisierung der Genexpression ist die Voraussetzung, um die Abweichung zwischen Proben vergleichen zu können. Dafür werden die sogenannten Haushaltsgene am meisten benutzt, obwohl gesamte RNA oder gesamtes Gewebe andere Möglichkeiten darstellen. Die Haushaltsgene sollten trotz unterschiedlicher Wachstumsbedingungen keine Expressionsänderungen zeigen (Wong & Medrano, 2005). Weil es jedoch keine solchen Gene gibt, schlugen Vandesompele *et al.* (2002) vor, den geometrischen Mittelwert von mindestens drei Haushaltsgenen für die Normalisierung zu nutzen. Aufgrund der Anzahl der *PMT*-Gene und des Designs der Experimente, wurde in dieser Arbeit nur Aktin (*ACT1*) als Haushaltsgen betrachtet.

Nach Berechnung der Effizienz wurde die Normalisierung des Transkriptspiegels mit der Gleichung  $MNE = ((E_{ACT})^{Ct_{ACT, MW}}) / ((E_{GEN})^{Ct_{GEN, MW}})$  bestimmt, wobei MNE der Mittelwert des normalisierten Transkriptspiegels ist. Die Standardabweichung (STABW) wurde mithilfe der Gauss Fehlerverbreitungs-Differentialgleichung  $STABW_{MNE} = MNE * ((\ln(E_{GEN})) * SE(Ct_{GEN, media}))^2 + ((\ln(E_{ACT})) * SE(Ct_{ACT, media}))^2)^{1/2}$  berechnet (Muller *et al.*, 2002).

#### 3.8.11 5'RACE (5' Rapid Amplification of cDNA Ends)

Um die Startstelle der mRNA der verschiedenen *PMT*-Gene zu bestimmen, wurde das FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE kit (Ambion) nach Anwendung der Hersteller benutzt.

Die Gesamt-RNA wurde mit Kalbdarm Alkaline Phosphatase (CIP) behandelt, um die freie 5'-Phosphatgruppe der degradierten mRNA, rRNA, DNA, etc... abzuspalten. Die 5'-Cap Struktur der intakten RNA wurde dann mit der Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) entfernt. Es blieb eine freie Phosphatgruppe übrig, an die eine Adaptersequenz

ligiert wurde. Nach der reversen Transkription wurde eine geschachtelte PCR durchgeführt. Ziel der geschachtelten PCR ist die Spezifität der Amplifizierung zu steigern. Das Produkt der zweiten PCR wurde in einen Vektor kloniert und zuletzt sequenziert. Das folgende PCR-Programm wurde für alle ersten PCR-Amplifikationen und zweiten PCR Reaktionen von *CaPMT1*, *CaPMT4*, *CaPMT5*, *CaPMT6* und *Y. lipolytica* verwendet:

ZYKLEN	TEMPERATUR/ °C	ZEIT/s
1	94	180
35	94	30
	60	30
	72	120
1	72	420

Die Oligonukleotid-Anlagerung für die zweite *CaPMT2* PCR erfolgte bei 55 °C.

### 3.9 Proteinbiochemische Methoden

#### Bestimmung der Promotor-Aktivität mithilfe eines Reportergens

Reportergene werden heutzutage in zahlreichen Anwendungen benutzt, z.B. bei Analyse der Gentranskription und -regulation, Rezeptorfunktion und Intrazellulärsignalisierung, Proteinfaltung und Metabolismus, Pathogen-Wirt Interaktionen und RNAi Hemmung der Genfunktion (Promega Cell Notes, 2004). Die Methode basiert auf dem Grundprinzip der genetischen Fusion, das heißt, ein messbares Genprodukt wird unter die Zielgenkontrolle gestellt, so dass es als „Tag“ oder Markierung der Zielgenexpression gilt (Silhavy & Beckwith, 1985). In dieser Arbeit wurden die *RLUC*- und *lacZ*-Reportergene verwendet.

#### 3.9.1 Messung der Luziferase-Aktivität

##### 3.9.1.1 Das *RLUC*-Reportergen

*RLUC* kodiert für das Luziferaseprotein aus *Renilla reniformis*. Die *Renilla* Luziferase ist ein 36 kDa-Protein, welches die Oxidation von Coelenterazine katalysiert. Das in dem Prozess ausströmende Licht wird mit einem Luminometer registriert.

### 3.9.1.2 Herstellung von Rohextrakten

- Glasperlen Reinigung

Glasperlen wurden mit destiliiertem Wasser bedeckt und 10 ml konzentrierter HCl wurden dazugegeben. Sie wurden dann über Nacht unter dem Abzug zum Rühren gelassen. Anschließend wurden die Glasperlen mit destiliiertem Wasser so oft gewaschen, bis der pH-Wert neutral war. Zuletzt wurden sie in einem Trockenschrank mit hoher Temperatur für ein oder zwei Stunden zum Trocknen gelassen.

- Zellaufschluss

20/50 ml Medium wurden mit einer Übernacktkultur auf eine  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und während 4 Stunden wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen 5 min bei 4 °C und 3500 Upm abzentrifugiert, mit destiliiertem Wasser gewaschen und über Nacht bei -80 °C gelagert. Um den löslichen gesamten Proteinextrakt zu gewinnen, wurde das Protokoll (*Renilla* Luciferase Assay System) der Firma Promega befolgt. Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und in 200 µl 1X Lysis Puffer resuspendiert (die benötigte Menge wurde durch Verdünnung des im Kit mitgelieferten 5X Lysis Puffer mit destiliiertem Wasser angesetzt), und 1/3 Volumen Glasperlen wurden zugegeben. Die Zellen wurden in zwei Schritten von 10 min bei 4 °C auf einem Vibrax (VX 2E, Janke & Kukel) aufgeschlossen. Die Proben wurden dann 5 min bei 4 °C und 3500 Upm zentrifugiert, um die Zelltrümmer und Glasperlen von dem Überstand abzutrennen. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert.

### 3.9.1.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Es wurde eine Doppelbestimmung für jede Probe durchgeführt. Dafür wurde eine ausreichende Menge von *Renilla* Luciferase Assay Reagent (1 µl Substrat + 99 µl Puffer) vorbereitet. Die Mischung wurde vor Licht geschützt aufbewahrt. Die Messung erfolgte in dem Luminometer Fluoroscan Ascent F1 der Firma Labsystems. 100 µl der Reaktions-Lösung wurden als Blank verwendet, und 100 µl der Reaktions-Lösung plus 10 µl des Proteinrohextraktes immer einzeln pipettiert und gemessen.

### 3.9.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Die Grundlage der Proteinbestimmung nach Bradford ist die Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Comassie Brilliant Blue G-250. Frei in der Lösung liegt es bei 465 nm, wenn der Farbstoff an Proteine bindet bei 595 nm. In dem

Bereich von  $OD_{595}$  0,1-0,9 entspricht das Verhältnis von OD/Konzentration einer linearen Gleichung und die Lambert-Beer Gleichung wird angewendet.

Der Rohextrakt wurde 1/4 verdünnt, und 5  $\mu$ l davon wurden zu 200  $\mu$ l Bradford Reagenz (1/5 in destiliiertem Wasser verdünnt) hinzugegeben. Die Messung erfolgte in dem Elx800<sup>TM</sup> Absorbance Microplate Reader der Firma BioTek. Als Standard wurde für jede Messung eine Eichkurve mit 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, und 20  $\mu$ g/ml BSA erstellt. Eine Doppelbestimmung wurde immer durchgeführt.

### 3.9.1.5 Datenanalyse

Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden auf die gesamte Proteinkonzentration normalisiert und das Ergebnis als RLU (relativ light units) pro  $\mu$ g Protein dargestellt.

### 3.9.2 Das *lacZ*-Reporter gen

Uhl & Johnson (2001) entwickelten das *lacZ* Gen aus *Streptococcus thermophilus* als Reporter gen für *C. albicans*. *C. albicans* weist eine seltene Codon Übersetzung auf. CTG wird als Leu statt als Ser gelesen. Deswegen ist die Expression von fremden Reporter genen kompliziert. *lacZ* aus *E. coli* hat z.B. 51 CTG Codons, was in *C. albicans* zu einer großen Proteinmissfaltung führen würde. Demgegenüber hat *lacZ* aus *Streptococcus thermophilus* nur ein CTG Codon in einer non-konservierten Region, welche gegen TTA durch Mutagenese-PCR ausgetauscht wurde. Ein weiterer Vorteil des *lacZ* Reporter gens ist, dass es sowohl qualitativ als auch quantitativ gemessen werden kann.

#### 3.9.2.1 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (*lacZ*-Assay)

Die Zellen aus 1 ml Übernachtskultur wurden geerntet (5 min, 3800 Upm), mit Z-Puffer gewaschen und in 1000  $\mu$ l Z-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 30  $\mu$ l Chloroform, 15  $\mu$ l 0,1 % SDS, und einem einminütigen Vortex-Schritt wurden die Zellen permeabilisiert. Danach wurde die Mischung während 5 min bei 37 °C äquilibriert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l ONPG (4 mg/ml in Z-Puffer) hinzugegeben und die Proben in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Sobald eine Gelbfärbung eintrat, wurde die Reaktion mit 500  $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt und die Inkubationszeit notiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert (1 min bei 13000 Upm) und die Absorption bei 420 nm ermittelt. Die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet:  $(1000/t \text{ (min)}) \times (OD_{420}/OD_{600}) = y$  Miller Units.

### 3.9.2.2 Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

- X-Gal Overlay

5  $\mu$ l einer Übernachtskultur wurden auf Platten getropft und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. 0,1 g Agarose wurde mit 10 ml destiliertem Wasser aufgekocht, und danach mit 10 ml Phosphat-Puffer pH 7,0 gemischt. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 400  $\mu$ l 10 % SDS und 200  $\mu$ l X-Gal (4 mg/ml DMF) dazugegeben. Jede Platte wurde mit 10 ml der Lösung überschichtet und bei 37 °C inkubiert.

- Wachstum auf XMM-Platten

Das Medium wurde nach Uhl & Johnson (2001) mit verschiedenen C-Quellen vorbereitet. Die Stämme wurden ausgestrichen und unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert.

XMM-Medium: 0,17 % YNB ohne Aminosäuren und ohne Ammonium Sulfate, 2 % C-Quelle, 0,5 % Ammonium Sulfate und 2 % Agar wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. 0,07 Mol aus einer 1 M Kalium Phosphate pH 7,0 Lösung und 0,2 % (v/v) X-Gal (20 mg/ml) wurden nach der Autoklavierung dazugegeben.

### 3.10 Die Drei-Hybrid-Analyse

Die Drei-Hybrid-Analyse ist eine genetische Methode in Hefezellen, um RNA-Protein Interaktionen nachzuweisen. RNA-Protein Interaktionen spielen eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie der Translation, mRNA Prozessierung, der frühen Entwicklung und Infektion durch RNA Viren. Das System wurde bei SenGupta *et al.* (1996) entwickelt. DNA-bindende Domänen werden stromaufwärts eines Reportergens in das Hefechromosom integriert. Das erste Hybrid-Protein trägt die DNA-Bindedomäne und eine RNA-Bindedomäne, welche mit dem Hybrid-RNA Molekül interagiert. Das zweite Hybrid-Protein trägt auch eine RNA-Bindedomäne aus dem Bacteriophagen MS-2 und eine Domäne für die Aktivierung der Transkription. Die Hybrid-RNA enthält zwei MS-2 Protein-bindende Orte und die Sequenz der Ziel-RNA. In dieser Arbeit wurde die Dom34/*PMT1*-Promotor Interaktion untersucht.

- Konstruktion des kodierenden Plasmides für das Hybrid-RNA Molekül

Der per PCR-amplifizierte *PMT1* Promotorbereich -221/-1 bp wurde in die *XmaI* Schnittstelle der Plasmide pIII/MS2-1 (Abb. 7) und pIII/MS2-2 kloniert (SenGupta *et al.*, 1996). In dem ersten Plasmid wurde das Fragment genau hinter die MS2-kodierende Region kloniert, und in pIII/MS2-2 vor die MS2-kodierende Region. Die Orientierung des Fragmentes im Plasmid wurde überprüft, da bisher nicht geklärt wurde, ob diese einen Effekt bei der Interaktion ausüben kann.

Alle vier Möglichkeiten wurden in *S. cerevisiae* Stämme L40coat und R40coat zusammen mit pACTII-*DOM34* kotransformiert. Siehe Abb. 50 im Anhang.

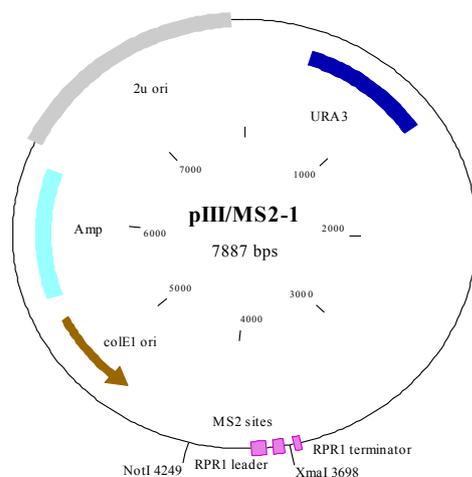


Abb. 7: Plasmidkarte von pIII/MS2-1.

Fig. 7: mapa del plásmido pIII/MS2-1.

### 3.11 Deletion des *ORF19.6813*

Der *ORF19.6813* wurde mit der „URA-Blaster“ Methode disruptiert (Fonzi & Irwin, 1993). Der nicht-codierende Bereich zwischen *ORF19.6813* und dem stromabwärts offenen Leseraster (*ORF19.6814*) beträgt nur 281 bp. Die Oligonukleotide *XmaI*-orf19.6813for und *AflIII*-Pmt2rev wurden benutzt, um *ORF19.6813* und seine stromauf- und stromabwärts nicht-codierenden Regionen zu amplifizieren. Das resultierende 1418 bp Fragment wurde dann in pGEM kloniert (pPdC51). Der Vektor wurde mit *EcoRV* geschnitten. *EcoRV* schneidet zweimal innerhalb des *ORF19.6813*, so dass ein 157 bp Fragment verloren geht. An dieser Stelle wurde das *PvuII* Fragment aus p5921, das dem *URA3*-Kassette entspricht, kloniert. Der resultierende Vektor wurde mit *XmaI* und *AflIII* geschnitten, und das 5625 bp linearisierte Fragment wurde durch homologe Rekombination in den Stamm CAI4 integriert. Es wurden sechs Kolonien (*ORF19.6813/orf19.6813Δ::hisG-URA3-hisG*) erhalten und auf Medium mit 0,02 % FOA ausgestrichen, um die Ura<sup>-</sup>-Klone zu selektieren. Diese (*ORF19.6813/orf19.6813Δ::hisG*) wurden mittels einer Kolonie-PCR getestet. Drei Klone waren positiv, die für eine weitere Transformation mit dem Kasette verwendet wurden. Nur ein Klon (*orf19.6813Δ::hisG-URA3-hisG/orf19.6813Δ::hisG*) wurde dann gewonnen, das auch durch eine Kolonie PCR getestet wurde. Aus einer neuen Selektion auf Medium mit FOA wurden acht Klone (*orf19.6813Δ::hisG/orf19.6813Δ::hisG*) erhalten. Zuletzt wurden diese Klone in einem Southern-Blot überprüft. Dafür wurde DNA aus jedem Klon isoliert und mit *SalI* verdaut (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 28 ist zu sehen, wie das Locus nach der Integration der *hisG-URA3-hisG* Kassette und die Elimination des *URA3*-Selektionsmarkers modifiziert wurde. Dies sollte die Deletion des *ORF19.6813* bewirken, möglicherweise ohne die *PMT2*-Expression zu modifizieren.

---

## 4 Ergebnisse

Fünf Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt) wurden bei *C. albicans* beschrieben (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Sie katalysieren die Anknüpfung des ersten Mannosylrestes an die sekretorischen Zielproteine. Aus der Transkriptomanalyse der *pmt*-Mutanten ergab sich, dass unterschiedliche Gruppen von Genen durch jede Pmt-Isoform reguliert werden (Prill, 2004). Zur Ergänzung der Regulationsanalysen wurde in dieser Arbeit die Expression der *PMT*-Gene auf der Transkript- und Promotorebene untersucht. Es sollte außerdem definiert werden, welche Signalwege an der Detektion und Weiterleitung der defekten *O*-Mannosylierung beteiligt sind. Dafür wurden die Transkriptspiegel der *PMT*-Gene mittels qPCR bestimmt und die Promotoraktivität der *PMT*-Gene mithilfe der *RLUC*- und *lacZ*-Reportergene getestet. Außerdem wurde die Expression der *PMT*-Gene und die Wirkung eines Pmt1-Inhibitors in verschiedenen Mutanten überprüft.

### 4.1 Transkription der *PMT*-Gene

Die Transkripte der *PMT*-Gene wurden in vorherigen Arbeiten durch Northern Blot-Verfahren untersucht. Obwohl das *PMT1*-Transkript bei der Hypheninduktion leicht zunahm und das *PMT6*-Transkript leicht abnahm, wurde keine enge Korrelation der *PMT1/PMT6*-Transkriptspiegel mit der Hyphenbildung beobachtet (Timpel *et al.*, 2000). Auch für die *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte wurde keine Korrelation zwischen *PMT*-Expression und der Hyphenbildung nachgewiesen (Prill *et al.*, 2005). Das *PMT5*-Transkript konnte nicht durch Northern Blotting detektiert werden, wurde aber durch RT-PCR verifiziert (Prill *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit sollte die Genregulation der *PMT*-Gene mittels qPCR bestimmt werden. Dafür wurde der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene, bezogen auf das *ACT1*-Transkript, bestimmt. Gesamt RNA der Stämme wurde isoliert und der relative *PMT*-Transkriptspiegel wie in Material und Methoden (Abschnitt 3.8.10.4) beschrieben bestimmt. Hierbei wurde eine doppelte biologische Bestimmung durchgeführt, welche durch zwei zusammengestellte Balken in den Grafiken dargestellt wird. Der Mittelwert und die Standardabweichung jedes Balkens beziehen sich auf die drei technischen Replikate der einzelnen biologischen Bestimmungen.

Die niedrigen relativen Transkriptwerte des *PMT5*-Gens waren durch qPCR nicht genau zu bestimmen, da die Abweichung zwischen den beiden biologischen Replikaten sehr groß war. Die erhaltenen Daten sind im Anhang aufgeführt.

Die relativen Transkriptspiegel wurden in *pmt*-Mutanten und in Glykosylierungs- und Zellwand-Mutanten bestimmt, um Kompensationseffekte zwischen *PMT*-Genen und der transkriptionellen Antwort der *PMT*-Gene auf Zellwandveränderungen zu untersuchen. Außerdem wurden *PMT*-Transkriptspiegel unter verschiedenen Wachstumstemperaturen analysiert, da Temperatur ein wichtiger Stress-Faktor und Morphogenese-Regulator bei *C. albicans* ist. Zusätzlich wurden *PMT*-Transkriptspiegel bei Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren untersucht.

#### 4.1.1 *PMT*-Transkriptspiegel in *pmt*-Mutanten

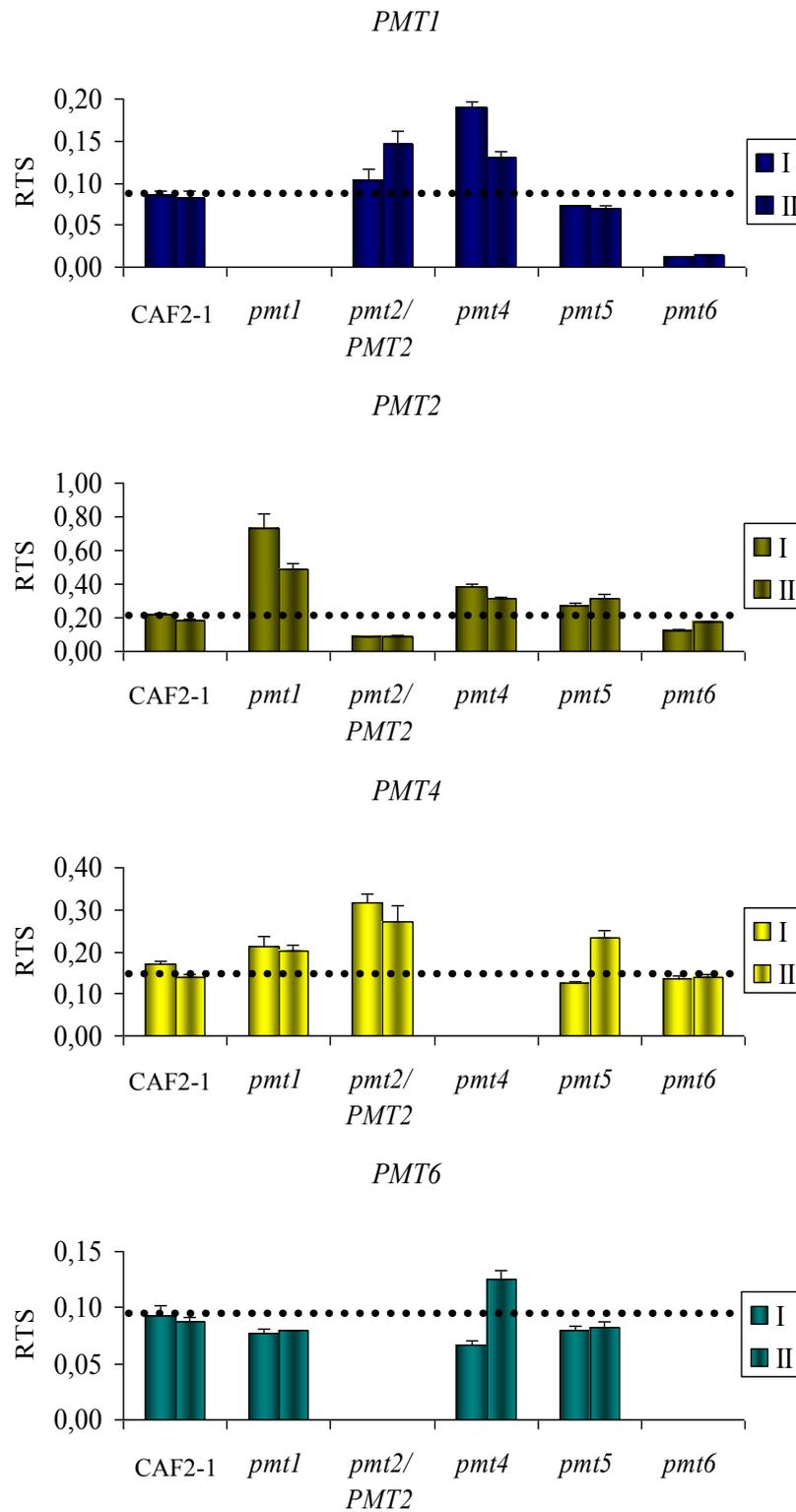
Der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene wurde in dem Kontrollstamm CAF2-1 und in den *pmt*-Mutanten gemessen. Alle Stämme wurden in YPD-Medium bei 30 °C bis zur logarithmischen Phase ( $OD_{600} = 0,5-0,6$ ) wachsen gelassen. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und der relative Transkriptspiegel durch qPCR bestimmt.

Es wurden sowohl positive als auch negative Regulationseffekte von *pmt*-Mutationen auf *PMT*-Transkriptspiegel nachgewiesen (Abb. 8). In der *pmt1*-Mutante wurde nur das *PMT2*-Transkript um einen Faktor von 2,5-3 induziert. In der *pmt2/PMT2*-Mutante wurde der *PMT4*-Transkriptspiegel gesteigert während in der *pmt4*-Mutante die *PMT1*-, *PMT2*- und *PMT5*-Transkripte leicht induziert wurden.

Interessanterweise wurde in einigen *pmt*-Mutanten der Transkriptspiegel anderer *PMT*-Gene nicht nur gesteigert, sondern auch erniedrigt. So war in der *pmt2/PMT2*-Mutante das *PMT6*-Transkript nicht vorhanden und in der *pmt6*-Mutante wurde der *PMT1*-Transkriptspiegel auf ein Viertel des Wildtypwertes erniedrigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion einzelner *PMT*-Gene die Expression anderer *PMT*-Gene verursacht. Diese Regulation ist unabhängig von der *PMT*-Unterfamilie und kann auch negativ sein.

**Abb. 8: relativer Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in *pmt*-Mutanten.** Der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene und des *ACT1*-Gens als Referenz wurde in jeder *pmt*-Mutante durch qPCR bestimmt. Der relative Transkriptspiegel (RTS) ist das Verhältnis des jeweiligen *PMT*-Transkripts zum *ACT1*-Transkript. Jeder Balken stellt eine biologische Probe dar, deren RTS durch drei technische Replikate bestimmt wurde. Die Punktlinie deutet das Transkriptniveau in dem Wildtyp-Stamm an. Die Skala ist wegen der unterschiedlichen Expression für jedes *PMT*-Gen anders. RTS-Werte wurden für den Wildtyp (CAF2-1) und die homozygoten Mutanten SPCa2 (*pmt1*), SPCa6 (*pmt4*), SPCa10 (*pmt5*), SPCa8 (*pmt6*), sowie den heterozygoten *pmt2/PMT2*-Stamm SPCa4 bestimmt. Die Stämme wurden in YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-0,6$  wachsen gelassen und anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert. Die qPCR wurde mit spezifischen Primer für die *PMT*-Gene und *ACT1* durchgeführt.



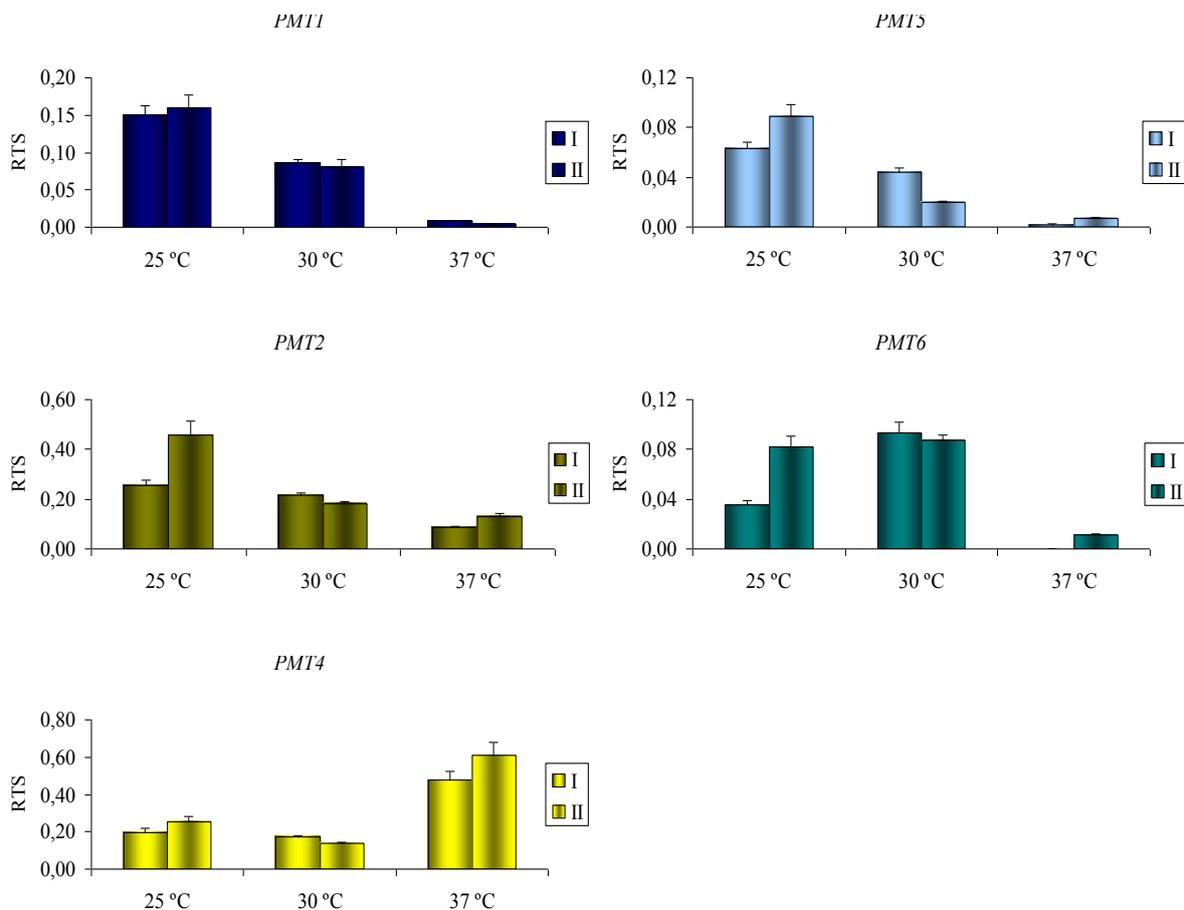
**Fig. 8: Transcrito relativo de los genes *PMT* en los mutantes *pmt*.** El transcrito de los genes *PMT* y el de *ACT1* (gen de referencia) se determinó mediante qPCR. Cada columna representa una réplica biológica, cuyo valor fue calculado a partir de tres réplicas técnicas. La línea de puntos señala el valor del transcrito relativo en la cepa control. La escala utilizada para cada gen es diferente, con la finalidad de permitir una mejor comparación de los valores en los mutantes. El transcrito relativo fue calculado en las cepas CAF2-1 (control), SPCa2 (*pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt6*), SPCa10 (*pmt5*) y SPCa8 (*pmt6*) crecidas en YPD a 30 °C hasta una densidad óptica entre 0,5 y 0,6. Posteriormente se extrajo el ARN y se llevó a cabo la qPCR con oligonucleótidos específicos para cada gen.

#### 4.1.2 Transkriptspiegel der *PMT*-Gene bei verschiedenen Wachstumstemperaturen

Bei *C. albicans* führt eine Erhöhung der Temperatur unter bestimmten Bedingungen (Nährstofflimitierung, neutraler pH, CO<sub>2</sub>-Erhöhung und Serum) zur Hyphenbildung (Shapiro *et al.*, 2009). Daher ist die Fähigkeit auf eine Temperaturerhöhung zu reagieren ein Virulenzfaktor von *C. albicans*. Die Identifikation der Gene, die unter verschiedenen Temperaturen exprimiert werden, gibt zahlreiche Informationen über die Virulenz- und/oder Resistenz-Mechanismen der pathogenen Pilze.

Um den Einfluss der Temperatur auf die *PMT*-Genexpression zu untersuchen, wurde der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene bei 25, 30 und 37 °C gemessen. Obwohl eine begrenzte Hyphenbildung bei 37 °C stattfand, blieben die Zellen hauptsächlich in der Hefeform. Die Zellen wurden in YPD-Medium (2 % Glukose) angezogen und es ist bekannt, dass eine hohe Glukose-Konzentration (> 0,5 %) bei *C. albicans* die Hyphenbildung reprimiert (Maidan *et al.*, 2005). Die *PMT1*- und *PMT5*-Transkriptspiegel sanken bei Temperaturerhöhung (Abb. 9). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die *PMT2*- und *PMT6*-Transkripte beobachtet werden. In diesem Fall blieben die Werte bei 25 und 30 °C in etwa konstant, aber sie verringerten sich bei 37 °C. Dagegen nahm der *PMT4*-Transkriptspiegel mit der Steigerung der Temperatur zu. Bei 37 °C war *PMT4* mit einem Transkriptwert von 0,4-0,6 das am höchsten exprimierte *PMT*-Gen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pmt1- und Pmt2-Unterfamilien bei niedrigen Temperaturen wichtig sind, während die Pmt4-Unterfamilie vorwiegend bei höheren Temperaturen benötigt wird.



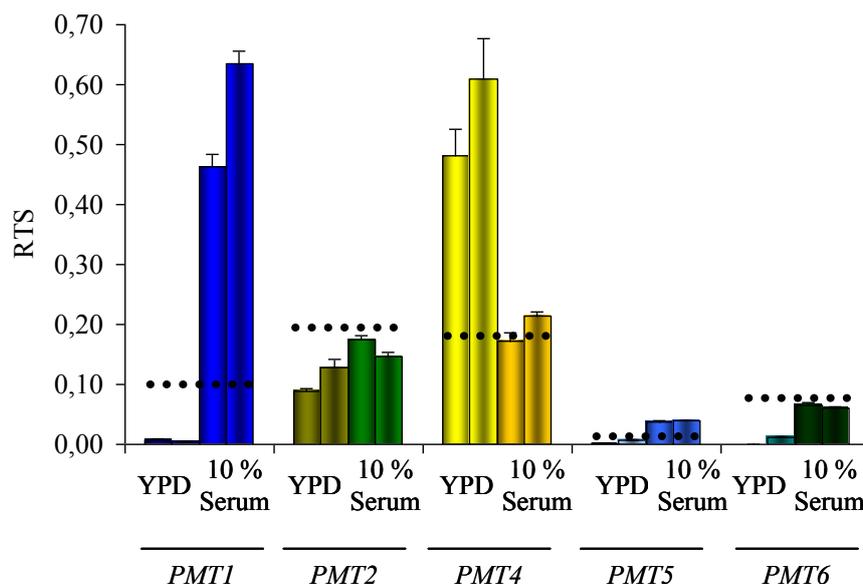
**Abb. 9: Relativer Transkriptspiegel der *PMT*-Gene bei zunehmender Temperatur.** Der Stamm CAF2-1 wurde in YPD-Medium bei  $OD_{600} = 0,1$  angezogen und für vier Stunden bei 25, 30 und 37 °C inkubiert. Wie in Abb. 8 beschrieben wurde die qPCR durchgeführt und die RTS berechnet.

**Fig. 9: Transcrito relativo de los genes *PMT* a diferentes temperaturas de incubación.** La cepa CAF2-1 se cultivó en YPD durante cuatro horas a 25, 30 y 37 °C. La qPCR y el cálculo de los valores de transcrito relativo se realizó como ya se ha descrito en la figura 8.

#### 4.1.3 Der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der Hyphenform

Die *pmt*-Mutanten sind unter bestimmten Bedingungen nicht mehr in der Lage zu filamentieren. Die *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten können auf Spider-Medium keine Hyphen ausbilden, während bei der *pmt6*-Mutante die Filamentierung eingeschränkt ist (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Der heterozygote *pmt2/PMT2*-Stamm zeigte in der Anwesenheit von Serum und GlcNAc oder in flüssigem Spider-Medium keine Defekte der Hyphenbildung, trotzdem war der morphologische Wechsel auf festen Spider- und Lee-Medien beeinträchtigt (Prill *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Pmt-Proteine für die Hyphenbildung notwendig sind. Der Transkriptspiegel der

*PMT1*-, *PMT2*-, *PMT4*- und *PMT6*-Gene während der Filamentierung war bereits durch Northern-Blotting untersucht worden, wobei keine bzw. nur eine schwache Korrelation zwischen der Expression der *PMT*-Gene und der Hyphenbildung gefunden worden war (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene bei der Hyphenform sollte hier nochmal unter anderen Bedingungen durch qPCR überprüft werden. Die Hyphenbildung wurde hierbei in YP-Medium mit 10 % Serum induziert und die Zellen nach zwei Stunden (100 % der Zellen in der Hyphenform) geerntet. Die qPCR-Analyse ergab, dass unter diesen Bedingungen der *PMT1*-Transkriptspiegel induziert wurde. Somit wird die Tendenz der Northern-Experimente (Timpel *et al.*, 1998) bestätigt. Die Werte für die *PMT2*- und *PMT5*-Gene zeigten eine leichte Erhöhung (Abb. 10). Der *PMT4*-Transkriptspiegel wurde dagegen erniedrigt. Die *Pmt1*-vermittelte *O*-Mannosylierung scheint wichtig für die Hyphenbildung zu sein. In Übereinstimmung mit dieser Theorie ist die *pmt1*-Mutante diejenige *pmt*-Mutante, deren Filamentierung am stärksten eingeschränkt ist.



**Fig. 10: Relativer Transkriptspiegel der *PMT*-Gene nach Hypheninduktion.** Die Zellen einer Übernachtskultur von Stamm CAF2-1 wurden geerntet, mit Wasser gewaschen und in 5 ml YP-Medium resuspendiert. Zellen wurden in 20 ml YP + 10 % Serum bei  $OD_{600} = 0,2$  suspendiert und zwei Stunden bei 37 °C wachsen gelassen. Der Transkriptspiegel in YPD-Medium bei 37 °C (Abb. 9) wird wieder dargestellt. Der Transkriptspiegel in YPD-Medium bei 30 °C (Abb. 9) wird durch die gepunktete Linie wiedergegeben.

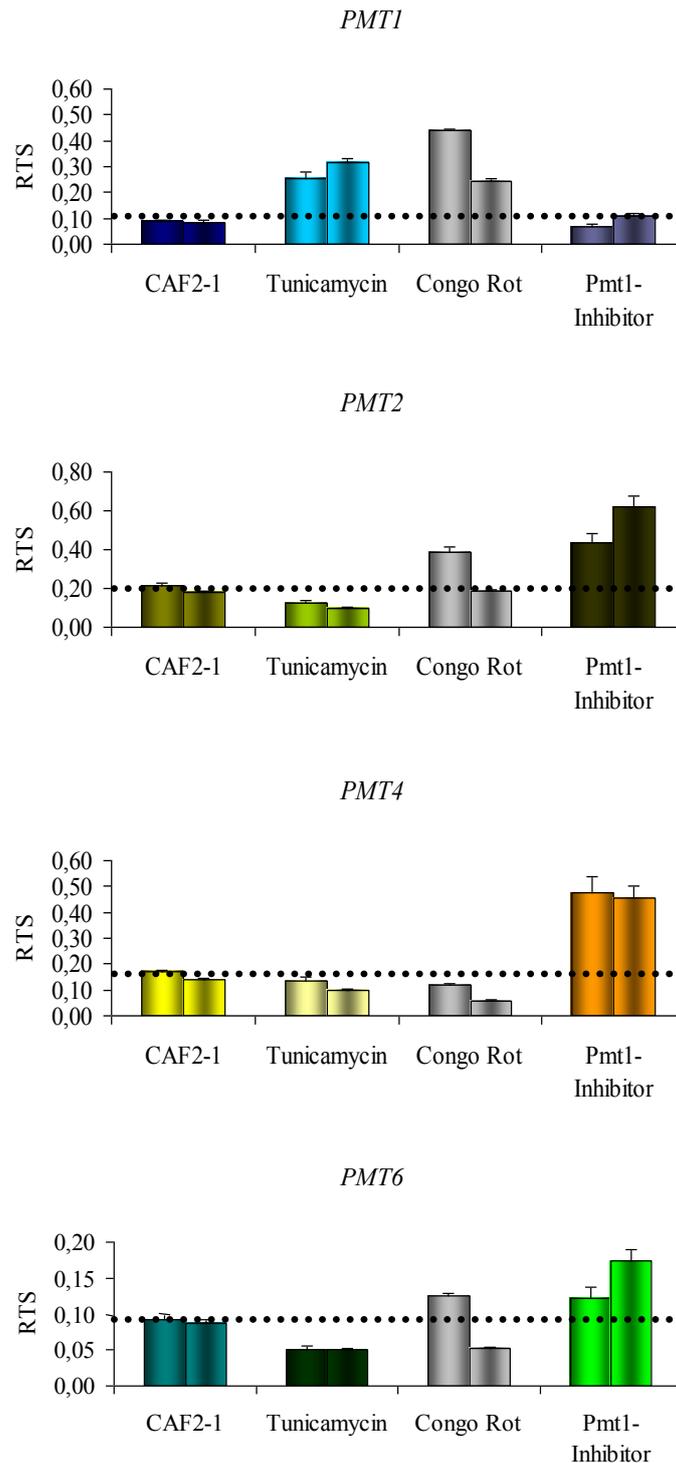
**Fig. 10: Transcrito relativo de los genes *PMT* después de la inducción de filamentación.** Las células de un preinóculo de la cepa CAF2-1 fueron recogidas, lavadas y resuspendidas en 5 ml de YP. 20 ml de YP + 10 % suero se inocularon a una  $OD_{600}$  de 0,2 y se incubaron a 37 °C durante dos horas. El transcrito relativo en YPD a 37 °C (Fig. 9) se ha vuelto a representar. La línea discontinua señala el transcrito de los genes *PMT* a 30 °C (fig. 9).

Aus den Ergebnissen der Hypheninduktion und des Wachstums bei zunehmender Temperatur lässt sich außerdem schließen, dass bei 37 °C *PMT4* das höchste exprimierte *PMT*-Gen ist, wenn die Zellen hauptsächlich in der Hefeform wachsen, während es *PMT1* ist, wenn die Zellen in der Hyphenform wachsen.

#### **4.1.4 Der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in Anwesenheit von Tunicamycin, Congo Rot und dem Pmt1-Inhibitor**

Die *pmt*-Mutanten zeigten Sensitivitäten gegen verschiedene Zellwand-destabilisierende Agenzien (Prill *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob diese Inhibitoren die Transkriptspiegel der *PMT*-Gene beeinflussen, wurden diese nach der Behandlung mit Tunicamycin (2 µg/ml), Congo Rot (125 µg/ml) und dem Pmt1-Inhibitor (4 µM) durch qPCR bestimmt.

- Tunicamycin ist ein von *Streptomyces* sp. synthetisiertes Struktur analog des UDP-GlcNAc, das das Enzym GlcNAc-1-Phosphotransferase (Alg7) und somit den ersten Schritt in der Synthese des *N*-Oligosaccharid-Vorläufers inhibiert (Pierce *et al.*, 2009; Dudgeon *et al.*, 2008). Die Zugabe von Tunicamycin hemmt die Proteinfaltung im ER (Travers *et al.*, 2000) und die resultierende Anhäufung von ungefalteten Proteinen aktiviert den „unfolded protein response“ (UPR)-Weg (Bonilla *et al.*, 2002).
- Der Pmt1-Inhibitor ist ein Rhodanine-3-Essigsäure Derivat, das die Aktivität von Pmt1 *in vitro* hemmt und zu Phänotypen einer *pmt1*-Mutante führt (z.B. Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum G418) (Orchard *et al.*, 2004). Das Wachstum einer *pmt4*-Mutante wird durch den Inhibitor blockiert, in Übereinstimmung mit der Letalität der *pmt1 pmt4*-Doppelmutante (Prill, 2004).
- Congo Rot ist ein Farbstoff, welcher mit der Synthese von  $\beta$ -1,3-Glukan interferiert (Kopecká & Gabriel, 1992) und auch die Chitin-Biosynthese inhibiert (Roncero & Durán, 1985).



**Abb. 11: Relativer Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der Anwesenheit von Glykosylierungs- und Zellwand-destabilisierenden Agenzien.** Der Stamm CAF2-1 wurde in YPD-Medium bei 30 °C und 2 µg/ml Tunicamycin, 125 µg/ml Congo Rot und 4 µM Pmt1-Inhibitor wachsen gelassen. Die Zellen wurden nach vier Stunden geerntet und der Transkriptspiegel wurde bestimmt wie in Abb. 8 beschrieben. Die Punktlinie deutet das Transkriptniveau der unbehandelten Kontrolle an.

**Fig. 11: Transcrito relativo de los genes *PMT* en presencia de compuestos que alteran la glicosilación y la pared celular.** La cepa CAF2-1 se inoculó en YPD con 2 µg/ml de tunicamicina, 125 µg/ml rojo Congo y 4 µM del inhibidor de Pmt1. Las células se recogieron después de cuatro horas de incubación a 30 °C. La línea punteada señala los valores del control.

Das *PMT1*-Gen wurde in der Anwesenheit von Tunicamycin und Congo Rot induziert, dagegen verursachte der Pmt1-Inhibitor in der verwendeten Konzentration keine Veränderung des *PMT1*-Transkriptspiegels (Abb. 11). Obwohl die Transkriptwerte der Congo Rot-behandelten biologischen Replikat numerisch nicht miteinander übereinstimmten, zeigten sie das gleiche Regulations-Profil. Das bedeutendste Ergebnis dieser Messungen war die Erhöhung der *PMT2*- und *PMT4*-Transkriptspiegel im Wildtyp-Stamm nach Behandlung mit dem Pmt1-Inhibitor (Abb. 11). Dies bestätigt die Erhöhung des *PMT2*-Transkripts in der *pmt1*-Mutante (Abb. 8). Andererseits deutet dieses Ergebnis eine unterschiedlich starke Regulation für das *PMT4*-Gen an, je nachdem ob die Pmt1-Hemmung kurzfristig (Inhibitor) oder langfristig (*pmt1*-Mutante) erfolgt. Da die *pmt1 pmt4*-Doppelmutante synthetisch letal ist, könnten Pmt1 und Pmt4 eine Rolle entweder in parallelen redundanten Wegen oder in demselben essentiellen Weg spielen (Tucker & Fields, 2003).

#### **4.1.5 Der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in Glykosylierungs- und Zellwandmutanten**

Es sollte geklärt werden, wie der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene reguliert wird, wenn weitere Schritte der *O*-Glykosylierung, *N*-Glykosylierung oder die Synthese von weiteren Zellwandbestandteilen blockiert werden. Im Golgi-Apparat werden die *O*-gebundenen Glykosylketten teilweise verlängert und die *N*-gebundenen Glykosylketten durch Prozessierung und Verlängerung modifiziert. Der Verlust der Glykosidasen und Transferasen, die diese Schritte katalysieren, führt zu einer Abschwächung der Virulenz, langsamerem Wachstum, Änderungen der Zellwand, erhöhter Sensitivität gegenüber Zellwand-destabilisierenden Agenzien und verzögerter Filamentierung (Mora-Montes *et al.*, 2009).

Der *PMT*-Transkriptspiegel wurde in *alg5*-, *chs7*-, *gdal*-, *mnt1*- und *och1*-Mutanten untersucht:

- *ALG5* kodiert für eine Dolichol-P- $\beta$ -Glukosyltransferase, die sich in der ER-Membran befindet. Alg5 überträgt die Glukose aus UDP-Glc auf Dolichol-P. Dol-P-Glc wird dann in das ER-Lumen transloziert und stellt Glukose-Moleküle bereit, die an den *N*-Glykosylkern gebunden werden.
- *CHS7* kodiert für ein Protein, welches den Transport der Chitinsynthase Chs3 aus dem ER reguliert. Chs3 synthetisiert die größte Chitin-Menge der Zellwand

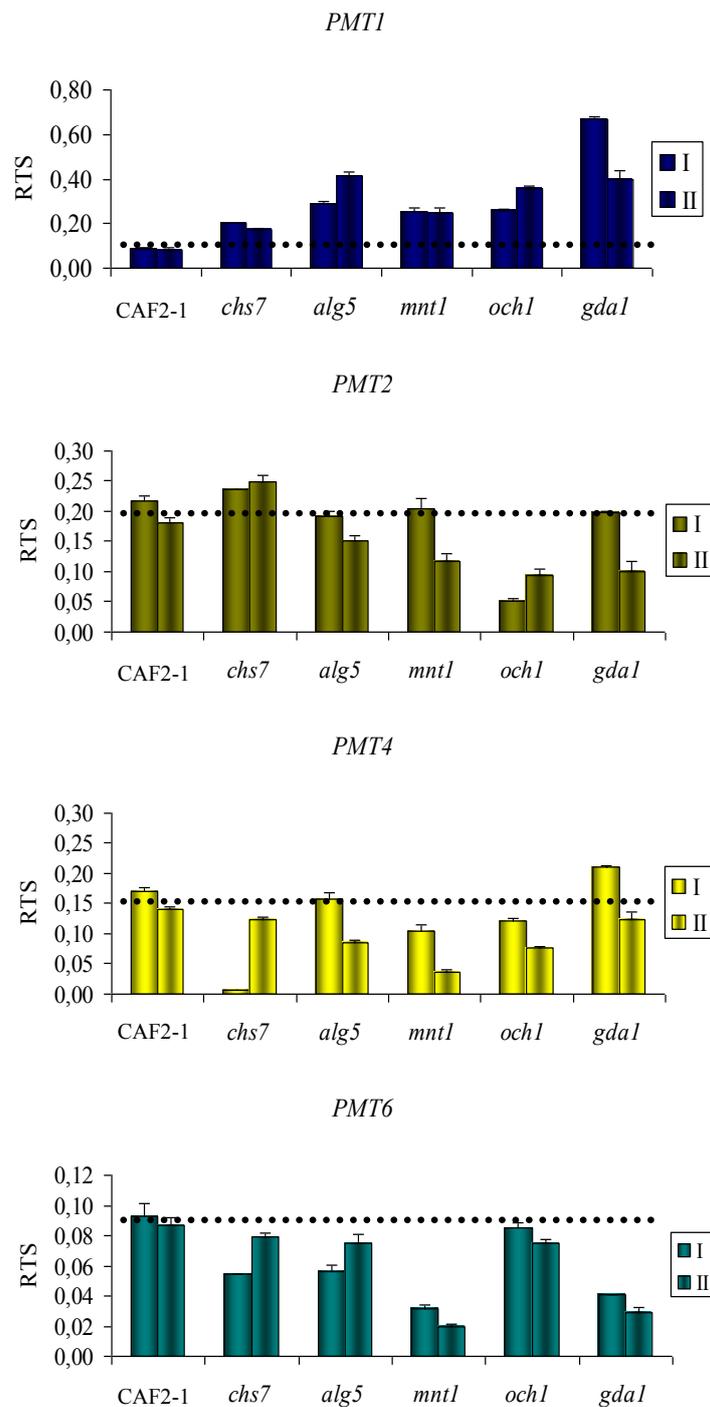
(Sanz *et al.*, 2005). Die *chs7*-Mutante zeigt bis 25 % weniger Chitin sowohl in der Hefeform als auch in der Hyphenform und auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Nikkomycin.

- *GDA1* kodiert für ein im Golgi lokalisiertes Typ II-Membranprotein. Im Golgi-Apparat werden die Glykosylierungsketten mit GDP-Man als aktiviertem Zucker verlängert. Das resultierende Nebenprodukt GDP wird durch *Gda1* in GMP und  $P_i$  gespalten. Anschließend wird das entstehende GMP im Austausch gegen GDP-Man ins Cytosol aus dem Golgi transportiert.

Die *C. albicans gda1*-Mutante ist lebensfähig und zeigt eine teilweise Blockierung der *O*-Glykosylierung aber nicht der *N*-Glykosylierung. Außerdem wird die Hyphenbildung unter einigen Induktionsbedingungen verhindert (Herrero *et al.*, 2002).

- *MNT1* kodiert für eine  $\alpha$ 1,2-Mannosyltransferase, die das zweite Mannose-Molekül der *O*-Glykosylkette hinzufügt. Es handelt sich um ein Typ II-Membranprotein, welches sich in dem medialen Kompartiment des Golgi-Apparats befindet. Die Deletion des Gens führt zu einer Verringerung der Adhäsion an Epithelzellen und reduzierter Virulenz in einem Mausmodell einer systemischen Kandidose (Buurman *et al.*, 1998).
- *OCH1* kodiert für eine  $\alpha$ 1,6-Mannosyltransferase, welche eine Mannose an den *N*-Oligosaccharidkern im Golgi anheftet und dadurch die Synthese der „äußeren Ketten“ einleitet. Die *och1*-Mutante zeigt Zellwanddefekte und bildet Aggregate. In der Mutante kommt es wegen verkürzter *N*-Glykosylierung zu einer Erhöhung der Chitin- und Glukangehalte der Zellwand. Obwohl die Deletion die Virulenz des Pilzes verringert, kann die Mutante noch Wirtsorgane kolonisieren (Bates *et al.*, 2006).

Transkriptanalysen der *PMT*-Gene zeigen in den beschriebenen Mutanten zum Teil deutliche Veränderungen (Abb.12). Das *PMT1*-Gen wurde in allen Mutanten induziert und bestätigt das obige Ergebnis (Abschnitt 3.1.4), dass Zellwand-Inhibitoren *PMT1* induzieren. Das *PMT2*-Gen zeigte dagegen ähnliche Transkriptwerte in fast allen untersuchten Mutanten. Der Transkriptspiegel von *PMT2* war dennoch niedriger in der *och1*-Mutante, wie auch in Anwesenheit von Tunicamycin (Abschnitt 3.1.4), was andeutet, dass eine korrekte *N*-Glykosylierung die Expression von *PMT2* stimuliert.



**Abb. 12: Relativer Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in einigen Glykosylierungs- und Zellwandmutanten.** Zellen des Kontrollstamms (CAF2-1) und von homozygoten Mutanten *chs7* (CRM695), *alg5* (NAC4), *mnt1* (NGY24), *och1* (NGY357) und *gdal* (BAB3) wurden in YPD-Medium bei 30 °C vier Stunden wachsen gelassen. Der Transkriptspiegel wurde bestimmt wie in Abb. 8 beschrieben. Die Punktlinie deutet das Transkriptniveau in dem Kontrollstamm an.

**Fig. 12: Transcrito relativo de los genes *PMT* en mutantes de glicosilación y pared celular.** Las cepas CAF2-1, CRM695 (*chs7*), NAC4 (*alg5*), NGY24 (*mnt1*), NGY357 (*och1*) y BAB3 (*gdal*) se inocularon en YPD y las células se recogieron tras cuatro horas de incubación a 30 °C. El transcrito relativo se calculó conforme a lo descrito en la figura 8. La línea de puntos señala el valor del caso control.

Der Transkriptspiegel des *PMT4*-Gens wurde in den Mutanten, außer in der *gdal*-Mutante, nur leicht erniedrigt, während das *PMT6*-Transkript in den *gdal*- und *mnt1*-Mutanten reprimiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die *PMT1*-Expression immer positiv reguliert wird, wenn Glykostrukturen bzw. die Zellwand gestört werden, während alle andere *PMT*-Gene einen signifikanten Regulationseffekt nur unter spezifischen Bedingungen zeigen.

## 4.2 Untersuchungen zur Regulation der *PMT*-Gene auf Promotorebene

Transkriptspiegel werden einerseits durch regulatorische Sequenzen der Promotorbereiche (*cis*-Elemente) bestimmt. Daneben wird die Initiation der Transkription auch auf anderen Ebenen reguliert, wie z.B. durch *trans*-Elemente, Regulatoren und Restrukturierung des Chromatins.

Um die Regulation der *PMT*-Gene auf der Promotorebene zu untersuchen, wurde 1 kb des Promotorbereiches der Gene für die Isoformen *Pmt1*, *Pmt2* und *Pmt4* stromaufwärts der Reportergene *RLUC* bzw. *lacZ* kloniert. In Vorbereitung dieser Versuche wurde zuerst die Startstelle der *PMT1*-, *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte identifiziert. Alle die folgenden numerischen Nukleotidstellen beziehen sich auf das ATG des *PMT* ORFs, wobei die stromaufwärts liegenden Nukleotide mit -1, -2 usw. bezeichnet wurden.

### 4.2.1 Sequenzanalyse der intergenischen Region stromauf- und stromabwärts der *PMT*-Gene

Intergenische Bereiche kodieren für essentielle regulatorische Elemente, z.B. Promotoren und Terminatoren, die wichtig für die Initiation und Termination der Transkription eines Gens sind. Gleichzeitig verhindern sie, dass die Expression eines Gens mit derjenigen eines Nachbargens interferiert (Williams *et al.*, 2005). Die intergenischen Bereiche können in Eukaryoten sehr lang sein, bei *C. albicans* hat z.B. der Promotorbereich des *EFG1*-Gens eine Länge von 10 kb (Tebarth, 2001).

Die theoretische non-kodierende Region stromauf- und stromabwärts der *PMT*-Gene wurde der *Candida* Genome Database ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)) entnommen. Die Suchergebnisse werden in den Tabellen 2 und 3 dargestellt. In der Regel gibt es in *Candida* keine Überlappung von Promotorbereichen und/oder offenen Leserahmen (ORFs), obwohl Ausnahmen nachgewiesen sind (Gerads & Ernst, 1998). Die

intergenischen Regionen stromaufwärts des ORFs von *PMT1*, *PMT5* und *PMT6* sind relativ lang, während sie bei *PMT2*- und *PMT4*-Genen kurz sind. Nur 333 bp liegen zwischen dem *PMT2* ORF und dem stromaufwärts gelegenen *ORF19.6813*, welcher in Assembly 21 der *Candida* Genome Database als unbekanntes Leseraster bezeichnet wird. Die intergenische Region stromaufwärts des *PMT4* ORF ist nur 369 bp lang. Es wird stromaufwärts durch *ORF19.4110* flankiert. Dieser ORF wurde bei *C. albicans* noch nicht charakterisiert; die höchste Homologie besteht zu dem *MLPI*-Gen von *S. cerevisiae*, das für ein Myosin-ähnliches Protein kodiert, das am Kernimport und – export beteiligt ist.

Gen	Chr	5' Inter. Region/ bp	Starstelle der mRNA/ nt	ATG Umgebung ANNATGN GNNATGR	TATA-Box	A/T Gehalt/ %	C/G Gehalt/ %	5' Gen
<i>PMT1</i>	7	2491	-191, -7	ATTATGG	-(-43, -109)	70,60	29,40	<i>ORF19.5170</i> ( <i>ENA21</i> )/-
<i>PMT2</i>	3	333	-69	ATAATGT	-	70,27	29,73	<i>ORF19.6813</i> /+
<i>PMT4</i>	2	369	-42	AACATGT	-	69,11	30,89	<i>ORF19.4110</i> /+
<i>PMT5</i>	R	1901	-90/-70	GTCATGA	-	68,33	31,67	<i>ORF19.7550</i> ( <i>IFA14</i> )/+
<i>PMT6</i>	4	2029	-113	ACAATGG	-	68,11	31,89	<i>ORF19.3803</i> ( <i>MNN22</i> )/-

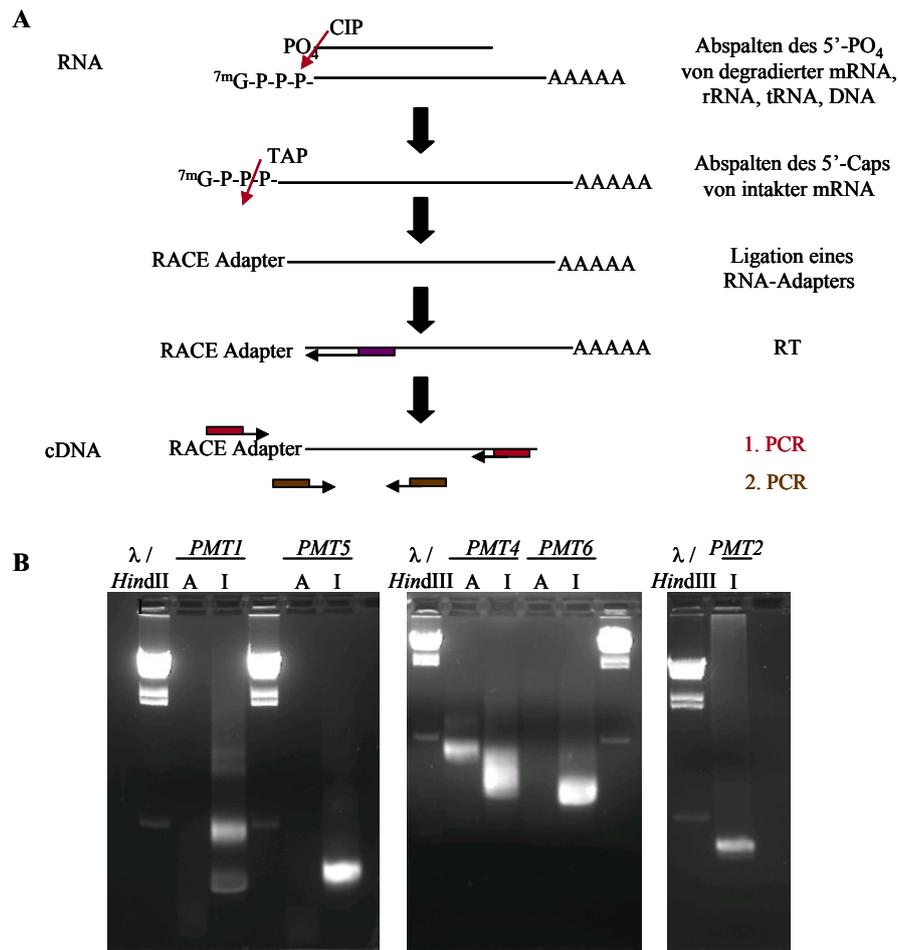
**Tabelle 2:** Eigenschaften der 5'-intergenischen Region der *PMT*-Gene. Chr: Chromosom. Die Richtung des stromaufwärts offenen Leserasters wird mit – (Gegenrichtung zum *PMT*-Gen) oder + (gleiche Richtung wie das *PMT*-Gen) bezeichnet.

Gen	3' Inter. Region/ bp	A/T Gehalt/ %	C/G Gehalt/ %	3' Gen
<i>PMT1</i>	1182	68,87	31,13	<i>ORF19.5172</i> ( <i>LIP9</i> )/+
<i>PMT2</i>	408	74,76	25,24	<i>ORF19.6811</i> /+
<i>PMT4</i>	311	72,99	27,01	<i>ORF19.4107</i> /+
<i>PMT5</i>	48	62,50	37,50	<i>ORF19.7548</i> /-
<i>PMT6</i>	2445	67,77	32,23	<i>ORF19.3801</i> ( <i>FAVI</i> )/+

**Tabelle 3:** Eigenschaften der 3'-intergenischen Region der *PMT*-Gene. Die Richtung des stromabwärts offenen Leserasters wird mit – (Gegenrichtung zum *PMT*-Gen) oder + (gleiche Richtung wie das *PMT*-Gen) bezeichnet.

#### 4.2.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der *PMT*-Gene

Mittels der 5'RACE-Methode (FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE; Ambion) wurde die 5'-Startstelle der *PMT*-Transkripte bestimmt. Hierbei wurde Gesamt-RNA isoliert und mit dem Enzym CIP behandelt, um die freien Phosphat-Gruppen von degradierter RNA usw. abzuspalten. Anschließend wurde die intakte mRNA mit dem Enzym TAP behandelt, um die CAP-Struktur zu entfernen. An das zurückgebliebene 5'-Monosphosphat wurde eine Adaptorsequenz ligiert und durch Reverse Transkription cDNA synthetisiert. Zuletzt wurde eine geschachtelte ("nested") PCR durchgeführt, um die Amplifizierung von falschen Produkten zu verringern (Abb. 13). Die Produkte der ersten und zweiten PCR wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 13). Die Produkte der ersten PCR waren nicht sichtbar, während die Produkte der zweiten PCR gereinigt und in den Vektor pMOS*blue* kloniert wurden. Es wurden mehrere Klone jedes PCR-Produkts sequenziert. Für das *PMT1*-Gen wurden zwei Startstellen nachgewiesen, bei nt -191 und nt -7 (Abb. 14). Für das *PMT2*-Gen wurde ein Startpunkt bei nt -69 nachgewiesen (Abb. 16). Eine der Sequenzen ist identisch mit der Datenbank-Sequenz, während die andere zwei Basen-Unterschiede aufweist, die eventuell durch einen PCR- oder Sequenzierungsfehler zustande gekommen sind. Das *PMT5*-Gen zeigte zahlreiche Initiationspunkte bei dem nt -90/-70 (Abb. 15). Für die *PMT4*- und *PMT6*-Transkripte wurde nur ein Klon, der mit der Datenbanksequenz übereinstimmt, gewonnen. Die Startstellen sind nt -42 bzw. -113 (Abb. 16).



**Abb. 13: PCR-Produkte der 5'RACE-Amplifikation.** Die 5'UTR-Region der *PMT*-Gene wurde mithilfe eines kommerziellen Kits (First Choice® RLM-RACE kit, Ambion) bestimmt. Der Stamm CAF2-1 wurde auf YPD-Medium bei 30 °C für vier Stunden wachsen gelassen. **A.** Schematische Darstellung der 5'RACE-Methode. Nach der Isolation der gesamten RNA und Abspaltung des 5'-Caps wurde eine Adapter-Sequenz an das freie Monophosphat ligiert. Es erfolgte eine Reverse Transkription. Die entstehende cDNA wurde als Template für die PCR mit Adapter- und Gen-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt (siehe Abschnitt 3.8.11). **B.** 10 µl jeder PCR wurden auf ein 2 %igen Agarosegel aufgetragen. Die Produkte der zweiten PCR wurden ausgeschnitten, gereinigt und in den pMOS*Blue* Vektor kloniert. Mindestens drei positive Klone wurden sequenziert. "A" steht für die äußere PCR und "I" für die innere PCR.

**Fig. 13: Productos obtenidos por PCR a partir de amplificación mediante 5'RACE.** La región 5'UTR de los genes *PMT* se determinó con el kit First Choice® RLM-RACE de Ambion. La cepa CAF2-1 se incubó en YPD a 30 °C durante cuatro horas. **A.** Esquema del proceso. Se extrajo el ARN total y se eliminó la estructura 5'-Cap. En el subsiguiente grupo monofosfato libre se ligó una secuencia adaptadora. Se sintetizó el cDNA que se utilizó como templado para la PCR con oligonucleótidos específicos de unión al adaptador y al gen (apartado 3.8.11). **B.** Se cargaron 10 µl de cada PCR en un gel de agarosa al 2 %. El producto de la primera PCR normalmente no es detectable, aunque en el caso de *PMT4* se observa una banda. El producto de la PCR anidada fue limpiado y clonado en el vector pMOS*Blue*. Al menos se secuenciaron tres clones. A señala la PCR externa e I la PCR interna.

```

-300 AAAGGACAAC TCATTCTTCT ATTGTTGGTT GGTTTGTCT ATTTTATTAT
-250 TATATCTTAA TTTTTTTTTT TTTTCGTTC AAGATTCTTT TTCAAGATTT
-200 TTCATTTTTT → AACCAACCA CCAACCA CAACCAAC TATAACAAT
-150 TGATATAGCA TTATCTTTTA AGATTATTGA ATAAAGGTCA ATTTATA GCG
-100 CCCCCCCTT CCACTTCCAC CTCCTACCGT CTTTCTTTCA CGCAACTAAA
-50 ACAA TTTT ATATTTTAT TTTTATTTT ATTTTAGTTT CCCATTCAAT

```

**Abb. 14: Kartierung der *PMT1*-Transkriptionsstartstelle.** Die Pfeile markieren die Startstellen des Haupttranskripts und des Nebentranskripts. Die schwarzen Rahmen bezeichnen das “CAACCA” Motiv. Die TATA-Boxen werden mit einem grünen Rahmen (TATAWAWR), gelben Rahmen (TATAAA) und lila Rahmen (TATAAAWW) signalisiert. Die TATA-Boxen befinden sich innerhalb des langen Transkripts, sie könnten aber von Bedeutung für das kurze Transkript sein.

**Fig. 14: Mapa del inicio de transcripción de *PMT1*.** Las flechas indican los puntos de comienzo del ARNm. Los recuadros en negro enmarcan el motivo “CAACCA”. Las cajas TATA han sido rodeadas por marcos de colores: verde (TATAWAWR), amarillo (TATAAA) y morado (TATAAAWW). Éstas se encuentran dentro del transcrito más largo, sin embargo podrían ser importantes para el transcrito corto.

```

-200 GTCATTTGTC ATTTGTTATT TGTAGTTGTG GTTGTGTTGG AACTTGGCTT
-150 AGGTCTTCTA GTGTCAAAAA TTGGATTTTT TTTTCGTGGTC GTTCAAAT
-100 TTTCAACCCA AGACAACAAC AACCAACCAAT TACAACCAAT TACAACCACT
-50 CCCCTATATC TTTATTGTCT AGATTAAGTT ACTACACTAA GTTGATTGTC

```

**Abb. 15: Kartierung der *PMT5*-Transkriptionsstartstelle.** Die Pfeile markieren die Startstellen der mRNA. Die Rahmen zeigen das “CAACCA” Motiv.

**Fig. 15: Mapa del inicio de transcripción del gen *PMT5*.** Las flechas indican los puntos de inicio del ARNm. Los recuadros negros enmarcan el motivo “CAACCA”.

*PMT2*-Promotorregion

```

-200 GTGTTCACTT ACATTTATTT GCTTATGAGC CTAGGCGTTA TTTTTTTTTT
-150 CTCTCTCTCT CCCACTTTCT ACTCTTTGAA CAATGTGGTG AAAAAAAAAA
-100 AAAATAGAAC CAGATCTTTT TTATTCCATA TATTTCAAAA CCGACTTGTT
-50 TCTTTTTTTC TTTTACAACC AATTAATACA AAAGAAAGAC AACATCATA

```

*PMT4*-Promotorregion

```

-200 TTTGGTTTAC GTGTTGTGTT TTCGCATTGT CTGATAAAAC ACACACTGAA
-150 ATTTTTTTTC TGAAAACTC TCTCTCCAAA TAATATAATA TAGATCTCCA
-100 CCATTCTTGT TACTTCTTTC TTTTTAATT TGTTTTTCGT TTTTCGTTTT
-50 CTTCAACTGT CCAATTCCTT CACGATTGAG TTGTGTCAAT TCTAGTAAAC

```

*PMT6*-Promotorregion

```

-200 ▲TTCCTTCAGA ATTGCTTCAA CGCGAAAAAC TTGAAAAAAG GAGAAAACAC
-150 ATTGAAATCT TATACACCTG TCAAAC TAGA TAGATTCAAT CTCATTATTC
-100 CCGTTTGTTT CCCCTGTTT AGCATAGATA TCTTCTACGT CATTGAATCT
-50 TTCTATTTGA ACATCTTTCA AAAC TCAACA CCTAACCACT AATCCAAACA

```

**Abb. 16: Kartierung der *PMT2*-, *PMT4*- und *PMT6*-Transkriptionsstartstellen.** Die Pfeile markieren die Startstellen der mRNA. Das GATAA-Motiv wird mit einer dicken Linie unterstrichen. Bei *PMT6* gibt es ein GATAA-Motiv an der Stelle -211/-207 außerhalb des gezeigten Fragmentes. Es wird mit einem Dreieck signalisiert. **A.** *PMT2*-Transkriptionsstartstelle. **B.** *PMT4*-Transkriptionsstartstelle. **C.** *PMT6*-Transkriptionsstartstelle.

**Fig. 16: Mapa del inicio de transcripción de los genes *PMT2*, *PMT4* y *PMT6*.** Las flechas señalan el punto de inicio del ARNm. La caja GATAA ha sido subrayada con una línea gruesa. En la región promotora de *PMT6* hay otra caja GATAA en la posición -211/-207 que ha sido marcada con un triángulo. **A.** Punto de inicio del transcrito para *PMT2*. **B.** Punto de inicio del transcrito para *PMT4*. **C.** Punto de inicio del transcrito para *PMT6*.

Kürzlich wurden von Bajic *et al.* (2006) die Transkriptionsstartstellen (TSS) von Human- und Mäuse-Genen in 4 Gruppen unterteilt, die sich im Nukleotidininhalt unterscheiden. Die Berechnung des AT/GC Inhalts der 100 Nukleotide stromauf- und stromabwärts der Transkriptionsstartstellen der *PMT*-Gene ergab, dass sie zu der Gruppe D gehören und stromauf- als auch stromabwärts der TSS AT-reiche Bereiche besitzen (Tabelle 4).

Gen	Transkript	AT/GC Gehalt / % (-100)	AT/GC Gehalt / % (+ 100)	TSS Typ
<i>PMT1</i>	1	67/33	56/44	D
	2	80/20	65/35	D
<i>PMT2</i>		71/29	71/29	D
<i>PMT4</i>		73/27	58/42	D
<i>PMT5</i>	1	65/35	65/35	D
	2	62/38	66/34	D
	3	63/37	64/36	D
	4	64/36	66/34	D
	5	65/35	67/33	D
<i>PMT6</i>		70/30	65/35	D

**Tabelle 4:** Analyse der *PMT*-TSS nach Bajic *et al.* (2006). Die Transkripte sind nach der Länge der 5'-untranslatierten Region nummeriert.

*C. albicans* *PMT*-Gene haben keine TATA-Boxen, mit den Hefe-Konsensussequenzen TATAAA, TATAAAWW, TATAWAWR (Harbury & Struhl, 1989; Iyer & Struhl, 1995; Basehoar *et al.*, 2004; Tirosh *et al.*, 2007), aber nur ca. 20 % der Hefe-Gene besitzen eine TATA-Box, und diese werden als Stress-Antwort-Gene klassifiziert (Basehoar *et al.*, 2004). Während die TATA-Box bei höheren Eukaryoten konserviert ist, können bei Hefen vielfältige Promotorsequenzen die TATA-Box ersetzen. Einer dieser Sequenzen ist das GATA-Motiv. Bei *S. cerevisiae* zeigen NRC (nitrogen catabolite repression)-sensitive Gene zwei Transkripte, von denen eines durch eine GATA-Box, die als TATA-Ersatz auftritt, reguliert wird (Cox *et al.*, 2000). Eine GATA-Box erscheint bei *PMT4* stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle. Gene, die keine TATA-Box besitzen, verwenden für die Initiation der Transkription im Wesentlichen die sogenannte „Initiator“-Sequenz A(A-reich)<sub>5</sub>NYA(A/T)NN(A-reich)<sub>6</sub> (Pugh, 2001). Die „Initiator“-Sequenz befindet sich nicht an der Startstelle der Transkripte der *PMT*-Gene. Außerdem wurden andere spezifische DNA-Sequenzen bei einigen Genen identifiziert, wie zum Beispiel die Purin-reiche RRYRR-Sequenz, wobei Y die Startstelle des Transkriptes ist, oder TCRA, wo C und/oder R die Startstelle sind (Yang *et al.*, 2007).

Die Sequenzen der 5'UTR wurden mithilfe verschiedener Computer-Programme (bioinfo.rpi.edu/applications/mfold; www.tbi.univie.ac.at) analysiert. Die langen UTRs der *PMT1*- und *PMT6*-Gene enthalten keine kurzen ORFs (uORF), die bei einigen Translation-regulierten Hefegenen gefunden wurden (Vilela & McCarthy, 2003; Lawless *et al.*, 2009). Die 5'UTR der mRNA bildet auch nicht eine bedeutende Sekundärstruktur. Auffallend ist aber die Tatsache, dass ein gleiches Motiv sich genau am Anfang der *PMT1*- und *PMT5*-mRNA, die beide zu der Pmt1-Unterfamilie gehören, wiederholt. Dieses lautet „CAACCA“ (Abb. 14 und 15). Die Funktion dieser Sequenz bei der Transkription oder Translation ist unbekannt.

#### 4.2.3 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der *PMT*-Homologen bei *Yarrowia lipolytica*

Um festzustellen, ob das CAACCA-Motiv evolutionär konserviert wird, wurden *PMT*-Transkripte eines weiteren dimorphen Pilzes, *Y. lipolytica*, analysiert. Die *PMT*-Gene in *Y. lipolytica* wurden noch nicht beschrieben, aber aus dem Sequenzvergleich der *Candida* Pmt-Proteine zum *Y. lipolytica* Genom (Dujon *et al.*, 2004) wurden vier Homologe identifiziert.

*Y. lipolytica* ist ein dimorpher Pilz, der auf Alkanen als C-Quelle wachsen kann und der häufig für genetische Studien verwendet wird. *Y. lipolytica* degradiert und oxidiert sehr effizient hydrophobe Substanzen, wie z.B. Fettsäuren und Alkane. Sein Genom umfasst ca. 20.5 Mb und liegt auf sechs haploiden Chromosomen (A, B, C, D, E und F) und dem Mitochondrion. *Y. lipolytica* zeigt eine gut definierte Hefe-Hyphen Umwandlung und Gemeinsamkeiten mit filamentösen Pilzen (Dujon *et al.*, 2004; Manersberger & Nicaud, 2003; Domínguez, 2003).

Aufgrund der partiellen Sequenzidentität der Pmt-Proteine aus *C. albicans* zu den Translationsprodukten der ORFs des annotierten Genoms von *Y. lipolytica* (Dujon *et al.*, 2004) wurden vier Pmt-Homologe identifiziert (*PMT1* Homolog 1: YALI0E15081g; *PMT1* Homolog 2: YALI0D10549g; *PMT2* Homolog: YALI0C23364g; *PMT4* Homolog: YALI0E05929g). Der Stammbaum der pilzlichen Pmt-Proteine klassifiziert *Y. lipolytica* Pmt-Homologe jeweils in jeder Pmt-Unterfamilie, wobei das zweite Homolog der Pmt1-Familie eine größere phylogenetische Distanz aufweist und näher an das *S. cerevisiae* Pmt7 angeordnet ist (Daten werden nicht gezeigt).

*Y. lipolytica* Stamm SA-1 *MATB* wurde in YPD-Medium bei 28 °C bis zur logarithmischen Phase wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde wie bei *C. albicans* (Abschnitt 4.2.2) durch 5'RACE die Transkriptsstartstelle der *PMT*-Homologen bestimmt. Die erhaltenen PCR Fragmente wurden subkloniert und jeweils drei Klone sequenziert. Für die vier Gene wurden mehrere Startstellen identifiziert (Tabelle 5), wobei das CAACCA-Motiv lediglich am 5'-Ende des Transkripts des YALI0D10549g-Gens auftauchte (Abb. 17). Die Identifikation des „CAACCA“-Motives am Anfang der Transkripte von drei Genen, die zu der gleichen Unterfamilie in zwei verschiedenen Organismen gehören, lässt über eine regulatorische Funktion spekulieren.

<i>Y. lipolytica</i>	Chr	5' Interg. Region /bp	3' Interg. Region /bp	Startstelle des Transkripts /nt	ATG Umgebung ANNATGN GNNATGR	TATA-Box
<i>PMT1-1</i>	E	1464	168	-60, -35	ACAATGT	-
<i>PMT1-2</i>	D	1718	860	-119, -93, -92	AGCATGA	-
<i>PMT2</i>	C	1868	551	-29, -13	ACAATGG	-
<i>PMT4</i>	E	1013	1028	-20, -18	AAGATGG	-

**Tabelle 5:** Eigenschaften der intergenischen Regionen stromauf- und stromabwärts der *PMT*-Homologe bei *Y. lipolytica*. Chr: Chromosom, *PMT1-2*: zweite *PMT1*-Unterfamilie Mitglied.

In dem Promotorbereich der vier *PMT*-Gene konnte keine TATA-Box identifiziert werden. Das kürzere Transkript von YALI0E15081g enthält das RRYRR Motiv, während die Transkripte von YALI0D10549g und eines von YALI0C23364g die Konsensussequenzen TCAA bzw. TTGA tragen (siehe Anhang).

```

-200 CCGATCTCTA CACCCTTGTC AACTAGAGTT TAGGGAAATG CACAAGCGGG
-150 ATAGAGTTAA GTATCCAGAC CAAATATGGG T→GACGGCATC CGCGGGGGCT
-100 CTCTCTCAAC CAAGCCATAA AAGAGTCGGT AGTCCTGGAG AAAGACCAAA
-50 AAGAAGACGG ATTTGCAAAA GACCATTTTG GAGGCTCGCA CAACAACAGC

```

**Abb. 17:** Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des zweiten Mitglieds der *PMT1*-Unterfamilie (YALI0D10549g) bei *Y. lipolytica*. Die Pfeile markieren die durch 5'-RACE identifizierten Startstellen der mRNA. Der Rahmen bezeichnet das „CAACCA“ Motiv.

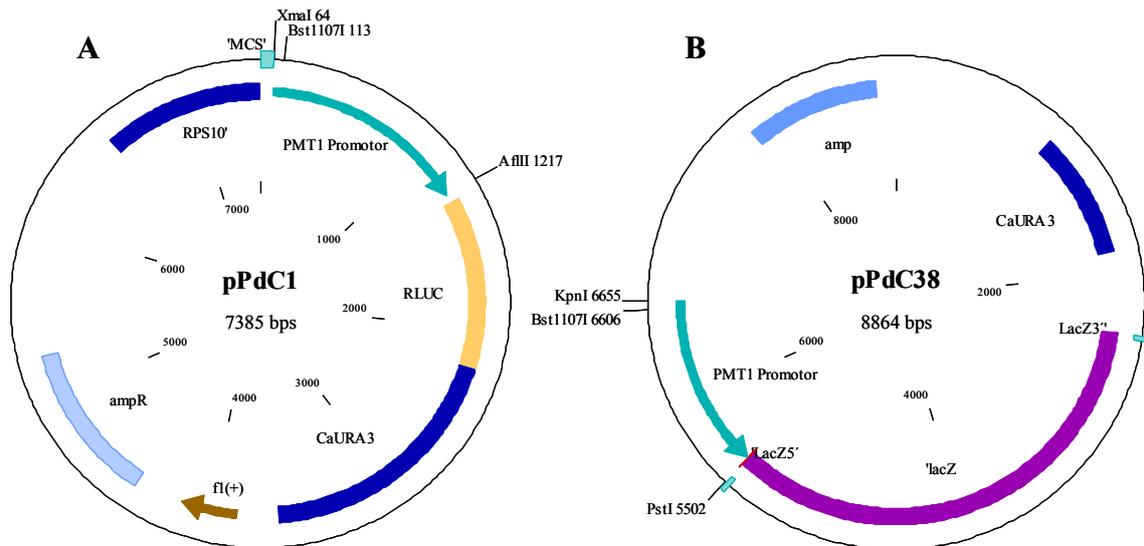
**Fig. 17:** Mapa del inicio de transcripción del homólogo *PMT1-2* (YALI0D10549g) en *Y. lipolytica*. Las flechas señalan el punto de inicio del ARNm. Recuadrado se encuentra el motivo „CAACCA“.

#### 4.2.4 Untersuchung des *PMT1*-Promotorbereiches mithilfe der *RLUC*- und *lacZ*-Reporter gene

Der *PMT1*-Promotorbereich -1147/-1 bp wurde durch genomische PCR amplifiziert und in die Plasmide pES2 (Schnittstellen *XmaI/AflII*) und pAU36 (Schnittstellen *KpnI/PstI*) kloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden pPdC1 respektive pPdC38 genannt (Abb. 18). pPdC1 trägt das *RLUC*-Reporter gen und bietet die Möglichkeit, sowohl in den *RPS10*-Locus als auch in den *PMT1*-Locus integriert zu werden. pPdC38 trägt das *lacZ*-Reporter gen aus *Streptococcus thermophilus* (Uhl & Johnson, 2001). Der *PMT1*-Promotor auf pPdC1 wurde durch Mutagenese PCR deletiert, so dass sieben Deletionen von ca. 100 bp entlang des Promotors konstruiert wurden (Abb. 19). Um den Startpunkt der ATG-nächsten Deletion Del1 bei -218 festzulegen, wurde der durch 5'-RACE bestimmte Startpunkt bei -191 nt vorausgesetzt (Abschnitt 4.2.2).

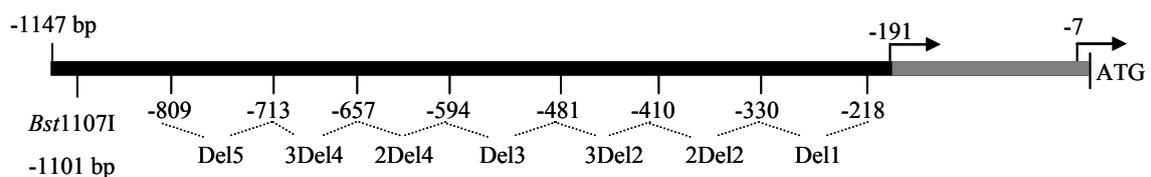
pPdC1, pPdC38 und auch die deletierten Plasmide wurden mit *Bst1107I* linearisiert und durch homologe Rekombination in den *PMT1*-Promotor integriert. Transformanten wurden nach einzelnen Plasmid-Integrationen mittels Southern-Blot untersucht (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der *PMT1*-Reporterfusionen basierte auf drei Fragen: a) da die *pmt1*-Mutante sensitiv gegen Zellwand-destabilisierende Substanzen ist: wirken diese direkt auf die *PMT1*-Expression und durch welche Sequenzen?, b) die *pmt1*-Mutante zeigte Defekte in der Hyphenbildung und es wurde durch qPCR bestimmt, dass das *PMT1*-Gen in Hyphen-induzierendem Medium (YP + 10 % Serum) überexprimiert wird (Abschnitt 4.1.3): können Promotorsequenzen identifiziert werden, die den *PMT1*-Promotor bei der Hyphenbildung regulieren? und c) die Analyse des *PMT1*-Transkripts in Glykosylierungs- und Zellwand-Mutanten zeigte, dass das *PMT1*-Gen immer überexprimiert wurde: kann dieses Ergebnis auf Promotorebene übertragen werden und durch welche Sequenzen?.



**Abb. 18:** *C. albicans*-Plasmide mit Fusionen des *PMT1*-Promotors und Reportergenen. **A.** Plasmid mit dem *RLUC*-Reportergen. Alle *PMT*-Promotorfragmente wurden an die Stellen *XmaI* und *AflII* des Plasmids mit dem Reportergen *RLUC* (pES2) kloniert. **B.** Plasmid mit dem *lacZ*-Reportergen. Die Promotorfragmente wurden hier an die Stellen *KpnI* und *PstI* des Plasmides pAU36 (Uhl & Johnson, 2001) kloniert. Die komplette Liste der Plasmide wird im Abschnitt 3.5 beschrieben.

**Fig. 18:** Esquema de los plásmidos con el promotor de *PMT1* y los genes chivatos *RLUC* y *lacZ*. **A.** Plásmido con el gen chivato *RLUC*. Todos los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *PMT* se clonaron en los sitios de corte *XmaI* y *AflII* en el plásmido con el gen chivato *RLUC* (pES2). **B.** Plásmido con el gen chivato *lacZ*. En este caso los sitios de corte de inserción de los fragmentos de los promotores fueron *KpnI* y *PstI*. El plásmido utilizado fue pAU36 (Uhl & Jonson, 2001). En el apartado 3.5 está descrita la lista completa de los plásmidos construidos.

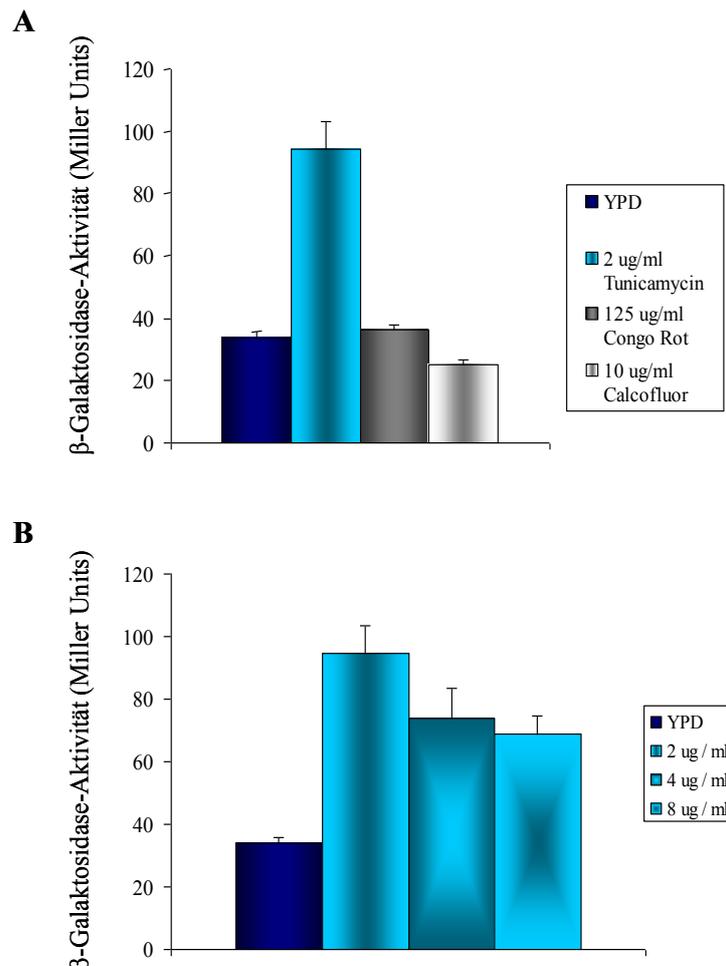


**Abb. 19:** Schema von Deletionen innerhalb des *PMT1*-Promotors. Durch Mutagenese-PCR wurden sieben Deletionsvarianten des *PMT1*-Promotors konstruiert. Die Nukleotidstellen beziehen sich auf das ATG (+1, +2 und +3) des kodierenden Gens. Die Pfeile markieren die Transkriptionsstartpunkte. Deletion Del1 entspricht Plasmid pPdC42, 2Del2: pPdC48, 3Del2: pPdC46, Del3: pPdC44, 2Del4: pPdC47, 3Del4: pPdC49 und Del5: pPdC45.

**Fig. 19:** Esquema de las deleciones llevadas a cabo sobre la región promotora del gen *PMT1*. Mediante mutagénesis dirigida se deleccionaron siete fragmentos de la región promotora de *PMT1*. Todas las posiciones se refieren al codón ATG (+1,+2 y +3) de inicio del gen. Las flechas indican los puntos de inicio de transcripción. Los plásmidos correspondientes son: Del1-pPdC42, 2Del2-pPdC28, 3Del2-pPdC46, Del3-pPdC44, 2Del4- pPdC47, 3Del4- pPdC49 y Del5-pPdC45.

#### 4.2.4.1 *PMT1*-Promotorregulation durch Zellwand-destabilisierende Substanzen

Transformanten mit der *PMT1p-lacZ* Promotorfusion wurden benutzt, um die Regulation des *PMT1*-Promotors durch Zellwand-destabilisierende Substanzen zu untersuchen. Die *pmt1*-Mutante ist sensitiv gegen die Zellwand-Inhibitoren Calcofluor White, Congo Rot, und den Inhibitor der *N*-Glykosylierung Tunicamycin (Prill *et al.*, 2005). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der PdCP1.L5-8 Transformanten in Anwesenheit der drei Substanzen wurde gemessen (Abb. 20).



**Abb. 20:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *PMT1p-lacZ* Fusion.** **A.** Plasmid pPdC38 (Abb. 19) wurde in Stamm CAI4 transformiert. Vier verschiedene Transformanten wurden in YPD-Medium ohne und mit Inhibitoren (2  $\mu$ g/ml Tunicamycin, 125  $\mu$ g/ml Congo Rot, 10  $\mu$ g/ml Calcofluor White) vier Stunden bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. **B.**  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *PMT1p-lacZ* Fusion in der Anwesenheit von zunehmenden Tunicamycin-Konzentrationen (2, 4 und 8  $\mu$ g/ml). Der Versuch wurde durchgeführt wie in A beschrieben.

**Fig. 20: Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la construcción *PMT1p-lacZ*.** **A.** El plásmido pPdC38 se integró en la cepa CAI4. Cuatro transformantes independientes fueron inoculados en YPD e YPD más 2  $\mu$ g/ml de tunicamicina, 125  $\mu$ g/ml de rojo Congo y 10  $\mu$ g/ml de calcoflúor y se incubaron a 30 °C cuatro horas. A continuación se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. **B.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la construcción *PMT1p-lacZ* en presencia de varias concentraciones de tunicamicina. La activación del promotor de *PMT1* también se determinó en presencia de 4 y 8  $\mu$ g/ml de tunicamicina. El experimento se llevó a cabo como en A.

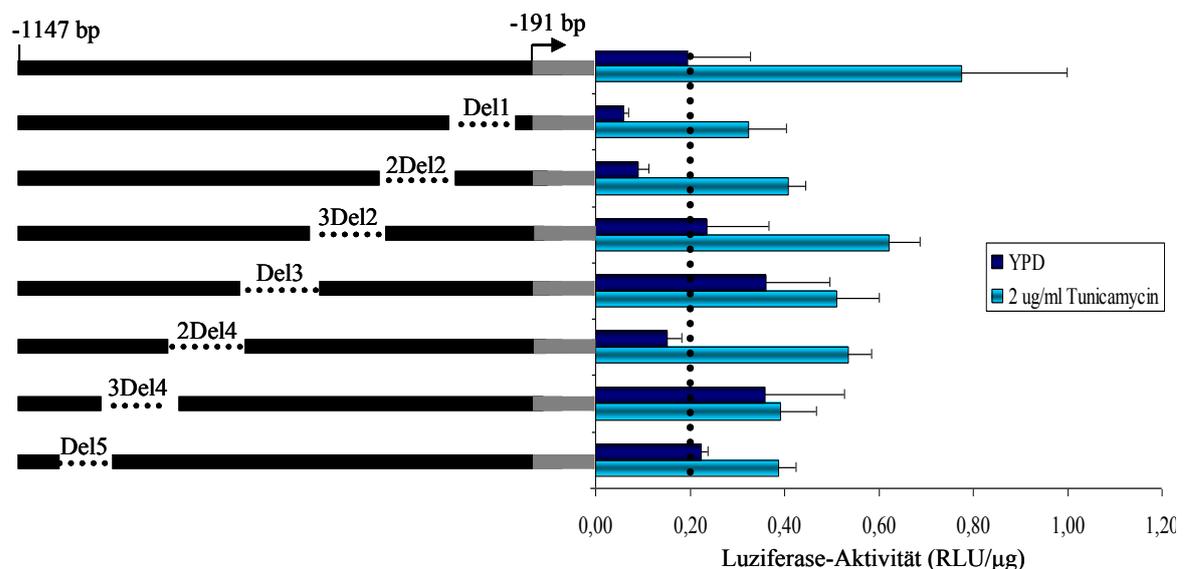
Eine deutliche dreifache Erhöhung der *lacZ*-Expression wurde nur beobachtet, wenn die Zellen mit Tunicamycin behandelt wurden, während Congo Rot oder Calcofluor keine Wirkung hatten. Um zu testen, ob die Promotoraktivierung abhängig von der Tunicamycin-Konzentration ist, wurden die Zellen auch bei höheren Konzentrationen (4 und 8 µg/ml) wachsen gelassen. Bei 4 und 8 µg/ml erniedrigten sich die  $\beta$ -Galaktosidasewerte leicht (Abb. 20). Möglicherweise weil die Zellen stark geschädigt wurden. Einzelhinweis hierauf ergaben die Bradford-Messungen, die eine erhöhte Konzentration an solubilisierten Proteinen zeigten.

#### 4.2.4.2 Regulation der *PMT1*-Promotordeletionen durch Tunicamycin

Mit den Promotordeletionen in pPdC1 wurde geprüft, ob die Promotorregulation durch Tunicamycin gestört ist. Hierbei wurde die Aktivität des *RLUC*-Reportergens in Abwesenheit und Anwesenheit von 2 µg/ml Tunicamycin gemessen (Abb. 21). In YPD-Medium (kein Tunicamycin) zeigten die Deletionen Del1 und 2Del2 eine niedrige Aktivierung im Vergleich zum nicht-deletierten Konstrukt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Initiation der Transkription in diesen Deletionen defekt ist. Dennoch war die Aktivierung durch Tunicamycin nicht betroffen. Die Deletionen 3Del2, 2Del4 und Del5 zeigten ungefähr die gleichen Aktivitätswerte wie der intakte 1147 bp Promotor und die Zugabe von Tunicamycin blieb ebenfalls erhalten. Die basalen Werte der Deletionen Del3 und 3Del4 waren dagegen ohne Inhibitor erhöht und die Zugabe von Tunicamycin veränderte diese erhöhte Reporter-Aktivität nicht im Vergleich zu der unbehandelten Probe (Abb. 21). Somit scheint im Promotorbereich, der in den Deletionen Del3 und 3Del4 fehlt, ein Repressor des Promotors zu binden, der bei Anwesenheit von Tunicamycin inaktiviert wird.

Die Suche nach bekannten Transkriptionsfaktor-Bindemotiven mit dem TRANSFAC Programm (Matys *et al.*, 2003; [www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) ergab 2 mögliche Bindemotive für bekannte Transkriptionsfaktoren in der Sequenz der 3Del4 Deletion (56 bp). Es wurden zwei Mig1-Bindestellen und eine Swi5-Bindestelle gefunden (Abb. 22). Da Mig1-Boxen sehr häufig vorkommen, wurden sie ausgeschlossen. Die Swi5-Box beinhaltete ein Mismatch. Die Swi5-Bindestelle kommt bei Promotoren von *PMT*-Genen einmal (-676 bp) im *PMT1*-Promotor, zweimal (-986 und -701 bp) im *PMT2*-Promotor, einmal (-915) im *PMT5*-Promotor und einmal (-95) im *PMT6*-Promotor vor, letztere allerdings innerhalb der 5'UTR. Ein Ace2-Motiv (*S. cerevisiae* Konsensussequenz TGCTGGT; Harbison *et al.*, 2004) überlappt teilweise die Swi5-Box

und *in vitro* binden Swi5 bzw. Ace2 an die gleiche DNA-Sequenz (Dohrmann *et al.*, 1996; Voth *et al.*, 2007). Diese zwei Transkriptionsfaktoren aktivieren in Abhängigkeit des Sequenz-Kontextes trotzdem teilweise verschiedene Gene. Dies ist dank weiterer negativ regulierender Elemente (NRE) möglich, an die die Proteine Fkh1 und Fkh2 binden und so die Swi5-Aktivierung von Ace2-regulierten Genen inhibieren (Dohrmann *et al.*, 1996).



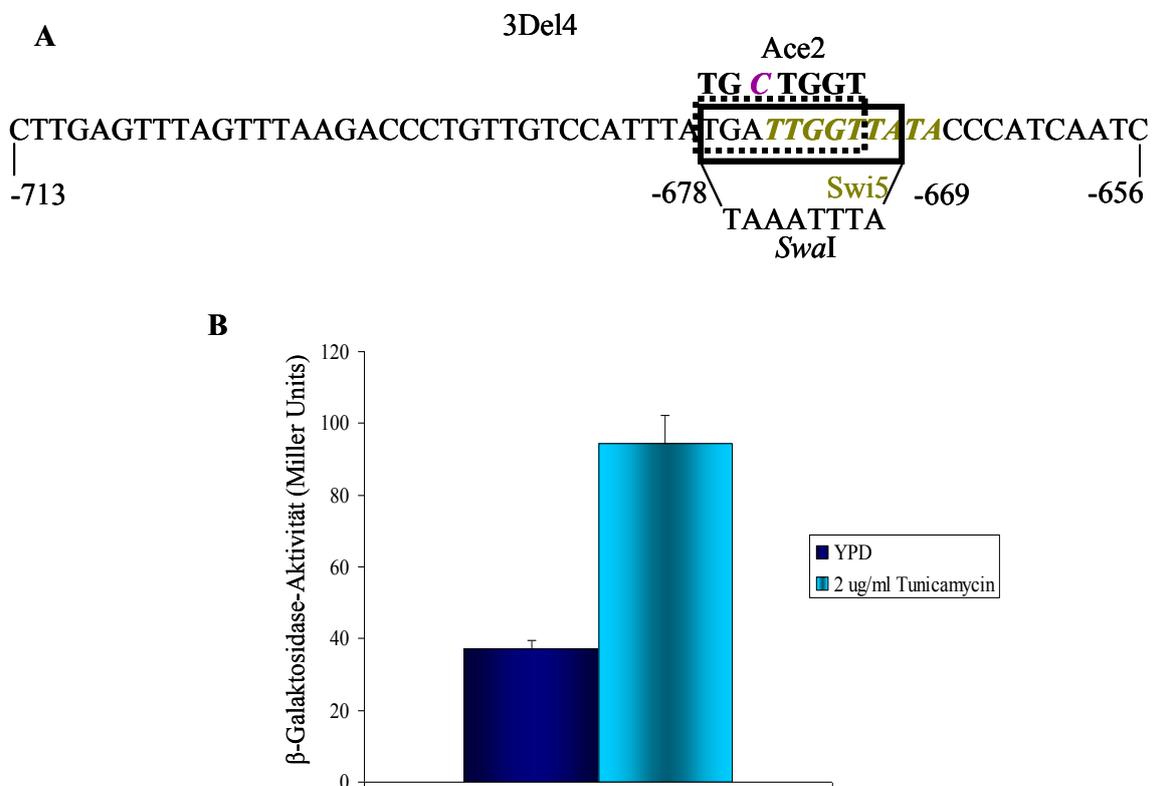
**Abb. 21: Luziferase-Aktivität der *PMT1p-RLUC* Fusionen.** Die Plasmide mit den Deletionsvarianten des *PMT1*-Promotors (Abb. 20) wurden in Stamm CAI4 an der Stelle *Bst*1107I stromaufwärts des *PMT1*-Locus integriert. 20 ml Kultur (YPD und YPD + 2 μg/ml Tunicamycin) wurden bei  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und vier Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, aufgeschossen und die Luziferase-Aktivität des Proteinextrakts und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 3.9.1.2).

**Fig. 21: Actividad de luciferasa de las deleciones del promotor de *PMT1* fusionadas al gen chivato *RLUC*.** Los plásmidos con las deleciones del promotor de *PMT1* (Fig. 20) se integraron en el sitio *Bst*1107I aguas arriba del gen *PMT1* en la cepa CAI4. 20 ml de cultivo se inocularon a una  $OD_{600}$  de 0,1 y se incubaron durante cuatro horas a 30 °C. Transcurrido este tiempo se recogieron las células y se obtuvo el extracto proteico. A continuación se determinó la actividad de luciferasa y la concentración del mismo (apartado 3.9.1.2).

Das Ace2-Motiv wurde in pPdC38 mittels Mutagenese PCR deletiert und durch die Schnittstelle *Swa*I ersetzt (Abb. 22). Das neue Plasmid, pPdC55, wurde an der *Bst*1107I Stelle in den *PMT1*-Locus integriert. Die β-Galaktosidase-Aktivität dieses Konstruktes in der Anwesenheit von 2 μg/ml Tunicamycin war aber immer noch vorhanden (Abb.

22). Somit enthält die 56 bp Sequenz von Deletion 3Del4 andere Sequenzen, die die Tunicamycin-Regulation bewirken können.

In der Sequenz von Del3 (113 bp) wurden mittels des RSAT Programms (Regulatory Sequence Analysis Tools, <http://rsat.ulb.ac.be/rsat>) zwei verschiedene Dyad-Motive, welche eine hohe Symmetrie aufweisen, gefunden. Die Motive haben die Sequenzen atn{5}aat und tatn{7}ata und sind genau 50 bp entfernt. Transkriptionsfaktoren mit einem Zinkfinger-Motiv binden an zwei Sequenzen der DNA, die auch eine variable Anzahl von Nukleotiden voneinander getrennt sind (MacPherson *et al.*, 2006). Dieses Motiv wäre eine mögliche Bindestelle für solche Transkriptionsfaktoren, wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

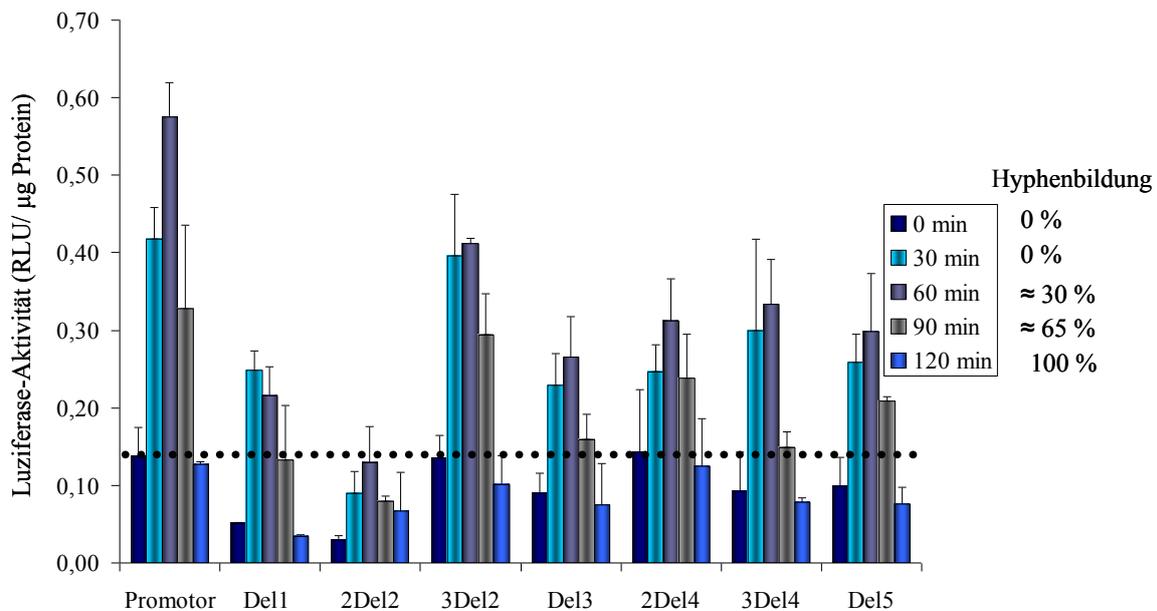


**Abb. 22: PMT1-Promotorsequenz im Bereich der Deletion 3Del4.** A. Die 1147 bp PMT1-Promotorsequenz wurde mithilfe des Transfac-Programms (Matys *et al.*, 2003; [www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)) analysiert. Ein Swi5-Bindemotiv (grün) und ein teilweise überlappendes mögliches Ace2-Bindemotiv (punktirt) wurden nachgewiesen. Die Konsensussequenz des *S. cerevisiae* Ace2-Bindemotivs ist ebenfalls dargestellt (fetter Druck). Um die Bedeutung von dem Ace2-Bindemotiv festzustellen, wurde es durch Mutagenese PCR in Plasmid pPdC38 deletiert (erhaltenes Plasmid pPdC55). Die deletierten Basenpaare (durch die durchgehende Linie gekennzeichnet) wurden durch die Schnittstelle *SwaI* ausgetauscht. B. PMT1-Promotoraktivität bei Deletion der möglichen Ace2-Bindestelle. Die Transformanten mit Plasmid pPdC55 wurden wie in Abb. 20 beschrieben auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ohne und mit 2  $\mu$ g/ml Tunicamycin getestet.

**Fig. 22: Secuencia de la delección 3Del4 de la región promotora de *PMT1*.** **A.** El fragmento de 1147 pb de *PMT1* se analizó en la base de datos Transfac (Matys *et al.*, 2003; www.gene-regulation.com). Se encontró un motivo de unión para Swi5 (en verde) y parcialmente superpuesto un motivo de unión para Ace2 (delimitado por una línea discontinua). En negrita se ha escrito la secuencia consenso del motivo Ace2 en *S. cerevisiae*. Con el fin de determinar si este motivo es significativo se eliminó mediante mutagénesis dirigida. La línea continua delimita los pares de bases substituidos por el sitio de corte *SwaI* en el plásmido pPdC38 (plásmido resultate: pPdC55). **B.** Actividad del promotor de *PMT1* carente del posible motivo de unión para Ace2. La actividad  $\beta$ -galactosidasa de los transformantes con el plásmido pPdC55 se midió en presencia y en ausencia de tunicamicina (2  $\mu$ g/ml) como se ha descrito en la Fig. 20.

#### 4.2.4.3 *PMT1*-Promotorregulation während der Hyphenbildung

Die *PMT1*-Promotorregulation während der Hyphenbildung wurde mit Transformanten des Stammes CAI4 untersucht. Die Zellen der Übernachtskulturen in YPD-Medium wurden geerntet, gewaschen und in YP-Medium (ohne Glukose) resuspendiert. 185 ml YP-Kultur wurden auf eine  $OD_{600} = 0,2$  angeimpft und bei 37 °C wachsen gelassen. Nach 10 min wurden 50 ml Kultur entnommen und 15 ml Pferdeserum (10 %) zugegeben. Es folgten Probeentnahmen bei den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 min. Die Messung der Luziferase-Aktivität ergab bei allen Deletionen einen Glockenverlauf (Abb. 23). Die Deletionen Del1 und 2Del2 zeigten wie erwartet (Abb. 21) niedrige Werte, wahrscheinlich wegen reduzierter Promotoraktivität, während das vollständige 1147 bp-Fragment den höchsten Wert nach 60 min zeigte. Eine mögliche Erklärung für den Glockenverlauf mag sein, dass das Pmt1-Protein nötig für den Übergang von der Hefe- in die Hyphenform ist, dass es aber weniger für die Aufrechterhaltung der Hyphenbildung bzw. die Elongation der Hyphen gebraucht wird. Dass keine Deletion eine ungewöhnliche Aktivierung bzw. einen Verlust der Aktivierung zeigte, deutet an, dass mehrere regulatorische Elemente des Promotors die Regulation bewirken.



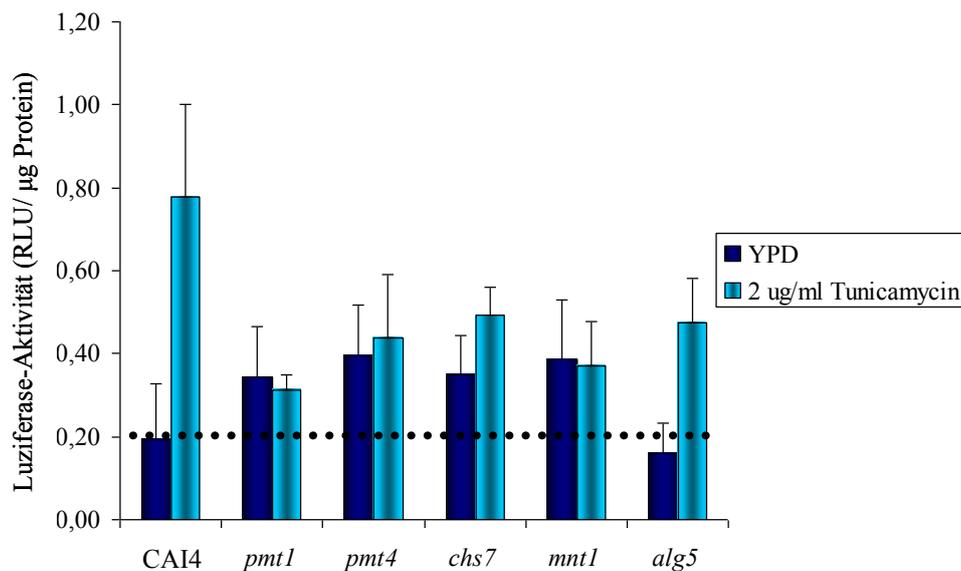
**Abb. 23: *PMT1*-Promotoraktivität während der Hyphenbildung.** CAI4-Transformanten mit deletierten *PMT1p-RLUC* Fusionen (Abb. 20) wurden in YPD-Medium über Nacht bei 30 °C wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und in 5 ml YP-Medium resuspendiert. 185 ml YP wurden auf eine  $OD_{600} = 0,2$  mit der Vorkultur inokuliert, 10 min bei 37 °C inkubiert und Serum zugegeben (10 % Serum). Proben wurden vor Serumzugabe ( $t = 0$ ) und nach 30, 60, 90 und 120 min entnommen und die Luziferase-Aktivität der Zellen wurde bestimmt. Der Prozent der Hyphenbildung wurde in einem unabhängigen Experiment für die 1147 bp-Konstrukte berechnet.

**Fig. 23: Actividad del promotor de *PMT1* durante la transición levadura-hifa.** Los transformantes de la cepa CAI4 con los plásmidos conteniendo las deleciones de la región promotora de *PMT1* (Fig. 20) se preinocularon en YPD a 30 °C. Se recogieron las células, se lavaron, y se resuspendieron en 5 ml de YP. A continuación se inocularon 185 ml de medio YP a una  $OD_{600}$  de 0,2 y se incubaron a 37 °C durante 10 min. Se tomó la muestra tiempo cero y se añadió suero de caballo al 10 %. Las muestras posteriores se tomaron a los 30, 60, 90 y 120 min. Finalmente se midió la actividad de luciferasa de las células. El porcentaje de filamentación se calculó en un experimento independiente sólo para la construcción de 1147 bp.

#### 4.2.4.4. Regulation des *PMT1*-Promotors in Glykosylierungs- und Zellwand-Mutanten

Um festzustellen, wie die Aktivität des *PMT1*-Promotors durch Defekte der Glykosylierung und anderer Zellwandkomponenten reguliert wird, wurde pPdC1 über die Schnittstelle *Bst*1107I in den *PMT1*-Locus der Stämme CAP1-3121 (*pmt1*), CAP4-2164 (*pmt4*), CRM693 (*chs7*), NAC4 (*alg5*) und NGY24 (*mnt1*) integriert (siehe Abschnitt 4.1.5 für eine Beschreibung der Mutanten). Die Promotoraktivität wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von Tunicamycin gemessen (Abb. 24). Der *PMT1*-

Promotor hatte im *alg5* Hintergrund eine ähnliche Regulation wie im Kontrollstamm CAI4. In allen anderen Mutanten zeigte die Aktivität des *PMT1*-Promotors eine höhere basale Aktivierung, die durch Zugabe von Tunicamycin nicht weiter erhöht wurde. Bemerkenswert ist auch, dass die *PMT1*-Promotoraktivität in der *pmt1*-Mutante höher ist als im Kontrollstamm. Somit reguliert das Pmt1 Protein den Promotor des kodierenden Gens. Dieses Ergebnis zeigt, dass Zellwanddefekte den *PMT1*-Promotor induzieren und bestätigt die qPCR Daten des *PMT1*-Transkripts in den Mutanten (Abschnitt 4.1.5).



**Abb. 24: *PMT1*-Promotoraktivität in Glykosylierungs- und Zellwand-Mutanten.** Plasmid pPdC1 wurde in *PMT1*-Promotor der *pmt1* (CAP1-3121)-, *pmt4* (CAP4-2164)-, *chs7* (CRM693)-, *mnt1* (NGY24)- und *alg5* (NAC4)-Mutanten integriert. Die Transformanten wurden in YPD-Medium bei einer  $OD_{600} = 0,1$  angeimpft und vier Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt (siehe Abschnitt 3.9.1.2).

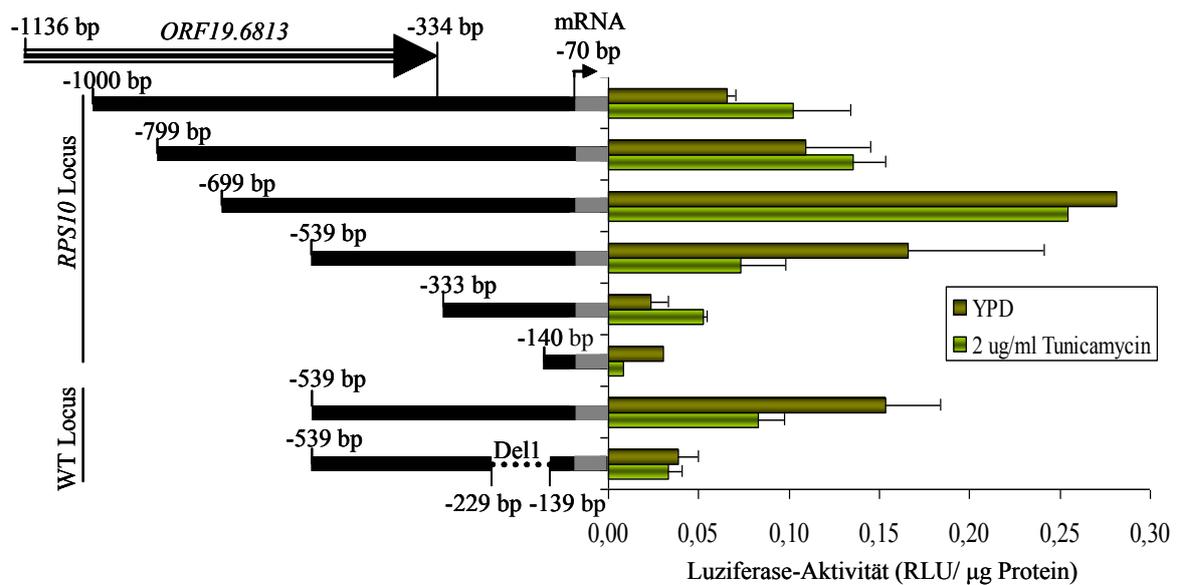
**Fig. 24: Activación del promotor de *PMT1* en mutantes de glicosilación y pared celular.** El plásmido pPdC1 se integró en el locus nativo de *PMT1* en los mutantes *pmt1* (CAP1-3121), *pmt4* (CAP4-2164), *chs7* (CRM693), *mnt1* (NGY24) y *alg5* (NAC4). Las células de los correspondientes transformantes se incubaron en medio YPD en ausencia y presencia de 2 µg/ml de tunicamicina a 30 °C durante cuatro horas. A continuación se determinó la actividad de luciferasa como se ha descrito en el apartado 3.9.1.2.

#### 4.2.5 Untersuchung des *PMT2*-Promotorbereiches mithilfe des *RLUC*-Reportergens

Wegen der kurzen intergenischen Region stromaufwärts des *PMT2*-Gens wurde in Reporterkonstrukten ein Promotorfragment von 1 kb verwendet, das einen Teil des stromaufwärts gelegenen *ORF19.6813* umfasst. Eine progressive Verkürzung des 5'-Endes des Promotorbereichs wurde durchgeführt. Die verschiedenen *PMT2*-Promotorfragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in Plasmid pES2 kloniert. Die Fragmente hatten die folgenden Größe: 1000 bp, 799 bp, 669 bp, 539 bp, 333 bp und 140 bp. Die resultierenden Plasmide wurden in den *RPS10*-Locus durch homologe Rekombination integriert, wobei die Linearisierung der Plasmide mit *AgeI* erfolgte. Mit dieser Strategie wurden unerwünschte Wirkungen auf die Expression des *ORF19.6813* vermieden.

Die Aktivität der *PMT2*-Fusionen wurde nach Behandlung mit Tunicamycin, dem *Pmt1*-Inhibitor und Cyclosporin A untersucht. Alle drei Substanzen hatten eine Änderung des *PMT2*-Transkriptspiegels verursacht (Abschnitte 4.1.4 und 4.3.1.4).

Die Luziferase-Aktivität erhöhte sich mit der Verlängerung des Promotorbereiches, mit einem Maximum bei ca. 700 bp (Abb. 25). Eine weitere Verlängerung bewirkte eine Erniedrigung der Luziferase-Aktivität. Die qPCR Ergebnisse des *PMT2*-Transkriptspiegels hatten gezeigt, dass *PMT2* in der Anwesenheit von Tunicamycin leicht reprimiert wird (Abb. 11). Die Messung der Promotoraktivität zeigte dagegen keine Wirkungen von Tunicamycin bei den 1000 bp-, 799 bp-, und 669 bp-Promotorkonstrukte (Abb. 25). Dagegen wurde überraschenderweise bei dem 539 bp-Konstrukt eine erniedrigte Luziferase-Aktivität in Anwesenheit von Tunicamycin festgestellt. Dieses Konstrukt wurde anschließend auch nach Linearisierung des Plasmids durch die *SwaI* (-406 bp) Schnittstelle in den eigenem *PMT2*-Promotor integriert. Durch eine Luziferase-Messung wurde ebenfalls eine Senkung der Aktivität nachgewiesen. Die niedrigen Werte der 333 bp- und 140 bp-Konstrukte zeigen eine defekte Transkriptionsinitiation an. Zwei mögliche TATA-Boxen wurden bei -355 bp und -302 bp identifiziert, die jedoch nicht vollständig der die im Abschnitt 4.2.2 erwähnten Definition entsprechen. Um die Umgebung der TATA-Boxen intakt zu lassen wurde das 539 bp-Plasmid mutagenisiert. 89 bp (-229 bis -139) wurden deletiert. Das Plasmid wurde in den *PMT2*-Promotor integriert. Die basale Luziferase-Aktivität dieser Konstrukte lag in dem Bereich der 333 bp-Fusion.



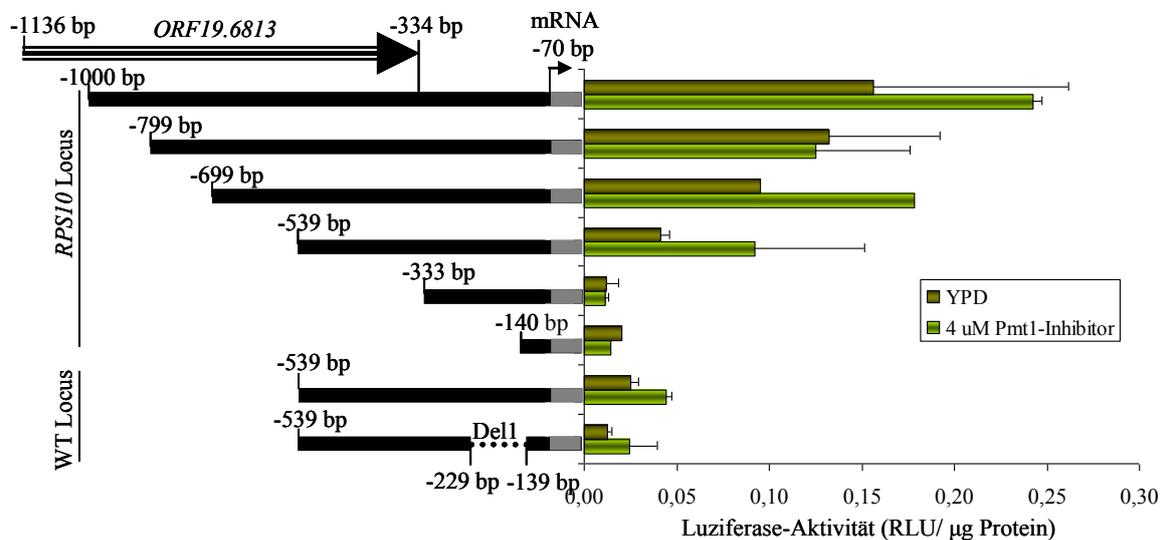
**Abb. 25: *PMT2*-Promotoraktivität.** Die Plasmide der *PMT2p-RLUC* Fusionen wurden in Stamm CAI4 integriert. Alle Konstrukte wurden in *RPS10*-Locus integriert, um unerwünschte Wirkungen auf die Expression des *ORF19.6813* zu vermeiden (der Pfeil delimitiert den offenen Leseraster *ORF19.6813* stromaufwärts des *PMT2*-Gens). Die Konstrukte der 539 bp-Promotorregion und Deletion Del1 auf dieser Region wurden auch in *PMT2*-Locus über die Stelle *SwaI* integriert. Die Zellen wurden in YPD-Medium ohne und mit 2 µg/ml Tunicamycin 4 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nur ein Transformant wurde bei den 669 bp- und 140 bp-Konstrukte gewonnen. Die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt wie im Abschnitt 3.9.1.2 beschrieben.

**Fig. 25: Actividad del promotor de *PMT2*.** Los plásmidos de las fusiones de los fragmentos de la región aguas arriba del gen *PMT2* con el gen chivato *RLUC* se integraron en la cepa CAI4. Todas las construcciones se integraron en el locus externo *RPS10*, con el objetivo de evitar efectos secundarios debidos a la interrupción del *ORF19.6813*. La flecha grande indica el marco de lectura abierto aguas arriba de *PMT2*, *ORF19.6813*. Las construcciones de 539 bp y de la deleción Del1 se integraron también en el sitio *SwaI* del locus nativo. Las células se crecieron en presencia y ausencia de tunicamicina (2 µg/ml) a 30 °C durante cuatro horas. La actividad de luciferasa se midió conforme a lo descrito en el apartado 3.9.1.2.

Die Aktivität der *PMT2p-RLUC* Fusionen wurde auch in der Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors und von Cyclosporin A gemessen. Da die Ergebnisse der *PMT2*-Transkriptspiegel einen kompensatorische Steigerung des *PMT2*-Transkriptes zeigten, wenn Pmt1 inhibiert/blockiert wird, sollte getestet werden, ob diese Regulation auf Promotorebene aufläuft. In der Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors wurde kein Unterschied nachgewiesen (Abb. 26). In dem Fall von Cyclosporin A (4 µg/ml, 16

$\mu\text{g/ml}$ ) wurde ebenfalls kein Unterschied der *PMT2*-Promotoraktivität zwischen den unbehandelten und behandelten Proben festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das *PMT2*-Gen unter diesen Bedingungen nicht oder geringfügig auf Promotorebene reguliert wird. Möglicherweise steht dieses Verhalten im Zusammenhang mit der Anwesenheit des unbekanntes stromaufwärts gelegenen *ORF19.6813*. Um zu überprüfen, ob *ORF19.6813* exprimiert wird, wurde mithilfe qPCR getestet, ob das Gen transkribiert wird (verwendete Oligonukleotide: *ORF19.6813*(RT)for und *ORF19.6813*(RT)rev). Tatsächlich wurde ein Transkript nachgewiesen, allerdings mit sehr niedrigem Transkriptspiegel (relativer Transkriptspiegel bezogen auf *ACT1*-Transkript:  $6,53^{-05} \pm 6,68^{-06}$ ;  $7,92^{-05} \pm 1,11^{-05}$ ).



**Abb. 26: *PMT2*-Promotoraktivität ohne und mit *Pmt1*-Inhibitor.** Das Experiment wurde wie in Abb. 25 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde als Inhibitor statt Tunicamycin der *Pmt1*-Inhibitor zugegeben.

**Fig. 26: Actividad de la región promotora de *PMT2* en presencia del inhibidor de *Pmt1*.** El experimento se llevó a cabo como el descrito en la figura 25, pero en presencia del inhibidor de *Pmt1*.

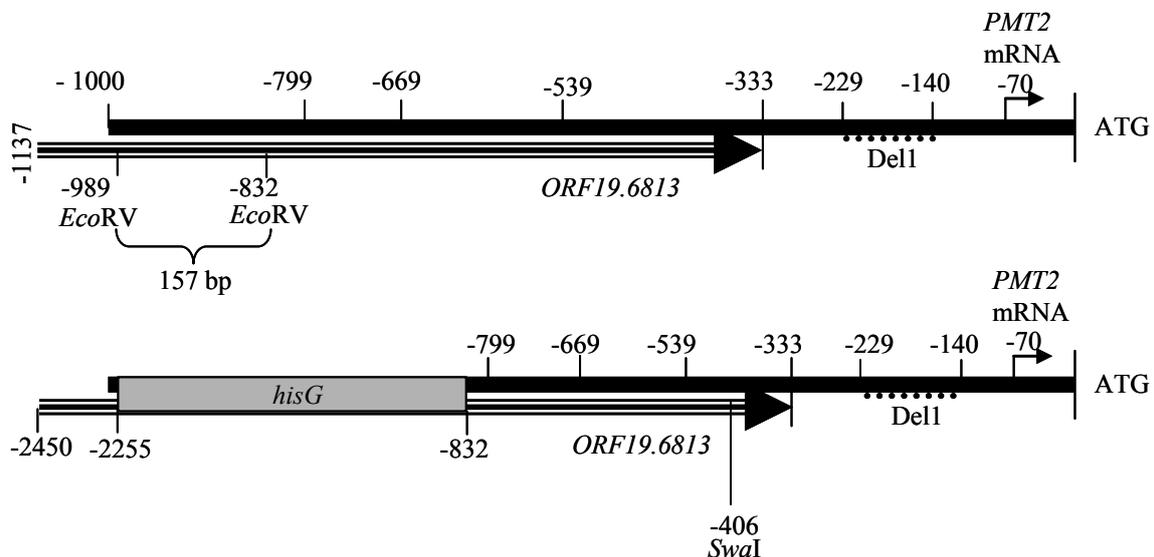
#### 4.2.5.1 Der *ORF19.6813*

Der *ORF19.6813* wird als unbekannter offener Leserahmen in der *Candida* Genome Database ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)) und in der CandidaDB ([genolist.pasteur.fr/CandidaDB](http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB)) gekennzeichnet. Der *ORF19.6813* ist 804 Nukleotide lang und seine entsprechende Aminosäuresequenz hat keine vorausgesagte Motive. Eine

BLAST-Analyse ergab jedoch Homologie mit einem unbekanntem Protein bei den Pilzen *C. dubliniensis* (96 % Identität), *C. tropicalis* (61 %), *C. lusitaniae* (25 %), *C. guilliermondii* (23 %), *Debaryomyces Hansenii* (26 %) und *Pichia stipitis* (31 %). Alle diese Organismen haben die Zugehörigkeit an der CTG-Clade gemeinsam (Wang *et al.*, 2009).

#### 4.2.5.2 Deletion des *ORF19.6813*

Der *ORF19.6813* wurde mit der „URA-Blaster“ Methode disruptiert (siehe Material und Methoden 3.11). In Abbildung 27 ist zu sehen, wie das Locus nach der Integration der *hisG-URA3-hisG* Kasette und die Elimination des *URA3*-Selektionsmarkers modifiziert wurde. Dies sollte die Deletion des *ORF19.6813* bewirken, möglicherweise ohne *PMT2*-Expression zu modifizieren.



**Abb. 27: Karte der Region stromaufwärts des *PMT2*-Gens nach Disruption des *ORF19.6813*.** A. Größe der Promotorfragmente in *PMT2*-Promotor-*RLUC*-Fusionen und die Lage des *ORF19.6813*. Die *URA*-Blaster Kasette (*hisG-URA3-hisG*) wurde zwischen den angezeigten *EcoRV*-Schnittstellen eingefügt. B. Lage der *hisG*-Kassette nach Verlust des *URA3-hisG* Anteil des *URA*-Blasters durch homologe Rekombination.

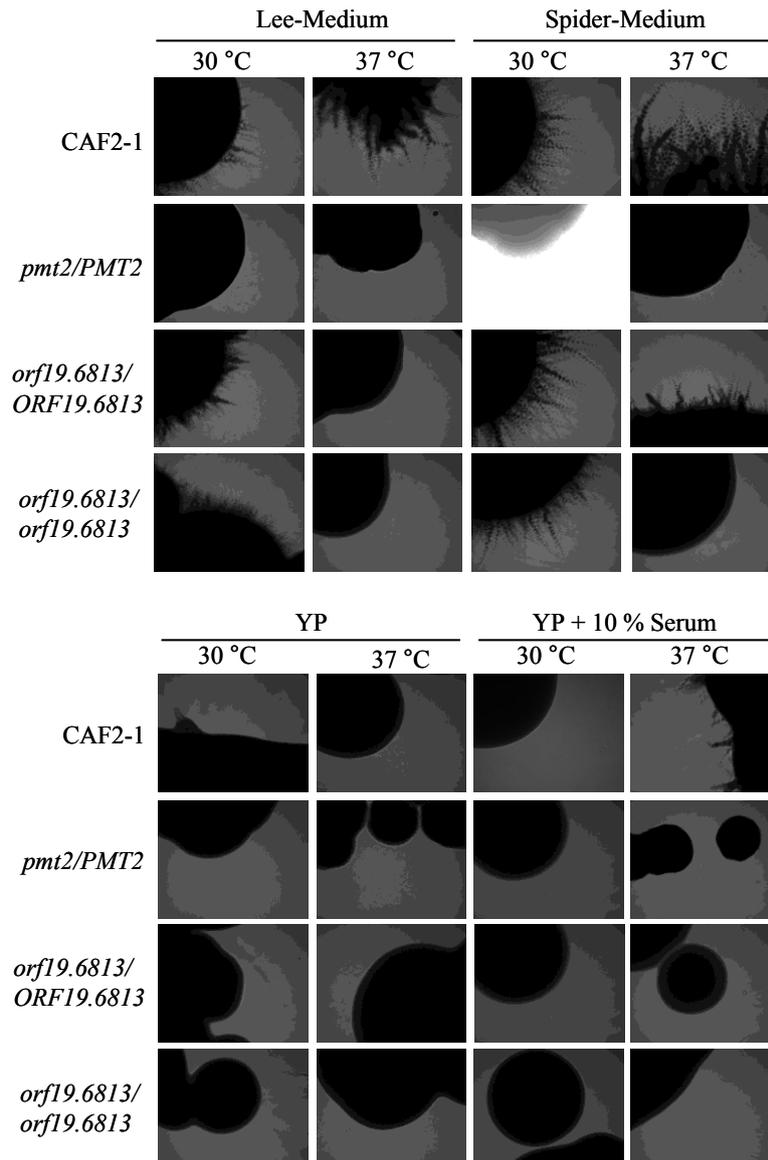
**Fig. 27: Mapa de la región aguas arriba de *PMT2* tras la disrupción del *ORF19.6813*.** En A se ha señalado la longitud de los fragmentos del promotor de *PMT2* analizados con el gen chivato *RLUC* y la posición del *ORF19.6813*. El casete *URA*-Blaster (*hisG-URA3-hisG*) se integró entre los dos sitios de restricción *EcoRV*. En B se muestra la localización del casete *hisG* tras la expulsión del gen *URA3* mediante recombinación homóloga del casete.

---

Um den Effekt der Deletion des *ORF19.6813* auf die Phänotypen von *C. albicans* zu bestimmen, wurden der heterozygote Stamm und die homozygote Mutante unter Stressbedingungen untersucht. Sie wurden auf YPD-Medium mit 0,5 M KCl, 1 M und 1,5 M NaCl, 2 M Sorbitol, 0,06 % und 0,10 % SDS, 10 µg/ml Calcofluor, 10 µM Koffein und 125 µg/ml Congo Rot und auf SD-Medium mit 125 µg/ml Congo Rot getropft. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert. Es wurde keine erhöhte Sensitivität der Mutanten gegenüber dem Wildtypstamm beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Hyphenbildung wurde auf Lee-, Spider- und YP + 10 % Serum-Medien untersucht. Auf Lee-Medium zeigten sowohl der heterozygote Stamm als auch die homozygoten Mutanten Hyphenbildung bei 30 °C. Die *orf19.6813*-Mutante verlor bei 37 °C dagegen die Fähigkeit, Filamente zu bilden. Weder die homozygote- noch die heterozygote-Mutante konnten auf YP + 10 % Serum Hyphen bilden. Die heterozygote *pmt2/PMT2*-Mutante zeigte unter allen Bedingungen keine Hyphenbildung (Abb. 28).

Es wäre nötig die Funktion des *ORF19.6813* durch Rekonstitution der Mutante zu bestätigen. Dieses Experiment konnte in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden. Es lässt sich aber festhalten, dass *ORF19.6813* für ein Protein kodiert, das wahrscheinlich eine Rolle in der Hyphenbildung unter bestimmten Bedingungen hat.



**Abb. 28: Hyphenbildung der *orf19.6813*-Mutante auf Lee-, Spider- und YP + 10 % Serum-Medien.** Fotografiert wurden Ränder von Kolonien. Die *orf19.6813*-Mutante kann keine Hyphen auf Lee- und Spider-Medien bei 37 °C bilden. Auf YP-Serum könnten weder die heterozygote noch die homozygote Mutante filamentieren.

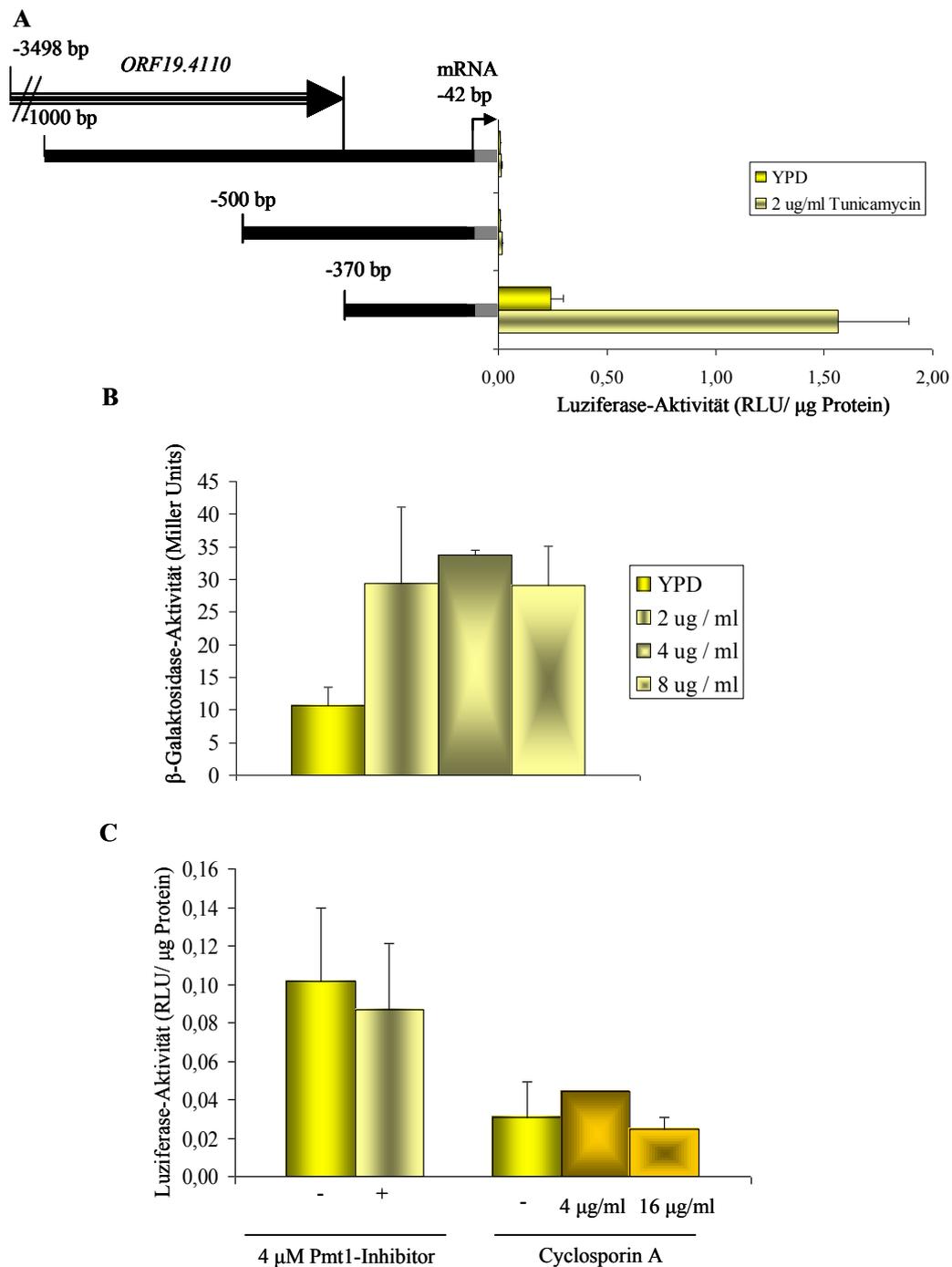
**Fig. 28: Filamentación del mutante *orf19.6813* en medio Lee, Spider y YP más 10 % de suero.** Se fotografió el borde de las colonias. *orf19.6813* no formó hifas a 37 °C en los medios Lee y Spider. En YP + 10 % suero ni el mutante homocigótico ni el heterocigótico filamentaron.

#### 4.2.6 Untersuchung des *PMT4*-Promotorbereiches mithilfe des *RLUC*-Reportergens

Wie für das *PMT2*-Gen umfasst die intergenische Region zwischen dem *PMT4*-Gen und dem stromaufwärts *ORF19.4110* nur 369 bp. Der *C. albicans ORF19.4110* ist homolog zu *S. cerevisiae MLPI* (myosin-like protein 1)-Gen. Um die Luziferase-Fusionen herzustellen, wurden in diesem Fall drei Konstrukte konstruiert: ein 370 bp- langes Fragment, das mit der intergenischen Region übereinstimmt, und zwei längere Fragmente von 1000 und 500 bp, die am ihren 5'-Ende die 3'-Sequenzen des *ORF19.4110* enthalten. Wie für *PMT2*-Fusionen beschrieben (Abschnitt 4.2.5) wurden die Konstrukte in den *RPS10*-Locus integriert.

Die Luziferase-Aktivität der *PMT4-RLUC* Fusionen wurde nach der Behandlung mit Tunicamycin, dem Pmt1-Inhibitor und Cyclosporin A untersucht. Sowohl das 1000 bp-Promotorfragment als auch das 500 bp-Fragment zeigten keine Luziferase-Aktivität, weder unter normalen Wachstumsbedingungen noch nach Zugabe von Tunicamycin. Dagegen zeigte die 370 bp-Promotorregion eine messbare Aktivität unter normalen Bedingungen, die in der Anwesenheit von Tunicamycin stark erhöht wurde (Abb. 29). Dieses Ergebnis konnte mit der *lacZ*-Fusion bestätigt werden (Abb. 29). Die Promotoraktivität unterscheidet sich in diesem Fall von der Transkriptregulation, bei der der *PMT4*-Transkriptspiegel leicht durch Tunicamycin reprimiert wurde (Abschnitt 4.1.4). Die Messungen ergaben für die 370 bp-Konstrukte keinen Unterschied zwischen den Pmt1-Inhibitor- und Cyclosporin A-behandelten und unbehandelten Zellen (Abb. 29). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im chromosomalen Kontext die *PMT4*-Promotoraktivität durch die Anwesenheit des stromaufwärts gelegenen ORF reprimiert wird. Die starke Tunicamycin-Regulation der intergenischen *PMT4*-Promotorfusion zeigt das Potenzial der Regulation, ist in Wildtypzellen vermutlich aber nicht bedeutend.

**Abb. 29: *PMT4*-Promotoraktivität.** **A.** Die intergenische Region stromaufwärts *PMT4* ist 369 bp lang. Stromaufwärts ist in gleicher Orientierung wie *PMT4* der *ORF19.4110*. Drei Fusionen des *PMT4*-Promotors an das *RLUC* Reportergen wurden getestet: die 370 bp intergenische Region bzw. zwei längere Promotor-Fragmente von 500 bp und 1000 bp. Alle die Plasmide wurden in *RPS10*-Locus von Stamm CAI4 integriert. Das Experiment wurde wie in Abb. 22 beschrieben durchgeführt und die Luziferase-Aktivität bestimmt. **B.** *PMT4*-Promotoraktivität der 370 bp *PMT4-lacZ* Fusion in Anwesenheit von Tunicamycin. Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde wie in Abb. 20 beschrieben durchgeführt. **C.** *PMT4*-Promotoraktivität der 370 bp *PMT4p-RLUC* Fusion in Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors und Cyclosporin A.



**Fig. 30: Actividad del promotor de *PMT4*.** **A.** La región intergénica aguas arriba de *PMT4* tiene una longitud de 369 pares de bases. El ORF situado aguas arriba, *ORF19.4110*, presenta la misma orientación que el gen *PMT4*. Para fusionar la región promotora al gen chivato *RLUC* se diseñaron tres construcciones: una correspondiente a los 370 nucleótidos de la región intergénica, y otras dos de 1000 y 500 bp. Sólo el fragmento de 370 bp presentó actividad de luciferasa. **B.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la construcción 370 bp-*PMT4-lacZ* en presencia de tunicamicina. La medida se llevó a cabo como se ha descrito en la fig. 20 **C.** Actividad de la fusión 370 bp *PMT4-RLUC* en presencia del inhibidor de Pmt1 y de ciclosporina A.

### 4.3 Aktivierung von Signalwegen bei defekter O-Mannosylierung

Die Erkennung und Weiterleitung von externen Signalen, sowie ihre Antwort darauf ist essenziell für das Überleben der Zelle. Transmembran-Rezeptoren detektieren die Signale, z.B. Defekte der Zellwand, und leiten sie über verschiedene Signalwege bis zum Zellkern weiter (Fuchs & Mylonakis, 2009). Der Hauptsignalweg der Zellwandbiogenese ist der Zellwand-Integrität-Weg, der durch Mkc1 bei *C. albicans* reguliert wird (Navarro-García *et al.*, 1995). Dabei wird Mkc1 als Antwort auf oxidativen Stress, osmotischen Druck, Zellwandstörungen und Erniedrigung der Wachstumstemperatur phosphoryliert (Navarro-García *et al.*, 2005). Die weiteren Proteine des Weges, außer Pkc1 (Paravicini *et al.*, 1996), sind nicht ausführlich charakterisiert worden. Es wurde beobachtet, dass die Zellwand der *mkc1*-Mutante kaum Änderungen in der Chitin- oder Mannoproteinegehalt zeigte, obwohl die Zellwandlokalisation des Mannans modifiziert wurde (Navarro-García *et al.*, 1998).

Bei *C. albicans* spielt der PKA-Weg die bedeutendste Rolle in der Hefe-Hyphen Umwandlung (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997), der HOG-Weg in der Erkennung/Antwort auf osmotischen Stress (Eisman *et al.*, 2006) und der Cek1 MAPK-Weg für die Filamentierung (Cook *et al.*, 1997; Csank *et al.*, 1998) und den SVG-Weg (Román *et al.*, 2009). Der Calcium/Calmodulin/Calcineurin-Weg vermittelt die Tolerierung gegen Antimykotika, die Kation-Homeostase und Virulenz (Sanglard *et al.*, 2003). Der RAM-Weg ist für die Morphogenese und die Aktivierung des Ace2 Transkriptionsfaktors notwendig (Song *et al.*, 2008).

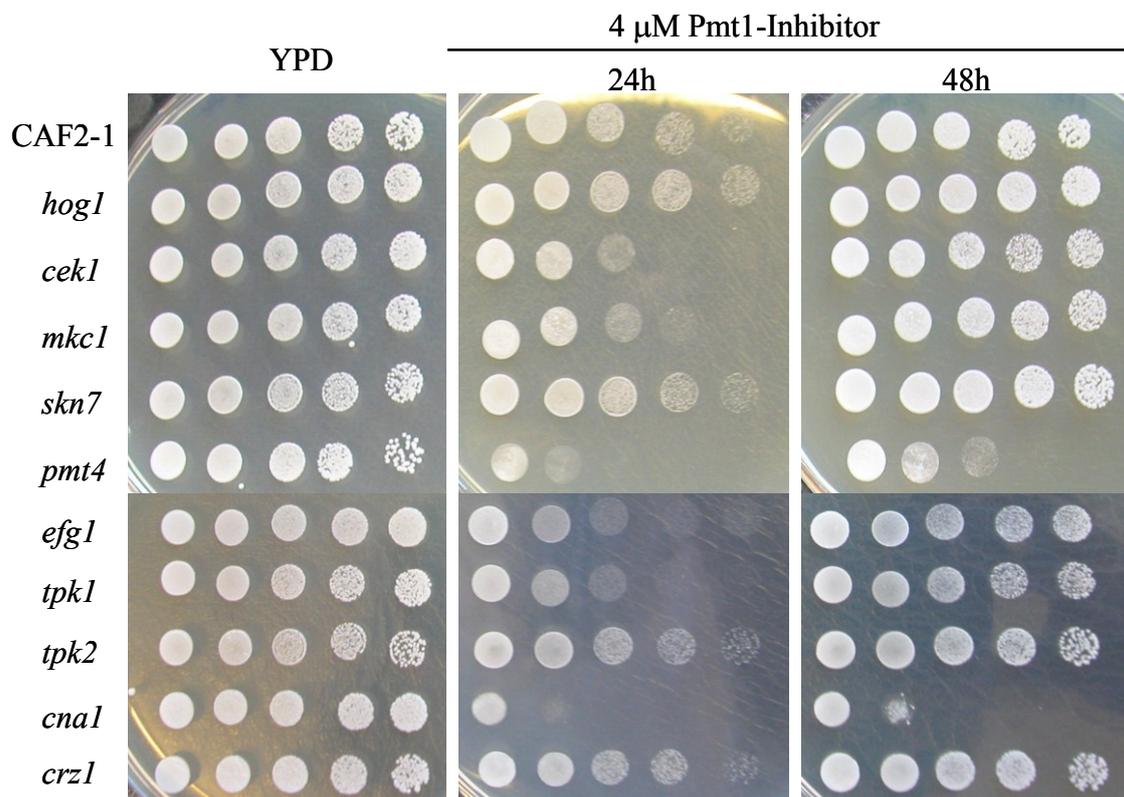
Die Synthese der verschiedenen Zellwandstrukturen wird bei *C. albicans* durch mehrere Signalwege reguliert. Die Chitin-Synthese wird durch die PKC-, HOG-, und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calcineurin-Wege reguliert (Munro *et al.*, 2007). Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren stromabwärts dieser Wege wurden in den Promotoren der *CHS2*- und *CHS8*-Gene identifiziert. Die Mutagenisierung der RLM-Elemente (Rlm1-Bindestellen; PKC-Weg) führte zu einem Verlust der *CHS*-Promotoraktivität, aber weder die ATF/CREB-Box (Sko1-Bindestelle; HOG-Weg) noch Crz1 oder die CDRE-Boxen (Calcineurin-Weg) spielten eine Rolle in der Promotoraktivierung der *CHS*-Gene (Lenardon *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Regulation der *CHS*-Gene durch den HOG- und Calcineurin-Wege durch unbekannte Transkriptionsfaktoren oder in einem indirekten Modus geschieht (Lenardon *et al.*, 2009).

$\beta$ 1,3-Glukan und  $\beta$ 1,6-Glukan werden bei den  $\beta$ 1,3-Glukansynthasen (Rho1- und Fks-Untereinheiten) bzw. Kre9-Proteinen synthetisiert (Mio *et al.*, 1997, Hoehamer *et al.*, 2010; Lussier *et al.*, 1998). Der Cwt1-Transkriptionsfaktor ist an der Regulation der Zellwandstruktur beteiligt, insbesondere an der Regulation des  $\beta$ 1,6-Glukan- und Mannoproteingehalts (Moreno *et al.*, 2010).

In der *C. albicans och1*-Mutante, in der die Verlängerung des *N*-Glykosylkerns blockiert ist, werden Mkc1 und Cek1 phosphoryliert (Bates *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wurde Mkc1 in den *pmt*-Mutanten nicht aktiviert (Cantero *et al.*, 2007). Es wurde für *S. cerevisiae* außerdem beschrieben, dass Tunicamycin den CWI-Weg aktiviert (Bonilla & Cunningham, 2003; Cohen *et al.*, 2008), während Mkc1 bei *C. albicans* nicht, selbst nicht in *pmt*-Mutanten, in Gegenwart von Tunicamycin phosphoryliert wird (Cantero *et al.*, 2007). Die konstitutive Phosphorylierung des Cek1-Proteins in den *och1*-, *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten und die Erhöhung der Cek1-Aktivierung durch Tunicamycin in *pmt*-Mutanten (außer in dem *pmt2/PMT2*-Stamm) (Bates *et al.*, 2006; Cantero *et al.*, 2007), deutet an, dass der SVG-Weg der Hauptweg ist, der defekte *N*- und *O*-Glykosylierung signalisiert.

Um die Beteiligung der CWI-, Cek1- und anderer Wege an der Antwort auf defekte *O*-Mannosylierung und der Regulation der *PMT*-Gene zu klären, wurde das Wachstum verschiedener Mutanten, die Defekte in Signalwegen tragen, in Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors untersucht. Es wurde angenommen, dass die Inhibition der Pmt1-vermittelten *O*-Mannosylierung kompensiert sein sollte und zwar durch gesteigerte Expression anderer *PMT*- oder weiterer Gene, z.B. Gene die für Chitin- oder  $\beta$ -Glukan-Synthese kodieren. In Abwesenheit der beteiligten Signalwege sollte in Gegenwart des Pmt1-Inhibitors das Wachstum der Zellen betroffen sein, wodurch die beteiligte Signalwege identifiziert werden könnten. In diesem Experiment wurde das Wachstum der *hog1*-, *cek1*-, *mkc1*-, *skn7*-, *efg1*-, *tpk1*- und *tpk2*-, *cna1*- und *crz1*-Mutanten mit dem Pmt1-Inhibitor analysiert. Nach 24 Stunden war das Wachstum der *cek1*-, *mkc1*-, *efg1*-, *tpk1*- und *cna1*-Mutanten vollständig gehemmt, es erholte sich aber nach 48 Stunden (Abb. 30). Nur das Wachstum der *cna1*-Mutante (keine Calcineurin-Synthese) war permanent blockiert, während das Wachstum der *crz1*-Mutante nicht betroffen war. Dieses ist bemerkenswert, da der Transkriptionsfaktor Crz1 durch Calcineurin dephosphoryliert wird (Karababa *et al.*, 2006). Da auch die *crz1 crz2*-Doppelmutante nicht durch den Pmt1-Inhibitor blockiert wurde (Abb. 31) lässt sich schlussfolgern, dass beide

bekannten Zielproteine des Calcineurin nicht an der Antwort auf defekte Pmt1-*O*-Mannosylierung beteiligt sind. Die Antwort auf defekte *O*-Mannosylierung erfolgt somit in zwei Schritten: zuerst eine schnelle Adaptation, an der die Cek1-, Mkc1-, PKA- und Calcineurin-Wege teilnehmen, und danach eine langfristige Adaptation, an der Calcineurin-Weg involviert wird. Außerdem weisen diese Daten auf eine Signaltransmission durch unbekannte Regulatoren als Zielproteine von Calcineurin hin.



**Abb. 30: Wirkung des Pmt1-Inhibitors auf verschiedenen Signalwege-Mutanten.** Die Stämme CNC13 (*hog1*), CK43B-16 (*cek1*), CM1613 (*mkc1*), N2 (*skn7*), HLC52 (*efg1*), IIHB6 (*tpk1*), TPO7.4 (*tpk2*), DSY2091 (*cna1*) und DSY2195 (*crz1*) wurden auf YPD-Medium und YPD + 4 μM Pmt1-Inhibitor in einer Verdünnungsreihe getropft und das Wachstum (30 °C) wurde nach 24 und 48 Stunden dokumentiert. Als Kontrolle wurde CAF2-1(+/+) benutzt. SPCa6 (*pmt4*) wurde als Kontrolle für den Pmt1-Inhibitor benutzt, da das gleichzeitige Fehlen von Pmt1 und Pmt4 das Wachstum verhindert (Prill *et al.*, 2005).

**Fig. 30: Efecto del inhibidor de Pmt1 sobre varios mutantes de rutas de señalización.** La sensibilidad de las cepas CNC13 (*hog1*), CK43B-16 (*cek1*), CM1613 (*mkc1*), N2 (*skn7*), HLC52 (*efg1*), IIHB6 (*tpk1*), TPO7.4 (*tpk2*), DSY2091 (*cna1*) y DSY2195 (*crz1*) frente al inhibidor de Pmt1 (4 μM) se analizó mediante ensayo en gota. El crecimiento se observó después de 24 y 48 horas de incubación a 30 °C. CAF2-1 (+/+) es la cepa control. SPCa6 (*pmt4*) es el control para el inhibidor de Pmt1, ya que la carencia simultánea de Pmt1 y Pmt4 previene el crecimiento (Prill *et al.*, 2005).

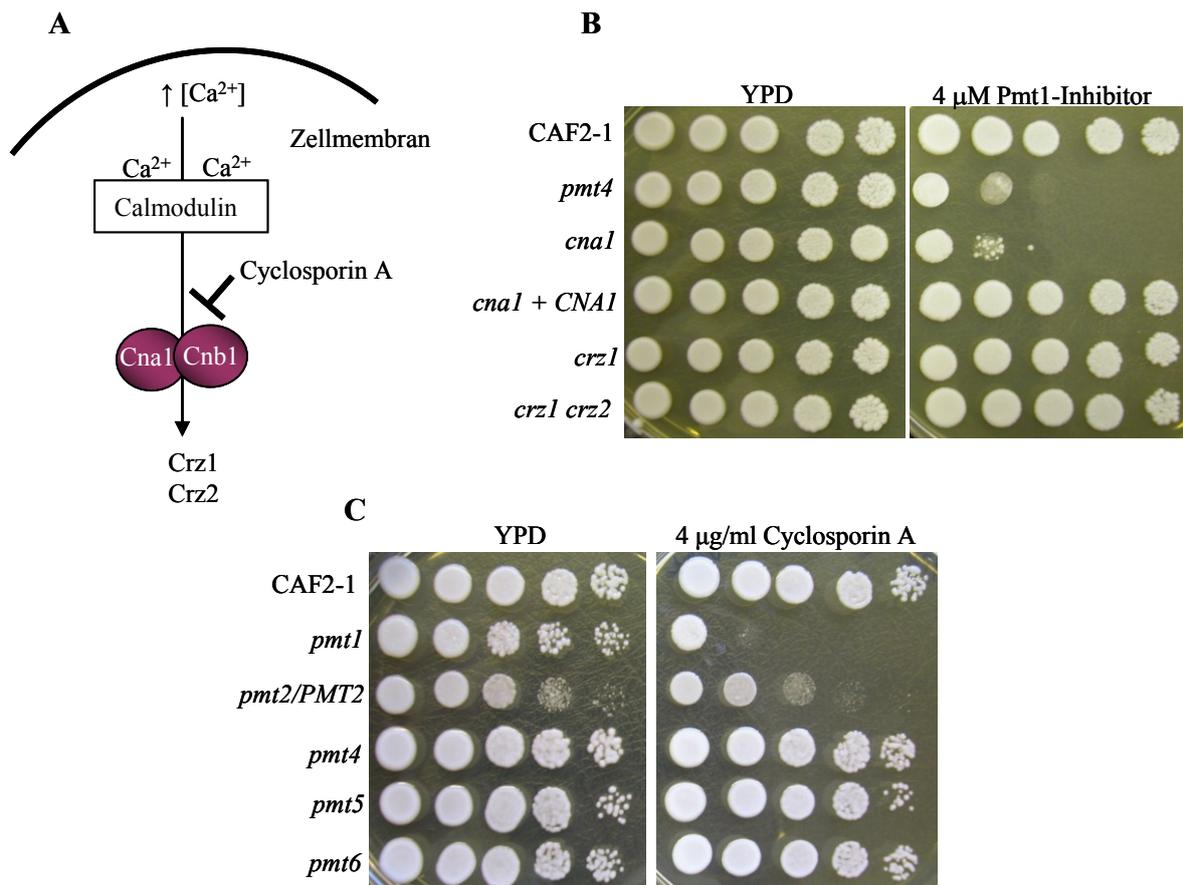
### 4.3.1 Aktivität des Calcium/Calcineurin-Signalweges bei defekter O-Mannosylierung

Calcineurin ist eine Serin/Threonin-Phosphatase, deren Struktur von Pilz bis Säugerzellen sehr konserviert ist. Bei Pilzen spielt sie eine Rolle bei der Regulierung der Kation-Homeostase, Tolerierung gegen Antimykotika und Virulenz. Außerdem ist Calcineurin an der Morphogenese von *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* und *N. crassa* beteiligt (Stie & Fox, 2008; Fox *et al.*, 2001; Steinbach *et al.*, 2006). Das Protein besteht aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen Untereinheit, CnA, und einer regulatorischen Untereinheit, CnB. Unter Normalbedingungen ist Calcineurin in einem inaktiven Modus, sie wird bei Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert (Abb. 31). Die Untereinheit CnA besitzt eine katalytische Domäne und drei regulatorische Domänen: die CnB-bindende Domäne, die Calmodulin-bindende Domäne und die C-Terminus autoinhibitorische Domäne (Stie & Fox, 2008). Wenn die Letztere deletiert wird, wird das Protein konstitutiv aktiv (Sanglard *et al.*, 2003). Die *cnal*-Mutante ist sensitiv gegen SDS, Calcofluor und Congo Rot, was auf Zellwanddefekte hindeutet. Zudem zeigt die Mutante defekte Hyphenbildung in Spider- und SLAD-Media.

Die Calcineurin-Funktion ist sensitiv gegenüber den Immunsuppressoren Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Tacrolimus) (Stie & Fox, 2008). Cyclosporin A ist ein zyklisches Peptid-Antibiotikum, das aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum gams* isoliert wird, während FK506 ein Makrolid-Antibiotikum ist, welches von *Streptomyces tsukubaensis* produziert wird. CsA und FK506 binden an die Proteine Cyclophilin bzw. das FK506-bindende Protein (FKBP). Die entstehenden Komplexe binden an beide Calcineurin Untereinheiten und blockieren die Phosphatase-Aktivität (Hemmenway, 1999).

#### 4.3.1.1 Sensitivität der *pmt*-Mutanten gegenüber Cyclosporin A

Im Zusammenhang mit der Sensitivität der *cnal*-Mutante gegen den Pmt1-Inhibitor (Abb. 30 und 31), ergab sich die Frage, ob die *pmt*-Mutanten gegenüber Calcineurin-spezifischen Inhibitoren sensitiv sind. Das Wachstum der *pmt*-Mutanten wurde deswegen in der Anwesenheit von CsA untersucht. Die *pmt1*-Mutante wurde durch Cyclosporin A stark gehemmt, und der heterozygote *pmt2/PMT2*-Stamm wies ebenfalls einen partiellen Wachstumsdefekt auf (Abb. 31). Dieses Ergebnis bestätigt, dass *C. albicans* bei gleichzeitige Defekten der *PMT1*- und *CNA1*-Genprodukte nicht lebensfähig ist.



**Abb. 31: Aktivität des Calcium/Calcineurin-Signalweges bei defekter O-Mannosylierung.** **A.** Schematische Darstellung des Calcium/Calmodulin/Calcineurin-Signalweges. Die Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels aktiviert Calmodulin, das den Calcineurin-Komplex aus katalytischer Untereinheit (Cna1) und regulatorischer Untereinheit (Cnb1) aktiviert. Transkriptionsfaktoren Crz1 und Crz2 werden durch Calcineurin dephosphoryliert und können dadurch in den Kern transportiert werden und Zielgene aktivieren. Cyclosporin A ist ein Peptid-Antibiotikum, das an das Protein Cyclophilin bindet. Der entstehende Komplex bindet ebenfalls an beide Calcineurin Untereinheiten und blockiert die Phosphatase-Aktivität. **B.** Wirkung des Pmt1-Inhibitors auf Mutanten des Calcium/Calcineurin-Weges. Die Stämme CAF2-1, SPCa6 (*pmt4*), DSY2091 (*cna1*), DSY2115 (*cna1 + CNA1*), DSY2195 (*crz1*) und MK360 (*crz1 crz2*) wurden auf YPD-Medium ohne und mit 4 μM Pmt1-Inhibitor in einer Verdünnungsreihe getropft und das Wachstum (30 °C) wurde nach 24 und 48 Stunden dokumentiert. **C.** Wirkung von Cyclosporin A auf *pmt*-Mutanten. Die Stämme SPCa2 (*pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4*), SPCa10 (*pmt5*) und SPCa8 (*pmt6*) wurden auf YPD-Medium ohne und mit 4 μg/ml Cyclosporin A in einer Verdünnungsreihe getropft und bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert.

**Fig. 31: Actividad de la ruta calcio/calcineurina en respuesta a defectos en O-manosilación.** **A.** Esquema de la ruta calcio-calmodulina-calcineurina. El incremento de concentración de calcio activa a la proteína calmodulina, la cual, a su vez, activa el complejo calcineurina formado por las subunidades Cna1, catalítica, y Cnb1, reguladora. Los factores de transcripción Crz1 y Crz2 son defosforilados y pueden penetrar en el núcleo de la célula. La Ciclosporina A es un antibiótico peptídico que se une a la proteína ciclofilina. El complejo formado se une a su vez a las dos subunidades de la proteína calcineurina inhibiendo su actividad fosfatasa.

**B.** Efecto del inhibidor de Pmt1 sobre algunos mutantes de la ruta de calcineurina. Se analizaron las cepas CAF2-1, SPCa6 (*pmt4*), DSY2091 (*cna1*), DSY2115 (*cna1* + *CNA1*), DSY2195 (*crz1*) y MK360 (*crz1 crz2*) mediante un ensayo de sensibilidad en medio YPD conteniendo 4  $\mu$ M del inhibidor de Pmt1. Las placas se fotografiaron tras 48 horas a 30 °C. **C.** Efecto de ciclosporina A sobre los mutantes *pmt*. Se preparó un ensayo de sensibilidad para las cepas SPCa2 (*pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4*), SPCa10 (*pmt5*) y SPCa8 (*pmt6*). Después de 48 horas de incubación a 30 °C se fotografiaron las placas.

#### 4.3.1.2 Viabilitätstest der *cna1*-Mutante in Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors

Um den Effekt des Pmt1-Inhibitors auf die *cna1*-Mutante genauer zu klären wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Sowohl der Kontrollstamm CAF2-1, als auch die *cna1*-Mutante wurden in YPD, YPD + 4  $\mu$ M Pmt1-Inhibitor, YPD + 4  $\mu$ g/ml CsA und YPD + 4  $\mu$ M Pmt1-Inhibitor + 4  $\mu$ g/ml CsA inokkuliert. Die Kulturen wurden 48 Stunden bei 30 °C inkubiert und die Lebendzellzahl wurde nach 0, 12, 24, und 48 Stunden durch Ausplattieren auf YPD Platten bestimmt (Abb. 32). Da die *cna1*-Mutante resistent gegen CsA ist, zeigte sie in Anwesenheit von CsA das gleiche Wachstum wie die Kontrolle (CAF2-1 und die *cna1*-Mutante in YPD-Medium ohne CsA). Der CAF2-1-Stamm zeigte in der Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors ein minimal langsames Wachstum. Überraschenderweise führte die Behandlung mit dem Pmt1-Inhibitor nicht zum Tod der *cna1*-Mutante sondern nur zu einer Blockierung des Wachstums. Ein synergistischer Effekt des Pmt1-Inhibitors und von CsA ließ sich feststellen, da der CAF2-1-Stamm in Anwesenheit beider Substanzen deutlich langsamer wuchs.

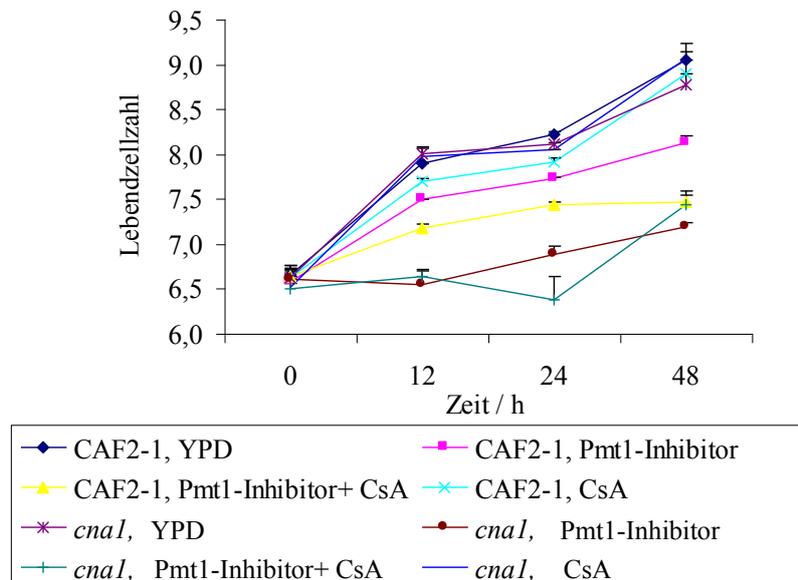
#### 4.3.1.3 Der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der *cna1*-Mutante

Der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene wurde in der exponentiellen Phase der *cna1*-Mutante gemessen. *PMT1* wurde sehr stark im Vergleich zum Kontrollstamm exprimiert, während die *PMT2*- und *PMT6*-Gene reprimiert wurden (Abb. 33). Der Transkriptspiegel des *PMT6*-Gens war zu niedrig, um die Effizienz zu berechnen und ist nicht grafisch dargestellt. Es muss auch betont werden, dass das *PMT5*-Transkript messbare Werte zeigte (relativer Transkriptspiegel ca. 0,1) und sein Spiegel in der *cna1*-Mutante drei- bis vierfach höher als im Wildtypstamm war.

Die *cna1*-Mutante zeigte Zellwanddefekte, welche durch Sensitivität gegenüber SDS, Calcofluor White und Congo Rot nachgewiesen wurden (Sanglard *et al.*, 2003). Die Überexpression von *PMT1* entspricht somit den Zellwanddefekten der *cna1*-Mutante.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass *PMT2* reprimiert wird, und die Expression von *PMT6* so niedrig war, dass sein Transkriptspiegel nicht bestimmt werden konnte.

In Wildtypzellen hat Calcineurin daher einen reprimierenden Effekt auf die *PMT1*-Expression und einen aktivierenden Effekt auf die Expression von *PMT2*.

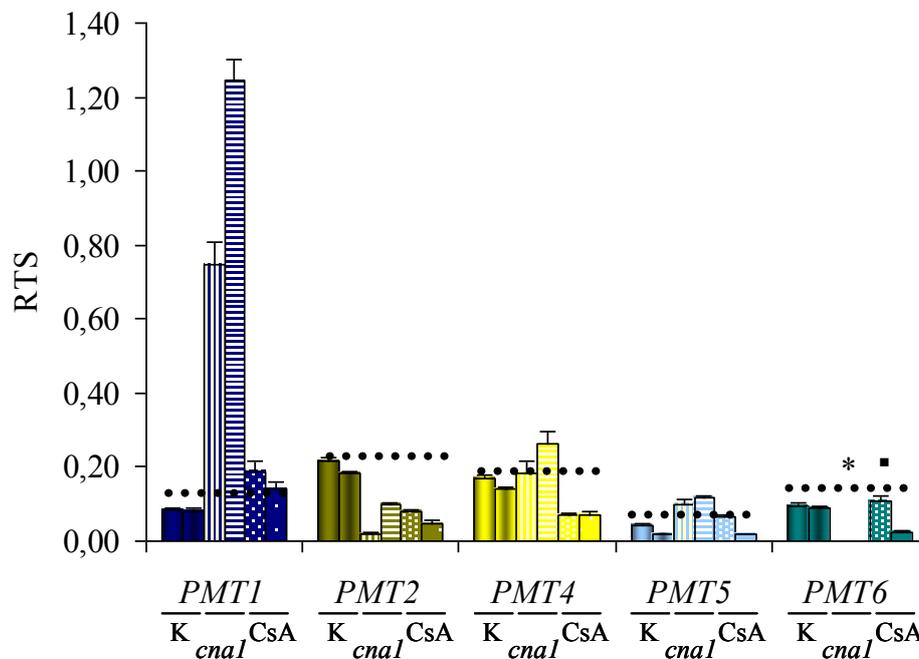


**Abb. 32: Wirkung der Kombination des Pmt1-Inhibitors mit Cyclosporin A auf den Wildtyp (CAF2-1)- und DSY2091 (*cnal*)-Stämme in Flüssigmedium.** Beide Stämme wurden in 5 ml YPD-Medium ohne und mit 4  $\mu$ M Pmt1-Inhibitor, 4  $\mu$ g/ml Cyclosporin A (CsA) und beiden Substanzen angezogen. Die Kulturen wurden bei 30 °C geschüttelt und 100  $\mu$ l-Aliquote wurden nach 12, 24 und 48 Stunden entnommen. Diese Aliquote wurden  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  verdünnt und 100  $\mu$ l wurden auf eine YPD-Platte ausplattiert. Die Lebendzellzahl (in Doppelbestimmung) wurde nach der Inkubation der Platten für 24 Stunden bei 30 °C ausgezählt.

**Fig. 32: Efecto de la combinación del inhibidor de Pmt1 y CsA sobre las cepas CAF2-1 (control) y DSY2091 (*cnal*).** Ambas cepas se inocularon en 5 ml de YPD, YPD + 4  $\mu$ M inhibidor de Pmt1, YPD + 4  $\mu$ g/ml CsA y YPD + 4  $\mu$ M inhibidor de Pmt1 + 4  $\mu$ g/ml CsA. Los cultivos se incubaron a 30 °C. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l a las 12, 24 y 48 horas y se diluyeron  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Se sembraron 100  $\mu$ l de cada dilución en una placa de YPD. Se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) después de 24 horas de crecimiento a 30 °C. El experimento se llevó a cabo por duplicado.

#### 4.3.1.4 Der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in Anwesenheit von CsA

Zur weiteren Analyse der Regulation der *PMT*-Gene durch den Calcineurin-Weg wurde deren Transkriptspiegel im Wildtypstamm in Anwesenheit von 4  $\mu\text{g/ml}$  Cyclosporin A bestimmt. Hierbei wurde die Repression des *PMT2*-Gens bestätigt (Abb. 33). Die *PMT1*- und *PMT4*-Gene zeigten aber mit Cyclosporin A eine unterschiedliche Regulation im Vergleich zu der *cnal*-Mutante. Der *PMT1*-Transkriptspiegel war zwar leicht erhöht, während der *PMT4*-Transkriptspiegel gegenüber der *cnal*-Mutante deutlich erniedrigt war. Es wäre daher denkbar, dass die Antwort auf die Hemmung von Calcineurin in zwei Phasen erfolgt. Die Zugabe eines spezifischen Inhibitors wie Cyclosporin A könnte eine kurzfristige Antwort auslösen, während in der *cnal*-Mutante eine verzögerte molekulare Antwort aufläuft, die die Expression der *PMT*-Gene unterschiedlich beeinflusst.



**Abb. 33: Transkriptspiegel der *PMT*-Gene bei Fehlen oder Hemmung von Calcineurin.** Der *PMT*-Transkriptspiegel wurde wie in Abb. 8 beschrieben bestimmt. Die *cnal*-Mutante (Stamm DSY2091) und der Wildtyp CAF2-1 ohne oder mit Cyclosporin A (4 $\mu\text{g/ml}$ ) wurden getestet. *PMT6*-Transkript ergab in der *cnal*-Mutante und mit Cyclosporin starke Schwankungen, diese Proben werden mit einem Stern gekennzeichnet.

**Fig. 33: Nivel relativo de transcripción de los genes *PMT* en ausencia de la proteína calcineurina o tras su inhibición con ciclosporina A.** El transcrito de los genes *PMT* se determinó en el mutante *cnal* y en la cepa control tratada con 4  $\mu\text{g/ml}$  de ciclosporina A. No se pudo calcular el transcrito del gen *PMT6* en el mutante *cnal* dada su débil expresión. En presencia de ciclosporina A la diferencia entre las réplicas biológicas de *PMT6* es muy grande.

### 4.3.2 Aktivität des Cek1-Signalweges bei defekter O-Mannosylierung

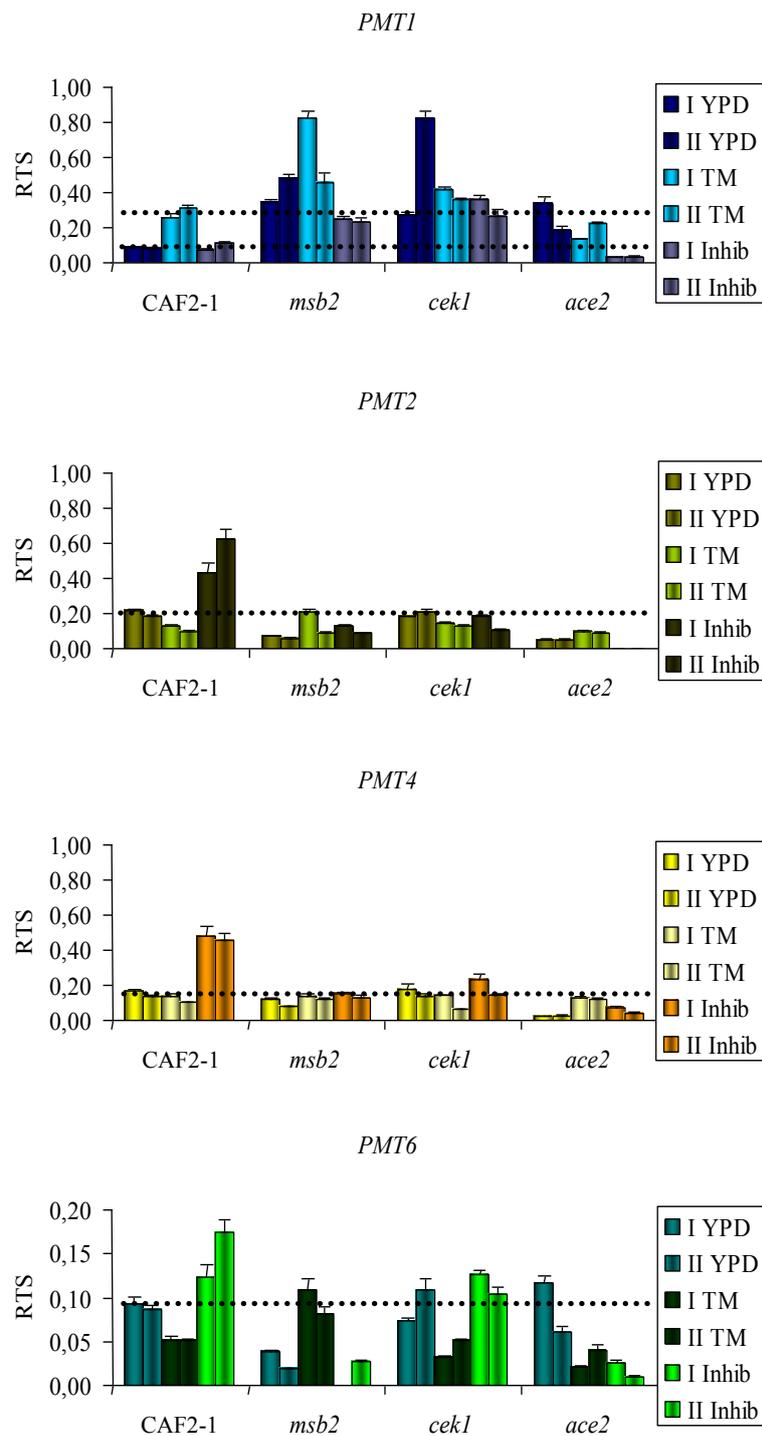
Der Cek1-Weg ist an Wachstum, Hyphenbildung und Zellwandbiogenese beteiligt (Csank *et al.*, 1998; Eisman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009) und besteht bei *C. albicans* aus den Msb2-, Sho1-, Cst20-, Ste11-, Hst7-, Cek1 (MAPK)-Proteinen und dem Cph1-Transkriptionsfaktor (Arana *et al.*, 2008).

Bei *S. cerevisiae* wird Msb2 von Pmt4 und dem Pmt1/Pmt2-Komplex glykosyliert (Yang *et al.*, 2009). *C. albicans* Msb2 wird, hauptsächlich durch Pmt1, ebenfalls hoch glykosyliert (E. Szafranski, pers. Mitteilung). Wird die N-Glykosylierung inhibiert, entstehen Zellwanddefekte, welche durch Msb2 detektiert und zu Cek1 weitergeleitet werden (Román *et al.*, 2009).

In Hinsicht auf diese Daten wurde der relative Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in den *msb2*- und *cek1*-Mutanten, sowohl in der Abwesenheit als auch in der Anwesenheit von Tunicamycin (2 µg/ml) und dem Pmt1-Inhibitor (4 µM), gemessen. Eine Erhöhung des *PMT1*-Transkripts wurde in beiden Mutanten unter allen Bedingungen registriert (Abb. 34). Dagegen zeigten *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte in Bezug auf das Kontrollniveau keine Änderungen. Auffallend ist die Tatsache, dass die *PMT2*- und *PMT4*-Gene nicht mehr induziert werden, wenn die *msb2*- und *cek1*-Mutante mit dem Pmt1-Inhibitor behandelt wurden.

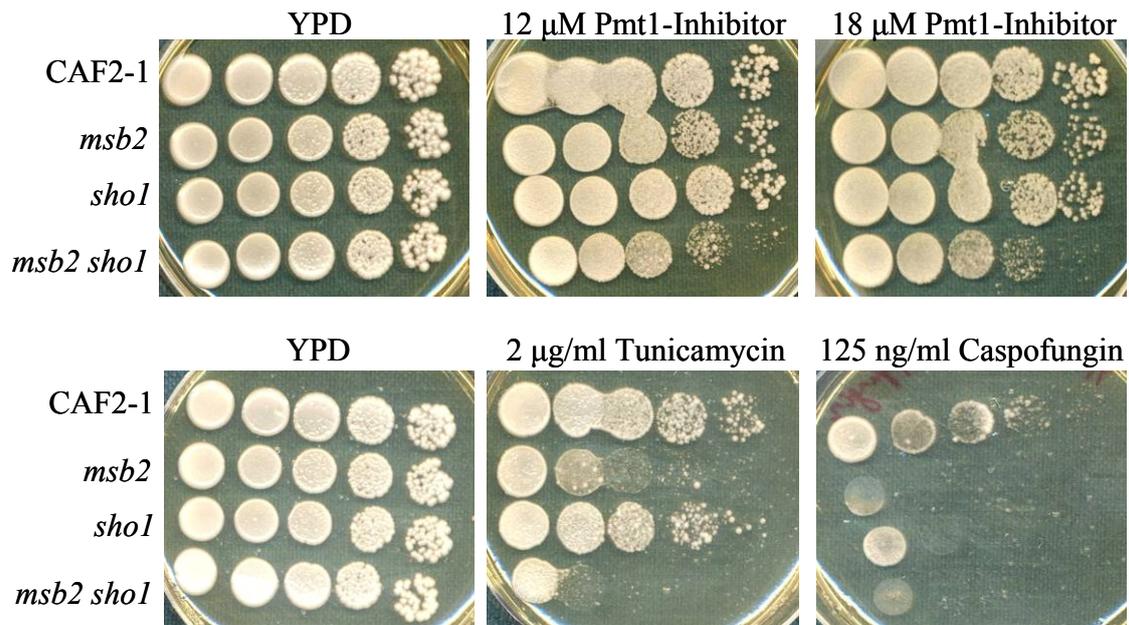
Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass *PMT1* unter normalen Bedingungen durch den Cek1-Weg reprimiert wird und diese Hemmung in Gegenwart von Tunicamycin aufgehoben wird. Außerdem ist dieser Weg wichtig für die Aktivierung von *PMT2* und *PMT4*, wenn Pmt1-spezifische O-Glykosylierung gehemmt wird.

Eine Sensitivitätsanalyse von Mutanten mit Defekten des Cek1-Weges gegen den Pmt1-Inhibitor und Tunicamycin wurde ebenfalls durchgeführt. Die *msb2*-Mutante zeigte keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Pmt1-Inhibitor und war sensitiv gegen Tunicamycin, während die *sho1*-Mutante resistent war. Die *msb2 sho1*-Doppelmutante war für beide Inhibitoren sensitiv (Abb. 35). Die gesteigerte Sensitivität der *cek1*-Mutante gegen den Pmt1-Inhibitor war bereits gezeigt worden (Abschnitt 4.3). Somit verläuft die Antwort auf den Pmt1-Inhibitor hauptsächlich über Msb2 und teilweise über Sho1. Die Cek1 MAP Kinase leitet offenbar die abschließende Reaktion ein.



**Abb. 34: Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in den *msb2*-, *cek1*- und *ace2*-Mutanten.** Die Stämme CAF2-1, FCCa30 (*msb2*), CK43B-16 (*cek1*) und MK106 (*ace2*) wurden auf YPD-Medium ohne und mit Tunicamycin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) und Pmt1-Inhibitor (4  $\mu\text{M}$ ) angezogen und bei 30 °C für vier Stunden wachsen gelassen. Der *PMT*-Transkriptspiegel wurde wie in Abb. 8 beschrieben bestimmt.

**Fig. 34: Transcrito relativo de los genes *PMT* en los mutantes *msb2*, *cek1* y *ace2*.** Las cepas CAF2-1, FCCa30 (*msb2*), CK43B-16 (*cek1*) y MK106 (*ace2*) se inocularon en YPD con y sin tunicamicina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) e inhibidor de Pmt1 (4  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron a 30 °C durante cuatro horas. El transcrito se determinó como se ha descrito en la fig. 8.



**Abb. 35: Sensitivität der homozygoten *msb2*-, *sho1*-, und *msb2 sho1*-Mutanten gegen den Pmt1-Inhibitor, Tunicamycin und Caspofungin.** Die Stämme CAF2-1, FCCa30 (*msb2*), REP3 (*sho1*) und REP21 (*msb2 sho1*) wurden in einer Verdünnungsreihe auf Sensitivität gegenüber dem Pmt1-Inhibitor (12 und 18 µM), Tunicamycin (2 µg/ml) und Caspofungin (125 ng/ml) getestet. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert.

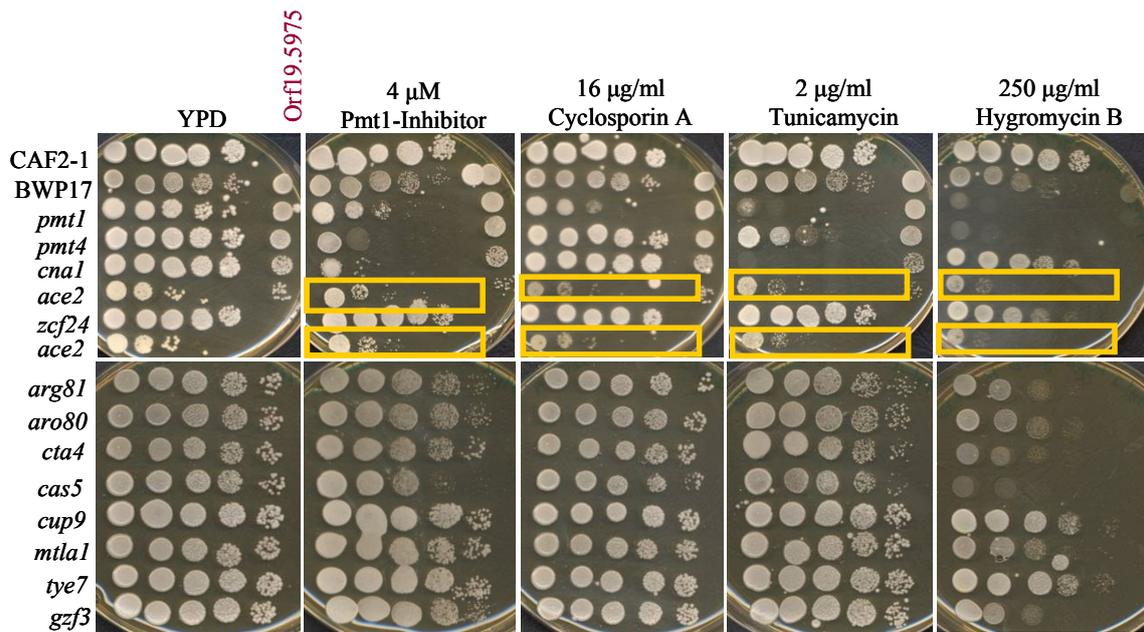
**Fig. 35: Ensayo de sensibilidad de los mutantes *msb2*, *sho1* y *msb2 sho1* en presencia del inhibidor de Pmt1, de tunicamicina y de caspofungina.** El crecimiento de las cepas CAF2-1, FCCa30 (*msb2*), REP3 (*sho1*) y REP21 (*msb2 sho1*) se analizó en un ensayo de sensibilidad en presencia del inhibidor de Pmt1 (12 y 18 µM), tunicamicina (2 µg/ml) y caspofungina (125 ng/ml). Las placas se fotografiaron después de 48 horas a 30 °C.

#### 4.3.3 Suche nach Transkriptionsfaktoren, die bei defekter *O*-Mannosylierung benötigt werden

In den zwei vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Calcineurin- und Cek1-Wege eine deutliche Rolle bei der Regulation der *PMT*-Gene spielen. Es wurde auch festgestellt, dass die bekannten Transkriptionsfaktoren Crz1 und Crz2 stromabwärts von Calcineurin nicht an dieser Regulation beteiligt sind. Mögliche Zielproteine stromabwärts des MAPK Cek1 (z.B. Cph1) wurden in dieser Arbeit nicht getestet. Um die Beteiligung dieses Proteins und noch unbekannter Transkriptionsfaktoren an der Regulation der *PMT*-Gene zu klären, wurde eine Sammlung von Mutanten mit Defekten in allen möglichen und bekannten Transkriptionsfaktoren (D.Sanglard und A. Mitchell)

auf Sensitivität gegenüber dem Pmt1-Inhibitor überprüft. Die 328 Stämme sowie die CAF2-1-, BWP17-, SPCa2 (*pmt1*)- und SPCa6 (*pmt4*)-Stämme als Kontrollen, wurden auf YPD-Medium, YPD + 4  $\mu$ M Pmt1-Inhibitor, YPD + 16  $\mu$ g/ml Cyclosporin A, und YPD + 200  $\mu$ g/ml Hygromycin B ausgestrichen und das Wachstum nach 24, 48 und 72 Stunden beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diejenige Mutanten, die nach 48 Stunden einen leichten Wachstumsdefekt zeigten, wurden in einem Verdünnungsreihen-Tropftest auf den gleichen Medien überprüft. Unter den Mutanten, die sich im ersten Screening als sensitiv erwiesen hatten, befanden sich zehn Stämme: CJN432 (*orf19.4670, cas5*), DSY1691 (*orf19.7374, cta4*), CJN401 (*orf19.4766, arg81*), HZY29 (*orf19.3012, aro80*), DSY3423-6 (*orf19.6124, ace2*), HZY20 (*orf19.5975, unbekannt*), DSY3425-9 (*orf19.4524, zcf24*), SFY32 (*orf19.4941, tye1*), DSY4175-A (*orf19.3201, mtl1*) und DSY4176-A (*orf19.6514, cup9*). Es ergab sich in den ausgetropften Verdünnungsreihen aber nur ein deutlicher und reproduzierbares Wachstumsdefekt für die *ace2*-Mutante, wenn das Medium den Pmt1-Inhibitor enthielt (Abb. 36).

Bei *S. cerevisiae* sind die Transkriptionsfaktoren Ace2 und Swi5 wichtig für die Regulation der Zellzyklus und der Synthese der Zellwand. Bei *C. albicans* wurde ein homologes Protein beider Faktoren identifiziert, welches Ace2 genannt wurde (Kelly *et al.*, 2004). Die *ace2*-Mutante zeigt bei *C. albicans* Defekte in der Zelltrennung, untypisches Pseudohyphen-Wachstum, gesteigerte Invasion in Agar, verringerte Adhäsion an Plastikoberflächen, veränderte Biofilmbildung und Avirulenz in einem Maus-Infektionsmodell (Kelly *et al.*, 2004). Einige dieser Phänotypen stimmen mit denjenigen der *pmt1*-Mutante überein. Dieser Transkriptionsfaktor war schon in der Analyse der *PMT1*-Promotorbereich vermutet worden, obwohl keine direkte Bindung nachgewiesen werden konnte (Abb. 22).



**Abb. 36: Sensitivität von Transkriptionsfaktoren-Mutanten gegenüber verschiedenen Inhibitoren.** Die Stämme CJN432 (*orf19.4670, cas5*), DSY1691 (*orf19.7374, cta4*), CJN401 (*orf19.4766, arg81*), HZY29 (*orf19.3012, aro80*), DSY3423-6 (*orf19.6124, ace2*), HZY20 (*orf19.5975, unbekannt*), DSY3425-9 (*orf19.4524, zcf24*), SFY32 (*orf19.4941, tye1*), DSY4175-A (*orf19.3201, mtl1*) und DSY4176-A (*orf19.6514, cup9*) wurden auf YPD-Medium mit dem Pmt1-Inhibitor (4 µM), Tunicamycin (2 µg/ml), Cyclosporin A (16 µg/ml) und Hygromycin B (250 µg/ml) in einer Verdünnungsreihe getropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert.

**Fig. 36: Ensayo de sensibilidad de los mutantes de factores de transcripción preseleccionados frente a diversos inhibidores.** El crecimiento de las cepas CJN432 (*orf19.4670, cas5*), DSY1691 (*orf19.7374, cta4*), CJN401 (*orf19.4766, arg81*), HZY29 (*orf19.3012, aro80*), DSY3423-6 (*orf19.6124, ace2*), HZY20 (*orf19.5975, desconocido*), DSY3425-9 (*orf19.4524, zcf24*), SFY32 (*orf19.4941, tye1*), DSY4175-A (*orf19.3201, mtl1*) y DSY4176-A (*orf19.6514, cup9*) se analizó en presencia de inhibidor de Pmt1 (4 µM), tunicamicina (2 µg/ml), ciclosporina A (16 µg/ml) e higromicina B (250 µg/ml). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

#### 4.3.4 Untersuchungen zur Regulation der *PMT*-Gene durch *Ace2*

Die Transkriptomanalyse der *ace2*-Mutante, sowohl in der Hefeform als auch in der Hyphenform, zeigte, dass die gleichen Gruppen von Genen reguliert werden: Transkriptspiegel von Genen, die Glukanasen, Proteine mit einem GPI-Anker und glykolytische Enzyme kodieren, werden erniedrigt, und Gene, deren Produkte an Atmungsprozessen teilnehmen, werden überexprimiert. Gene des Acetyl-CoA- und des Lipidmetabolismus werden dagegen in der Hefeform der *ace2*-Mutante induziert und in

der Hyphenform reprimiert (Mulhern *et al.*, 2006). Unter den regulierten Genen wurden *PMT2*-, *PMT4*-, und *PMT6*-Gene identifiziert. Die Transkriptspiegel aller drei *PMT*-Gene wurden in der *ace2*-Mutante in der Hefeform erniedrigt.

Um den Effekt von Ace2 auf die *PMT*-Gene genauer zu untersuchen, wurde der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der *ace2*-Mutante gemessen. Außerdem wurde das *ACE2*-Gen in der *pmt1*-Mutante überexprimiert, um zu testen, ob dies den Phänotyp der *pmt1*-Mutante aufheben kann.

#### 4.3.4.1 Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in der *ace2*-Mutante

Die Transkriptomergebnisse hatten gezeigt, dass das Ace2 Protein ein positiver Faktor für die Expression einiger *PMT*-Gene ist. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde die Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in einer *ace2*-Mutante durch qPCR bestimmt.

Die *ace2*-Mutante MK106 (Kelly *et al.*, 2004) wurde hierfür mit Tunicamycin und dem Pmt1-Inhibitor behandelt. Das basale Niveau des *PMT1*-Transkripts war leicht höher als im Wildtyp CAF2-1 und die Behandlung mit Tunicamycin verursachte (anders als im Wildtyp) keine deutliche Erhöhung der *PMT1*-Expression. Dagegen wurde diese in der *ace2*-Mutante durch den Pmt1-Inhibitor deutlich reduziert (Abb. 34). Das *PMT2*-Gen zeigte in der *ace2*-Mutante mit und ohne Inhibitoren niedrigere Transkriptspiegel als der Wildtyp. Auch die basale Expression des *PMT4*-Gens war niedriger in der *ace2*-Mutante und es kam zu keiner Überexpression als Antwort auf den Pmt1-Inhibitor (Abb. 34). Die niedrigere Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene in der *ace2*-Mutante stimmt mit dem Ergebnis der Transkriptomanalyse (Mulhern *et al.*, 2006) überein. Die dabei beschriebene Repression von *PMT6* konnte hier nicht nachgewiesen werden, obwohl das *PMT6*-Transkript in Anwesenheit von Tunicamycin und dem Pmt1-Inhibitor erniedrigt war.

Diese Daten beweisen die Regulation der *PMT*-Gene durch den Transkriptionsfaktor Ace2. Ace2 reprimiert das *PMT1*-Gen leicht in normalen Wachstumsbedingungen und es wird für die gesteigerte Expression von *PMT1* bei defekter *N*-Glykosylierung benötigt. Zusätzlich wird Ace2 bei defekter Pmt1-*O*-Mannosylierung gebraucht, um den basalen *PMT1*-Expressionswert zu erreichen. Im Gegensatz dazu ist Ace2 nicht nur für die basale Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene nötig, sondern auch für deren gesteigerte Expression als Antwort auf die Hemmung der Pmt1 *O*-Glykosylierung.

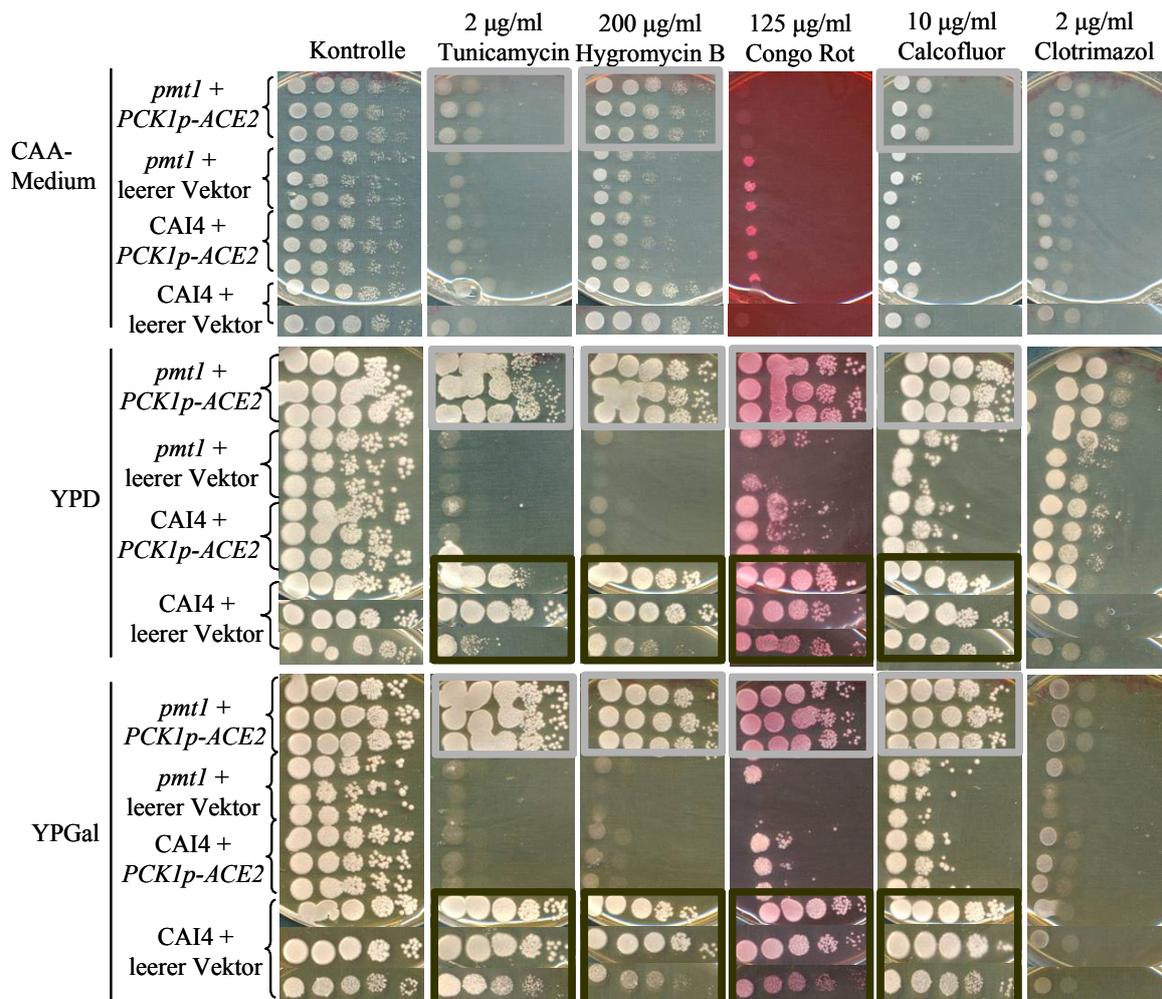
#### 4.3.4.2 Überexpression von *ACE2* in der *pmt1*-Mutante

Wenn Ace2 tatsächlich eine wichtige Komponente des Antwortweges auf defekte *N*-glykosylierung ist, kann erwartet werden, dass die Überexpression von *ACE2* zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Tunicamycin führt. Die Rolle des Ace2-Transkriptionsfaktors wurde bisher bei *S. cerevisiae* (Sbia *et al.*, 2008), *C. albicans* (Kelly *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006), *C. glabrata* (Kamran *et al.*, 2004) und *A. fumigatus* (Ejzykowicz *et al.*, 2009) untersucht, allerdings ist der Effekt einer Überexpression nicht beschrieben worden.

Das *ACE2*-Gen wurde für diese Experimente unter die Kontrolle des starken *PCK1*-Promotors kloniert (Leuker *et al.*, 1997). Die kodierende Region des *ACE2*-Gens wurde mit den Oligonukleotiden *Bgl*IIACE2for und *Bgl*IIACE2rev amplifiziert und in die *Bgl*II Stelle des Plasmids pBI-1 kloniert (erhaltenes Plasmid pPdC54). Der *PCK1*-Promotor wird in CAA-Medium induziert (bzw. dereprimiert) und in der Anwesenheit von Glukose reprimiert (Leuker *et al.*, 1997).

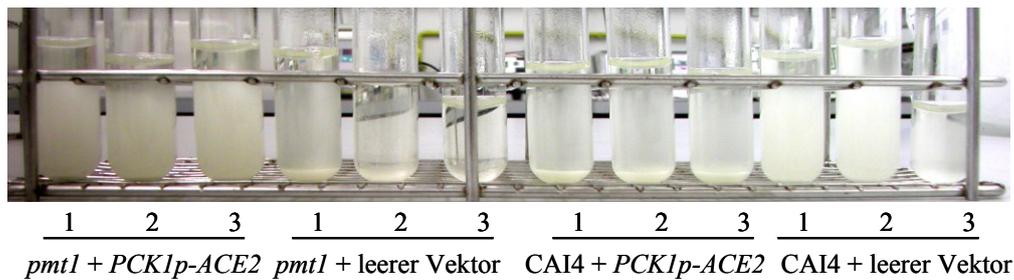
pBI-1 als Kontrollvektor und pPdC54 wurden in die Stämme CAI4 (Wildtyp) und CAP1-3121 (*pmt1*) transformiert. Jeweils drei Transformanten wurden auf SD-Medium angezogen und auf nicht-induzierendes YPD-Medium oder induzierendes CAA-Medium bzw. YPGal ohne und mit Inhibitoren (Tunicamycin, Congo Rot, Calcofluor, Hygromycin B und Clotrimazol) in einem Verdünnungsreihentest aufgetropft (Abb. 37). Die Überexpression von *ACE2* in der *pmt1*-Mutante konnte alle *pmt1*-Phänotypen aufheben, sogar unter der *PCK1*-Promotor-reprimierenden Bedingung mit Glukose. Somit ist die basale Expression des *PCK1*-Promotors ausreichend, um die Phänotypen der *pmt1*-Mutanten zu unterdrücken. Die Flokkulation der *pmt1*-Mutante wurde durch *ACE2*-Überexpression supprimiert (Abb. 38). Ein unerwartetes Ergebnis dieses Experiments war, dass *ACE2*-Überexpression in dem Stamm CAI4 das Wachstum hemmte und einen Flokkulationsdefekt verursachte.

Hiermit wurde bestätigt, dass Ace2 die Antwort auf defekte Pmt1-*O*-Mannosylierung reguliert.



**Abb. 37: Wirkung von Inhibitoren bei Überexpression des *ACE2*-Gens.** Die *pmt1*-Mutante (CAP1-3121) und der Wildtyp (CAI4) wurden in einer Verdünnungsreihe-Tropftest mit Plasmiden pBI-1 (leerer Vektor) und pPdC54 (*ACE2*-Expression unter der Kontrolle des *PCK1*-Promotors) getestet. Die Transformanten wurden über Nacht auf SD-Medium angezogen und die Verdünnungen auf CAA-, YPD- und YPGal-Medien mit 2 µg/ml Tunicamycin, 125 µg/ml Congo Rot, 200 µg/ml Hygromycin B, 10 µg/ml Calcofluor und 2 µg/ml Clotrimazol getropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert. Mit Rahmen werden die *pmt1*-Mutante mit *ACE2*-Überexpression und Wildtyp mit leerem Vektor gekennzeichnet.

**Fig. 37: Efecto de sustancias inhibitoras del crecimiento y sobreexpresión del gen *ACE2*.** El mutante *pmt1* (CAP1-3121) y la cepa CAI4 se transformaron con los plásmidos pBI-1 (plásmido vacío) y pPdC54 (expresión de *ACE2* bajo el control del promotor *PCK1*). Los transformantes se inocularon en medio mínimo y posteriormente se analizaron mediante ensayos de sensibilidad en los medios CAA, YPD y YPGal con 2 µg/ml tunicamicina, 125 µg/ml rojo Congo, 200 µg/ml higromicina B, 10 µg/ml calcoflúor y 2 µg/ml clotrimazol. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Con un marco se han recuadrado el comportamiento del mutante *pmt1* tras la sobreexpresión de *ACE2* y de la cepa control transformada con el vector vacío.



**Abb. 38: Flokkulation bei Überexpression von *ACE2*.** Die Übernachtskulturen der in Abb. 37 beschriebenen transformierten *pmt1*- und CAI4-Stämme wurden bei Raumtemperatur stehen gelassen und nach einer Stunde fotografiert.

**Fig. 38: Floculación debida a la sobreexpresión del gen *ACE2*.** Los preinóculos del mutante *pmt1* y la cepa CAI4 transformados con el vector de sobreexpresión del gen *ACE2*, utilizados en el ensayo de sensibilidad (Fig. 37), se dejaron en reposo a temperatura ambiente y se fotografiaron tras una hora.

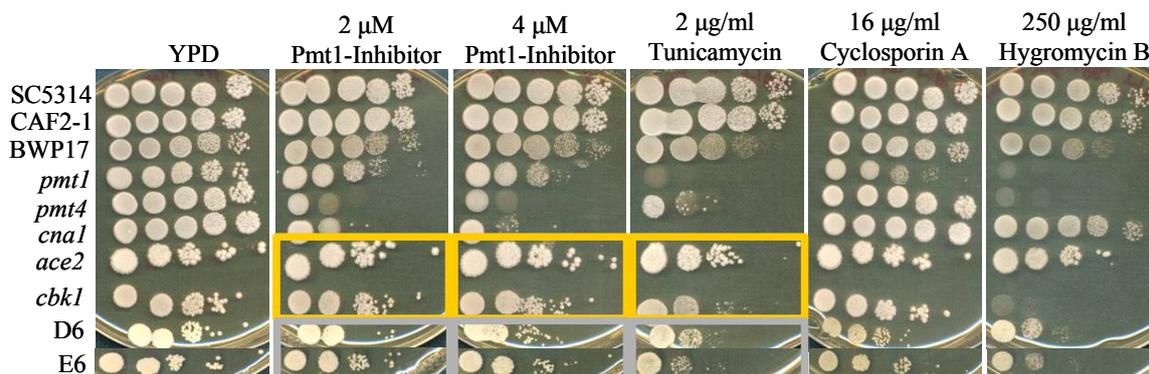
#### 4.3.4.3 Der RAM-Signalweg

Bislang wurde Ace2 nur als Zieltranskriptionsfaktor des RAM-Weges identifiziert. Der RAM (Regulation des Ace2-Transkriptionsfaktors und der polarisierten Morphogenese)- Signalweg reguliert das polarisierte Zellwachstum und wird in Eukaryoten hoch konserviert. Er besteht bei *C. albicans* aus den Kic1, Cbk1, Mob2, Pag1, Hym1 und Sog2 Proteinen (Song *et al.*, 2008). Die entsprechenden Mutanten sind lebensfähig und zeigen die gleichen Defekte, wie Hypersensitivität gegenüber Zellwand- oder Membran-destabilisierenden Substanzen, welche durch osmotische Stabilisierung teilweise supprimiert werden. Außerdem bilden diese Zellaggregate und Mutter- und Tochterzellen bleiben nach der Mitose zusammen, da das Septum nicht abgebaut wird. Der Verlust an Zellpolarität äußert sich in der Unfähigkeit Hyphen zu bilden.

Um eine mögliche Rolle des RAM-Weges an der Antwort auf defekte *O*-Mannosylierung und *N*-Glykosylierung zu untersuchen, wurde eine Mutante für eine Komponente des RAM-Weges, Cbk1, auf ihre Inhibitor-Sensitivität getestet. Cbk1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die zu der Superfamilie AGC Kinasen gehört (McNemar & Fonzi, 2002). Die homozygote *cbk1*-Mutante aber nicht der heterozygote *cbk1/CBK1*-Stamm zeigt ein langsames Wachstum als der Wildtyp und keine Hyphenbildung auf Lee-, Spider- und 10 % Serum-Medien (McNemar & Fonzi, 2002; Song *et al.*, 2008). Weil die *cbk1*-Mutante auf flüssigem Medium Aggregate bildete, wurde die Expression

einiger Zellwandgene untersucht. Tatsächlich waren die *CHT2*- und *CHT3*-Transkripte (Chitinasen) in der Mutante erniedrigt (McNemar & Fonzi, 2002). Es ist auch beschrieben worden, dass Cbk1 mit Mob2 physisch interagiert (Song *et al.*, 2008).

Eine leichte Sensitivität wurde gegen den Pmt1-Inhibitor beobachtet (Abb. 39). Die *cbk1*-Mutante war außerdem hypersensitiv gegenüber Tunicamycin und Hygromycin B. Diese Phänotypen der *cbk1*-Mutante stimmen mit Ausnahme der Hygromycin B-Sensitivität mit denjenigen der *ace2*-Mutante überein. In diesem Tropftest wurden zwei verschiedene *ace2*-Mutanten untersucht. Die MK106-Mutante (Kelly *et al.*, 2004) und die DSY3423-9-Mutante (als E6 gekennzeichnet, Duplikat D6), die durch die *URA3*-Kassette-Methode aus dem BWP17-Stamm hervorgegangen ist (D. Sanglard und A. Mitchell). Wegen des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds variiert die Sensitivität der Mutanten, wobei der Stamm MK106 resistenter als der Stamm DSY3423-9 ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cbk1 und Ace2 in einem gemeinsamen Signalweg liegen, der die Antwort auf defekte Proteinglykosylierung steuert.



**Abb. 39: Wirkung von Inhibitoren auf die *cbk1*- und andere Mutanten.** Die Stämme SC5314, CAF2-1, BWP17 (Kontrollen), SPCa2 (*pmt1*), SPCa6 (*pmt4*), DSY2091 (*cna1*), MK106 (*ace2*), CAMM-292-4 (*cbk1*) und DSY3423-9 (*ace2*; auf dem Foto D6 und E6 benannt) wurden auf YPD-Medium ohne und mit Pmt1-Inhibitor (2 und 4 µM), Tunicamycin (2 µg/ml), Cyclosporin A (16 µg/ml) und Hygromycin B (250 µg/ml) in einer Verdünnungsreihe getropft. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert.

**Fig. 39: Ensayo de sensibilidad del mutante *cbk1* y otros mutantes.** El crecimiento de las cepas SC5314, CAF2-1, BWP17 (controles), SPCa2 (*pmt1*), SPCa6 (*pmt4*), DSY2091 (*cna1*), MK106 (*ace2*), CAMM-292-4 (*cbk1*) y DSY3423-9 (*ace2*; en la foto D6 y E6) se analizó mediante un ensayo de sensibilidad con las siguientes sustancias: inhibidor de Pmt1 (2 y 4 µM), tunicamicina (2 µg/ml), ciclosporina A (16 µg/ml) e higromicina B (250 µg/ml). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

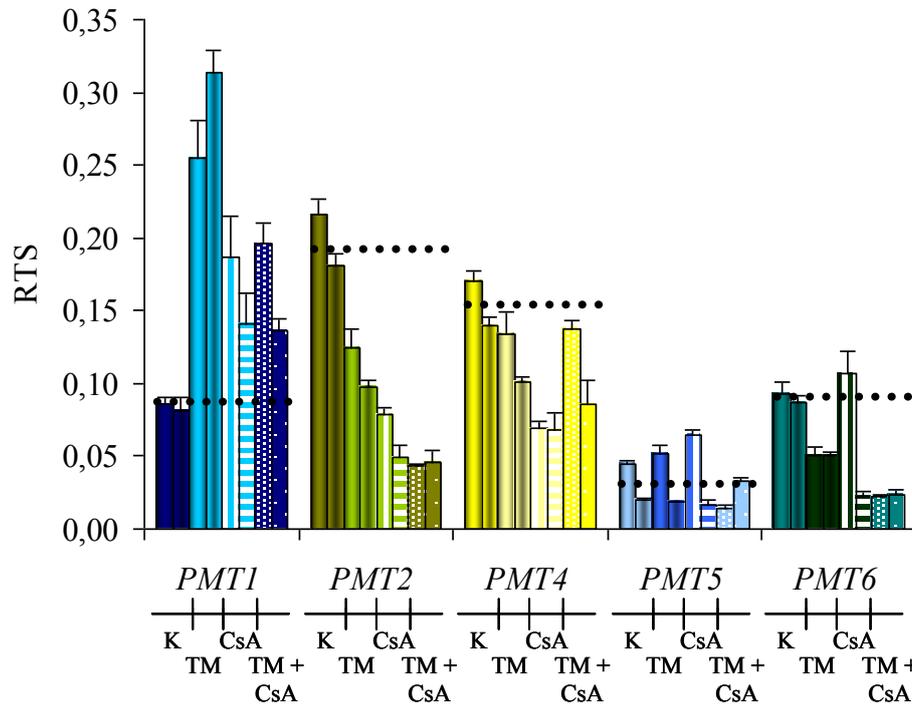
#### 4.3.5 Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in Anwesenheit von Tunicamycin und Cyclosporin A

Die Ergebnisse der Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in den *cnal*-, *msb2*- und *cek1*-Mutanten lassen vermuten, dass sowohl der Calcineurin- als auch der Cek1-Weg das *PMT1*-Gen unter normalen Bedingungen reprimieren, während beide Wege für die basale und Pmt1-Inhibitor-induzierte Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene nötig sind. Außerdem scheint die Hemmung der *N*-Glykosylierung durch Tunicamycin das *PMT1*-Gen zu dereprimieren, wobei Cek1 phosphoryliert wird (Román *et al.*, 2009). Dudgeon *et al.* (2008) zeigten, dass der Calcineurin-Weg als Antwort auf Tunicamycin-Stress aktiviert wird, und dass die gleichzeitige Behandlung mit Tunicamycin und FK506 oder Cyclosporin A zum Zelltod führte. Es sollte daher überprüft werden, ob synthetische Phänotypen und entsprechende Änderungen der *PMT*-Expression entstehen, wenn Zellen gleichzeitig mit Tunicamycin (Derepression des *PMT1*-Gens, Aktivierung des Cek1-Weges) und Cyclosporin A (Inhibition des Calcineurin-Weges) behandelt werden. Tunicamycin verursacht ER Stress und aktiviert dadurch den Mpk1 (Mkc1 in *C. albicans*) MAP Kinase-Weg (Cohen *et al.*, 2008). Bemerkenswert ist, dass dieser Weg bei den *pmt*-Mutanten als Antwort auf Tunicamycin-Stress nicht aktiviert wird (Román *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde der Wildtyp-Stamm CAF2-1 mit 2 µg/ml Tunicamycin und 4 µg/ml Cyclosporin A, einzeln und gemeinsam, in YPD-Medium angezogen und für vier Stunden wachsen gelassen. Nach dieser Zeit hatten die Kulturen folgenden OD<sub>600</sub>: Wildtyp in YPD-Medium ohne Inhibitoren 0,507 bzw. 0,550; Wildtyp in YPD-Medium mit Tunicamycin 0,492 bzw. 0,485; Wildtyp in YPD-Medium mit Cyclosporin A 0,497 bzw. 0,454 und Wildtyp in YPD-Medium mit Tunicamycin und Cyclosporin A 0,272 bzw. 0,232. Das Wachstum in Anwesenheit beider Substanzen war gemäß dem synthetischen Phänotyp gehemmt.

Der *PMT1*-Transkript verhielt sich mit beiden Inhibitoren wie nur in Anwesenheit von Cyclosporin A, d.h., dass die Derepression des *PMT1*-Gens durch Tunicamycin abhängig von Calcineurin ist (Abb. 40). Der *PMT2*-Transkriptspiegel wurde sowohl in Anwesenheit von Tunicamycin als auch von Cyclosporin A erniedrigt. Die Zugabe von beiden Substanzen schien einen leichten synergistischen Effekt zu verursachen. Eine Inhibierung der Expression des *PMT4*-Gens ist nur mit Cyclosporin A deutlich. Das Transkript des *PMT4*-Gens in Anwesenheit von beiden Inhibitoren tendiert aber zu den

Werten des Transkripts nur mit Tunicamycin, d.h., dass die Antwort auf Tunicamycin wahrscheinlich unabhängig von Calcineurin ist.



**Abb. 40: Transkriptspiegel der *PMT*-Gene in Anwesenheit von 2 µg/ml Tunicamycin, 4 µg/ml Cyclosporin A und beiden Substanzen.** Der Stamm CAF2-1 wurde auf YPD-Medium ohne und mit Tunicamycin (2 µg/ml), Cyclosporin A (4 µg/ml) und beiden Substanzen (2 µg/ml Tunicamycin und 4 µg/ml Cyclosporin A) inokuliert. Die Kulturen wurden bei 30 °C für vier Stunden wachsen gelassen. Die Zellen wurden geerntet, die gesamte RNA isoliert und eine qPCR durchgeführt wie in Abschnitt 3.8.10.4 beschrieben. K: Kontrolle (YPD-Medium). TM: Tunicamycin. CsA: Cyclosporin A.

**Fig. 40: Transcrito de los genes *PMT* en presencia de 2 µg/ml de tunicamicina, 4 µg/ml CsA y ambas sustancias.** La cepa CAF2-1 se inoculó en medio YPD en presencia y ausencia de 2 µg/ml de tunicamicina, de 4 µg/ml CsA y de ambas sustancias a las concentraciones indicadas. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante cuatro horas. Se recogieron las células, se extrajeron el ARN total y se llevó a cabo la PCR cuantitativa tal y como se ha descrito en el apartado 3.8.10.4.



---

## 5 Diskussion

In vorherigen Arbeiten über die *PMT*-Gene und die Pmt-Proteine bei *C. albicans* wurde nachgewiesen, dass diese Isoform-spezifische Funktionen haben, und dass der Verlust einer Isoform nicht durch die Überproduktion einer anderen Isoform komplementiert werden kann (Timpel *et al.*, 2000; Prill *et al.*, 2005). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation der *PMT*-Gene auf verschiedenen Ebenen und die Untersuchung der Signalwege, die die defekte *O*-Mannosylierung detektieren und/oder darauf antworten.

### 5.1 Regulation der *PMT*-Gene auf der Transkriptionsebene

#### 5.1.1 Die *PMT2*- und *PMT4*-Gene werden induziert als Antwort auf defekte Pmt1-spezifische *O*-Mannosylierung

Die Messung der *PMT*-Transkripte in den *pmt*-Mutanten zeigte in der *pmt1*-Mutante eine Induktion des *PMT2*-Gens (Abschnitt 4.1.1). Die Hemmung der Pmt1-Glykosylierung durch den Pmt1-Inhibitor verursachte ebenfalls eine Erhöhung des *PMT2*-Transkripts (Abschnitt 4.1.4). Die Pmt1- und Pmt2-Proteine bilden bei *C. albicans* homo- und heterodimere Komplexe (Schmidt, 2007; Pilkahn-Reh, 2009). Bei *S. cerevisiae* bilden Pmt1 und Pmt2 einen heterodimeren Komplex, wenn eine der beiden Isoformen fehlt, können alternativ die Pmt1-Isoform mit Pmt3 und die Pmt2-Isoform mit Pmt5 interagieren (Girrbach & Strahl, 2003). Ähnliche Interaktionen wurden bisher bei *C. albicans* nicht beschrieben. Die Induktion des *PMT2*-Transkriptspiegels, bei fehlender oder blockierter Pmt1 *O*-Mannosylierung, lässt daher vermuten, dass der Verlust der Pmt1-Aktivität durch eine Erhöhung der Pmt2-Homodimerbildung ausgeglichen wird.

In der Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors, aber nicht in der *pmt1*-Mutante, wird das *PMT4*-Gen induziert (Abb. 11). Dieser Unterschied in der Regulation des *PMT4*-Gens könnte den Unterschied zwischen einer schnellen Antwort (Pmt1-Inhibitor) und einer langzeit-Adaptation (*pmt1*-Mutante) widerspiegeln. Die Deletion des *PMT1*-Gens verursacht drastische Änderungen sowohl in der Zellwand des Pilzes als auch in seinem Zucker-Metabolismus (Prill, 2004). Dazu kommt, dass die *pmt1 pmt4*-Doppelmutante nicht lebensfähig ist (Prill *et al.*, 2005). Letale Doppelmutationen deuten eine Rolle der

Proteine entweder in parallelen redundanten Wegen oder als kompensatorisch wirkende Komponenten in demselben essentiellen Weg an (Tucker & Fields, 2003). Da einerseits *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten unterschiedliche Transkriptome haben und andererseits beide die Expression der Glykolysegene stimulieren, sind beide Proteine wahrscheinlich an parallelen Wegen beteiligt.

Die Transkriptänderungen in der *pmt2/PMT2*-Mutante (Prill, 2004; Abschnitt 4.1.1) deuten ebenfalls eine kompensatorische Antwort des Pmt4 Proteins an, da der *PMT4*-Transkriptspiegel erhöht wird. Weil der *PMT1*-Transkriptspiegel in der *pmt2/PMT2*-Mutante nicht verändert wird, ist möglicherweise noch genug Pmt2 Protein zur Ausbildung eines Pmt1-Pmt2 Komplexes vorhanden. Die geringe Pmt2-Aktivität bzw. das Fehlen eines Pmt2-Homodimeres würde dagegen durch die Überexpression des *PMT4*-Gens kompensiert. Eine gesteigerte Pmt4 *O*-Glykosylierung scheint deswegen eine „Rettungsmodifikation“ bei defekter Pmt1- und Pmt2-Glykosylierung zu sein.

### **5.1.2 *PMT4* in der Hefeform und *PMT1* in der Hyphenform sind bei 37 °C die am höchsten exprimierten *PMT*-Gene**

Die Messung der *PMT*-Transkriptspiegel zeigte, dass die Expression der *PMT1*- und *PMT2*-Unterfamilie mit zunehmender Temperatur reprimiert wird, während das *PMT4*-Gen induziert wird (Abschnitt 4.1.2). Auch in anderen Pilzen wurde ein Effekt der Temperatur auf die *PMT*-Genexpression beschrieben. Bei *C. neoformans* wird das *PMT4*-Gen bei 39 °C reprimiert, dagegen wird es in der Anwesenheit von Amphotericin B bei 39 °C induziert (Olson *et al.*, 2007). Bei *A. fumigatus* werden Wachstum und Zellwandintegrität einer *pmt1*-Mutante nicht bei 37 °C sondern bei höheren Temperaturen beeinträchtigt; deswegen wird die Virulenz im Mausmodell nicht betroffen (Zhou *et al.*, 2007). Die Effekte von Zellwand-destabilisierenden Substanzen ist bei *A. nidulans* abhängig von der Temperatur (Kriangkripiat & Momany, 2009).

Das wichtigste Ergebnis ist für *C. albicans*, dass bei 37 °C *PMT4* und *PMT1* die am höchsten exprimierten Gene in der Hefeform bzw. in der Hyphenform sind. Die Temperatur von 37 °C ist ein Virulenzfaktor, da sie nötig ist, um die Hyphenbildung zu induzieren (Shapiro *et al.*, 2009). Die Transkriptomanalyse der *pmt4*-Mutante zeigte, dass hauptsächlich Gene der Protein-Synthese induziert wurden (Prill, 2004). Daher wäre es möglich, dass die Induktion von *PMT4* in der Hefeform bei 37 °C unter anderem das Ziel hat, eine korrekte Proteinsynthese zu gewährleisten.

Die Überexpression des *PMT1*-Gens in der Hyphenform reflektiert dagegen die Bedeutung von Pmt1 für die Virulenz von *C. albicans*. Hyphen sind die invasive Form von *C. albicans* und die Hefe-Hyphe-Umwandlung benötigt eine Zellwandrestrukturierung, in die das *PMT1*-Gen involviert ist. Dafür spricht, dass die *pmt1*-Mutante einige Zellwandproteine unterglykosyliert, eine sehr eingeschränkte Filamentierungsfähigkeit hat (Timpel *et al.*, 1998; Timpel *et al.*, 2000, Prill *et al.*, 2005), avirulent ist (Rouabhia *et al.*, 2005), und dass die Expression des *PMT1*-Gens in der Hyphen-Induktion induziert wird (Abschnitt 4.1.3).

### 5.1.3 *PMT*-Gene und Glykosylierungs- und Zellwanddefekte

Die Zellwand ist essentiell für die Pilzzellen. Alle Änderungen derselben werden detektiert und kompensatorische Antworten werden aktiviert. Als kompensatorische Antworten treten normalerweise eine Erhöhung der Glukan- und Chitin-Synthese und die Zunahme der Transkription und Anlagerung von Zellwandproteinen auf, um das Glukan vor lytischen Enzymen zu schützen (Smits *et al.*, 2001). Die Analyse der Zellwand der *pmt*-Mutanten ergab deutliche Änderungen in der Zusammensetzung der Chitin-, Glukan- und Mannoproteingehalte (Prill *et al.*, 2005). Sowohl die *pmt1*- als auch die *pmt4*-Mutante zeigten eine große Erhöhung des  $\beta$ 1,3-Glukangehalts. Der Unterschied zwischen den absoluten Glukan-Werten des heterozygoten *pmt2/PMT2*-Stamms im Vergleich zum Wildtyp war nicht sehr groß, es ergab sich jedoch insgesamt eine Zunahme des Verhältnisses von  $\beta$ 1,3/  $\beta$ 1,6-Glukan von 1,9 im Wildtyp-Stamm zu 2,7 in den drei Mutanten. Die *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten zeigten ebenfalls signifikante Erniedrigungen der Mannoproteingehalte, während bei dem heterozygoten Stamm *pmt2/PMT2* der Chitingehalt stark reduziert wurde (Prill *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde die Expression von Zellwandgenen und von Glykosylierungsgenen in der Transkriptomanalyse der *pmt*-Mutanten nicht deutlich reguliert. Nur in der *pmt2/PMT2*-Mutante wiesen *KRE1* ( $\beta$ 1,6-Glukansynthese) und *CHS21* (Chitinsynthese) eine verminderte Expression auf. In der *pmt5*-Mutante wurden dagegen die *MNT1*- und *MNT2*-Gene stark exprimiert (Prill, 2004).

Die Transkriptanalyse der *PMT*-Gene unter den verschiedenen Zellwanddestabilisierenden Bedingungen (Tunicamycin, Congo Rot, *chs7*-Mutante) und in den Glykosylierungsmutanten (*alg5*-, *gda1*-, *mnt1*- und *och1*-Mutanten) lässt allgemein vermuten, dass das *PMT1*-Gen bei Zellwanddefekten induziert wird, während die

anderen *PMT*-Gene unter spezifischen Bedingungen reguliert werden (Abschnitte 4.1.4 und 4.1.5).

Zwei mögliche Theorien könnten die Induktion des *PMT1*-Gens erklären: a) die Induktion des *PMT1*-Gens, wenn die Zellwand defekt ist, hätte das Ziel, eine effizientere *O*-Mannosylierung sicherzustellen, weil Pmt1 viele Zellwandproteine *O*-mannosyliert. Somit würde die Pmt1-vermittelte *O*-Mannosylierung eine strukturelle Rolle spielen. b) Die Pmt1-*O*-Mannosylierung könnte wichtig für die korrekte Faltung der Proteine durch den sekretorischen Weg sein. Kürzlich wurde beschrieben, dass der UPR-Weg eine wichtige Rolle in der Zellwandbiogenese spielt, sogar in Abwesenheit externer Stressbedingungen (Blankenship *et al.*, 2010). Interessanterweise ergab sich aus der Transkriptomanalyse der *pmt1*-Mutante, dass Gene des UPR-Weges induziert wurden (Prill, 2004). Somit würde Pmt1 bei diesem Vorgang eine regulatorische statt einer strukturellen Funktion haben.

Das *PMT2*-Transkript wurde in Anwesenheit von Tunicamycin und in der *och1*-Mutante (die Defekte in der Mannosylierung des *N*-Glykosylkerns zeigt) reprimiert (Abschnitte 4.1.4 und 4.1.5). Interaktionen von Pmt2 mit der *N*-Glykosylierung wurden auch nachgewiesen, wie z.B. die starke Expression des *ALG2*-Gens in der *pmt2/PMT2*-Mutante (Prill, 2004) und eine Interaktion zwischen Pmt2 und Alg9 in dem Split-Ubiquitin-System (Schmidt, 2007). Diese Ergebnisse deuten eine gegenseitige Regulation zwischen Pmt2-spezifischer *O*-Mannosylierung und der *N*-Glykosylierung an.

Interessanterweise wurden die *PMT5*- und *PMT6*-Gene in den *mnt1*- und *gdal*-Mutanten, bei denen die Verlängerung der *O*-Mannosylkette blockiert wird, reprimiert (Abschnitte 4.1.4 und 4.1.5, Anhang). Umgekehrt wurden in der *pmt5*-Mutante die *MNT1*- und *MNT2*-Gene stark exprimiert (Prill, 2004). Somit sind ER- und Golgi-lokalisierte Glykosylierungsvorgänge mehrfach durch Regulationssysteme verzahnt.

## 5.2 Regulation der *PMT*-Gene auf der Promotorebene

### 5.2.1 Die *PMT*-Gene besitzen sehr unterschiedliche Promotorregionen

Die Charakterisierung des Promotorbereichs eines Gens basiert auf der Identifizierung der Transkriptionsstartstelle und der *cis*-Elemente, die die Induktion oder Repression des Gens steuern (Carey & Smale, 2000).

Die intergenischen Regionen stromaufwärts der *PMT*-Gene zeigen unterschiedliche Längen. Das *PMT1*-Gen besitzt die längste 5'-intergenische Region mit 2,5 kb, während die 5'-intergenischen Regionen der *PMT2*- und *PMT4*-Gene nur 333 bp bzw. 369 bp lang sind (Tabelle 2). Die Länge der 5'UTR und die Anzahl der Transkriptionsstartpunkte ist auch bei den *PMT*-Genen unterschiedlich. Die *PMT1*- und *PMT6*-Gene zeigen die längste 5'UTR von 191 bzw. 113 nt (Tabelle 2).

Die Analyse der Umgebung der Transkriptionsstartpunkte der *PMT*-Transkripte nach Bajic *et al.* (2006) ergab, dass sie zu der Gruppe D mit AT-reichen Bereichen gehören. Laut dieser Publikation besitzt diese Gruppe wenige *cis*-Elemente.

Die *PMT*-Gene besitzen keine TATA-Boxen, die die Definition nach Basehoar *et al.* (2004) und Tirosh *et al.* (2007) erfüllen, nämlich eine TATAWAWR-Konsensus Sequenz in dem Bereich -200 bis -50 bp. Die Kartierung der *PMT1*-Transkriptionsstartstellen zeigte aber, dass drei TATA-Boxen sich binnen des größten Transkripts befinden (Abb. 14). Zwei Boxen orientieren sich allerdings in Richtung 3'→5'. Es ist beschrieben worden, dass die TATA-Sequenz *per se* die Richtung der Fortbewegung des Transkriptions-Komplexes nicht festlegt. Die Aktivität des Komplexes wird trotzdem niedriger, wenn die TATA-Box invertiert auftaucht (Juo *et al.*, 1996). Es könnte spekuliert werden, dass die TATA-Boxen eine Rolle in der Regulation des kurzen *PMT1*-Transkripts (Startstelle bei -7) hätten. Cox *et al.* (1997) zeigten, dass die Hefe-TBP an den *CYCI*-Promotor binden konnte, unabhängig von der Richtung der TATA-Box. Kürzlich wurde beschrieben, dass die basale Expression des BSP (bone sialoprotein)-Gens durch hoch konservierte und invertierte CCAAT (ICE; ATTGG)- und TATA (TTTATA)-Elemente reguliert wird (Su *et al.*, 2006). Aus beiden Arbeiten lässt sich schlussfolgern, dass andere spezifische Promotorfaktoren die Polarität des PIKs beeinflussen, und dass strukturelle Änderungen der DNA für die Aktivierung der Transkription notwendig sind.

---

Es wird angenommen, dass nur 20 % der Hefe-Gene eine TATA-Box besitzen, und dass diese an der Stress-Antwort beteiligt und hoch regulierte Gene sind (Basehoar *et al.*, 2004). Das *PMT1*-Gen könnte als ein Stress-Antwortgen definiert werden, weil die *pmt1*-Mutante sensitiv gegen verschiedene Stress-induzierende Substanzen (Prill *et al.*, 2005) und avirulent ist (Roubhabia *et al.*, 2005). Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass das längere Transkript eine basale Rolle spielen könnte, während das kleine Transkript unter Stress-Bedingungen induziert würde. Es ist schon beschrieben worden, dass in Hefe zwei Transkripte je nach Umgebungsbedingungen ein gleiches Genprodukt erzeugen können (Cox *et al.*, 2000). Es wäre auch möglich, dass jedes Transkript zu einem der beiden *PMT1*-Allele gehört, und dass diese unterschiedlich exprimiert werden.

### **5.2.2 Das *PMT1*-Gen wird unter Stressbedingungen auf der Promotorebene reguliert**

Der *PMT1*-Promotor wurde in dieser Arbeit mithilfe der *RLUC*- und *lacZ*-Reportergene unter Bedingungen, die einen Phänotyp der *pmt1*-Mutante verursachen, analysiert. Die Deletion von vier Regionen des Promotorbereichs (Deletionen Del1, Del2, Del3 und 3Del4) zeigte eine unterschiedliche Reportergenaktivität im Vergleich zu dem 1147 bp Kontrollfragment, diese war jedoch nie untypisch hyperaktiviert oder überhaupt nicht vorhanden (Abschnitt 4.2.4).

Im Fall der Deletionen Del1 und Del2 könnte die geminderte Expression der Promotoraktivität durch eine defekte Initiation der Transkription erklärt werden, da die Deletionen sich in der Nähe des Haupttranskriptionsstartpunkts befinden. Eine Aktivierung derselben nach Zugabe von Tunicamycin oder in der Hypheninduktion wurde trotzdem registriert, dies lässt spekulieren, dass alternative Bindestellen für den Einbau des Präinitiationskomplexes (PIK) vorhanden sind, oder dass die zwei *PMT1*-Transkripte unterschiedlich reguliert werden und die Zerstörung der Expression von einem, teilweise durch die Expression des anderen aufgehoben werden kann.

Die Promotorsequenz wurde mit verschiedenen Programmen (TRANSFAC, RSAT) untersucht. Nur ein bekanntes bedeutendes Motiv wurde in der Deletion 3Del4 gefunden, eine Swi5/Ace2-Box (siehe Abschnitt 5.3.4). Eine weitere Fragmentierung dieser Regionen sollte Licht auf die Promotorregulation des *PMT1*-Gens werfen. Die Swi5-Bindestelle wird im Abschnitt 5.3.2 diskutiert.

### **5.2.3 Die *PMT2*- und *PMT4*-Gene werden nicht auf der Promotorebene reguliert**

Die *PMT2*- und *PMT4*-Gene sind für Wachstum und Morphogenese von *C. albicans* wichtig. Das *PMT2*-Gen ist essenziell für das Wachstum und die Deletion des *PMT4*-Gens verursacht mehrere Defekt-Phänotypen (Prill *et al.*, 2005). Beide Gene besitzen eine kurze 5' intergenische Region von 333 bp bzw 369 bp. Um eine Störung der stromaufwärts gelegenen Gene zu vermeiden, wurden die Promotor-*RLUC*-Fusionen beider Gene in einen externen Locus (*RPS10*) integriert und die Promotoraktivität nach der Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, dem *Pmt1*-Inhibitor und Cyclosporin A untersucht (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.6). Für den *PMT2*-Promotor (1000 bp mit Teilen des stroaufwärts gelegenen *ORF19.6813s*) wurde kein Unterschied zwischen den unbehandelten und behandelten Proben registriert, obwohl die Transkriptspiegel unter diesen Bedingungen reguliert wurden (Abschnitte 4.1.4 und 4.3.1.4). Nur mit der 539 bp-Fusion wurde eine Erniedrigung der Luziferase-Aktivität in Anwesenheit von Tunicamycin gemessen.

Die Fusion des 370 bp-Promotorfragments mit der intergenischen Region des *PMT4*-Gens zeigte basale Werte, es kam aber zu einer Erhöhung der Luziferase- bzw. der  $\beta$ -Galaktosidase-Reporteraktivitäten in Anwesenheit von Tunicamycin (Abb. 29).

Die Diskrepanz der Regulation für alle untersuchten Promotorfusionen deutet eine Regulation auf posttranskriptionaler Ebene an. Die Tatsache, dass die Konstrukte in einem fremden Locus integriert wurden, könnte auch einen großen Einfluss haben, da die *cis*-Motive nicht mehr in ihrem chromosomalen Kontext liegen. Das Letztere würde erklären, wieso die 370 bp-Fusion des *PMT4*-Promotors mit Tunicamycin aktiviert wird, während der Transkriptspiegel das Gegenteil andeutet. Möglicherweise liegt am *RPS10*-Locus eine regulatorische Sequenz für Tunicamycin, die in dem eigenen Locus des *PMT4*-Gens nicht vorhanden ist.

### **5.2.4 Das „CAACCA“-Motiv am 5'-Ende der *PMT1*- und *PMT5*-Transkripte könnte eine Bindestelle für ein Regulatorprotein sein**

In Hefen findet über 70 % der Regulation der Genexpression durch mRNA-Mechanismen statt (Lu *et al.*, 2007). RNA-bindende Proteine regulieren normalerweise Ziel-mRNAs, die identifizierbare gemeinsame Funktionen haben. Die RNA-Bindestellen sind unterschiedlich in Sequenz, Struktur und Lokalisierung (Hogan *et al.*, 2008).

Das CAACCA-Motiv kommt genau am 5'-Ende der *PMT1*- und *PMT5*-Transkripte vor (Abschnitt 4.2.2). Da beide Gene zu der gleichen Unterfamilie gehören, stellte sich die Frage, ob das Motiv konserviert wird, und ob es eine regulatorische Funktion hat. Um das Ertere zu beantworten, wurde die Transkriptionsstartstelle der *PMT*-Homologe eines weiteren Pilzes, *Y. lipolytica*, bestimmt. Aus dem Sequenzvergleich der *Pmt*-Proteine wurden vier *Pmt*-Homologe von *Y. lipolytica* identifiziert. Zwei Homologe gehören zu der Unterfamilie *Pmt1* und jeweils ein Homolog zu der *Pmt2*- und *Pmt4*-Unterfamilie. Die Gene, die für die *Pmt1*-Unterfamilie kodieren, wurden *PMT1-1* bzw. *PMT1-2* genannt (Abschnitt 4.2.3). An der Transkriptionsstartstelle des *PMT1-2*-Transkripts kommt das CAACCA-Motiv einmal vor. Es lässt sich deswegen über eine konservierte regulatorische Funktion desselben spekulieren. Kürzlich wurde beschrieben, dass „CA“-reiche Sequenzen Bindestellen für RNA-bindende Proteine sind (König *et al.*, 2009).

In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass die Überexpression von *DOM34* den *pmt1*-Phänotyp teilweise aufheben kann (J. Hilbig, pers. Mitteilung). *Dom34* ist ein Protein, das bei *S. cerevisiae* in der Translation agiert (Davis & Engebrecht, 1998; Doma & Parker, 2006). Um eine mögliche Interaktion zwischen *Dom34* und dem CAACCA-RNA-Motiv zu untersuchen, wurde eine Hefe-Drei-Hybrid Experiment durchgeführt, es wurde jedoch keine Interaktion festgestellt (siehe Anhang). Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht, dass es keine Interaktion in lebenden Zellen gibt, da die Interaktion sehr schwach sein kann und eventuell in dem Hefesystem ein zusätzlicher benötigter spezifischer Faktor von *C. albicans* fehlt oder die RNA-Konformation des kleinen Zielfragments ungünstig ist. In einem weiteren Versuch wurde die Luziferase-Aktivität einer *PMT1*-Promotor-*RLUC* Fusion mit und ohne das Motiv bei Überexpression von *DOM34* gemessen. Die Anwesenheit des Motivs ergab deutlich höhere Luziferase-Werte als ohne das Motiv (J. Hilbig, pers. Mitteilung). Dieses deutet eine mögliche Bindung von *Dom34* an das CAACCA-Motiv an.

## 5.3 Aktivierung von Signalwegen bei defekter O-Mannosylierung

### 5.3.1 Die Blockierung des *Pmt1*-Proteins aktiviert die Signalwege in zwei Phasen

Die Blockierung der *Pmt1*-Aktivität durch den *Pmt1*-Inhibitor hemmte das Wachstum der *mck1*-, *cekl*-, *tpk1*-, *efg1*- und *cna1*-Mutanten kurzfristig (Abb. 30). Alle, außer der

*cnal*-Mutante, konnten aber ihr Wachstum nach 48 Stunden wieder aufnehmen (Abb. 30). Dieses Ergebnis deutet an, dass die Zellen die meisten der Signalwege, die an der Zellwandbiogenese beteiligt sind, in einer ersten Phase aktivieren, aber nur Calcineurin langfristig dabei eine wichtige Rolle spielt.

Die *mkc1*-Mutante erschien kurzfristig (nach 24 Stunden) sensitiv gegen den Pmt1-Inhibitor (Abb. 30), obwohl die Mkc1 MAP Kinase in den *pmt*-Mutanten nicht phosphoryliert wurde und somit keine Aktivierung bei Pmt1-Defekten nachweisbar war (Cantero *et al.*, 2007). Möglicherweise erfolgt die Mkc1-Phosphorylierung nur transient, wenn der Pmt1-Inhibitor zugegeben wird. Alternativ könnte die Pmt1-Inhibitor-Sensitivität auf die Basisaktivität des Mkc1-Weges zurückzuführen sein.

Das Wachstum der *cek1*-Mutante wurde ebenfalls kurzfristig durch den Pmt1-Inhibitor gehemmt (Abb. 30). Es ist beschrieben worden, dass die Cek1 MAP Kinase (homologes Protein zu Kss1 bei *S. cerevisiae*, [Csank *et al.*, 1998]) in den *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten verstärkt phosphoryliert wird (Cantero *et al.*, 2007). Kürzlich wurde auch beschrieben, dass Cek1 in Anwesenheit von Tunicamycin, d.h. bei Blockierung der N-Glykosylierung unter Vermittlung des Membransensors Msb2 aktiviert wird (Román *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung des Cek1-Weges bei *C. albicans* die Antwort auf eine defekte Glykosylierung darstellt.

Die *cnal*-Mutante war die einzige Mutante, deren Wachstum langfristig durch den Pmt1-Inhibitor gehemmt wurde (Abb. 31, Abb. 32). Die Zielproteine von Calcineurin, die Transkriptionsfaktoren Crz1 und Crz2, wurden aber für die Resistenz gegenüber dem Pmt1-Inhibitor nicht benötigt. Dieses Ergebnis bedeutet, dass das Calcineurin-Signal durch einen oder mehrere noch unbekannte Transkriptionsfaktor(en) weitergeleitet wird.

### **5.3.2 Der Calcineurin-Weg reguliert die Expression der *PMT1*-, *PMT2*- und *PMT4*-Gene über unbekannte Zielproteine**

Bei *C. albicans* reguliert der Calcineurin-Weg die Toleranz gegen Antimykotika, die Zellmorphogenese und die Virulenz (Sanglard *et al.*, 2003). Die einzigen bisher identifizierten Transkriptionsfaktoren stromabwärts von Calcineurin sind Crz1 und Crz2 (Karababa *et al.*, 2006). Es wird trotzdem vermutet, dass Calcineurin andere Zielproteine hat, weil der Phänotyp der *crz1*-Mutante deutliche Unterschiede zu dem Phänotyp der *cnal*-Mutante zeigt (Karababa *et al.*, 2006). Der Calcineurin-Weg wird aktiviert, wenn ER-Stress durch Tunicamycin induziert wird (Bonilla *et al.*, 2002), aber

die Aktivierung geschieht nicht sofort nach der Induktion des ER-Stress (Deng *et al.*, 2006). Hinweise dazu wurden durch die Messung der Aktivierung von Calcineurin in Echtzeit bei *S. pombe* erbracht. Es ergab sich eine langsame und ansteigende Aktivierung des Proteins in Anwesenheit von DTT oder Tunicamycin (Deng *et al.*, 2006).

Calcineurin-Mutanten verlieren die Lebensfähigkeit als Antwort auf ER-Stress schneller als *ire1*-Mutanten, die in späteren Schritten des UPR-Weges betroffen sind (Bonilla & Cunningham, 2003). Die Transkriptomanalyse der *pmt1*-Mutante zeigte, dass Gene des UPR-Weges induziert wurden. Diese Antwort war spezifisch für die Pmt1-Isoform; daher scheint die Pmt1-O-Mannosylierung wichtig für die Proteinfaltung zu sein (Prill, 2004). Dieses würde die Letalität der gleichzeitigen Hemmung von Cna1 und Pmt1 erklären (Abschnitt 4.3.1).

Calcineurin reprimiert unter Normalbedingungen das *PMT1*-Transkript, weil der *PMT1*-Transkriptspiegel in der *cna1*-Mutante erhöht wurde (Abb. 33). Es konnte aber ein Unterschied der *PMT1*-Transkriptregulation zwischen der *cna1*-Mutante und der Zugabe von Cyclosporin A als Hemmstoff von Calcineurin festgestellt werden. Der weniger drastische Effekt mit Cyclosporin A deutet an, dass die Repression des *PMT1*-Gens kurzfristig nicht so stark ist, vermutlich weil in einem ersten Schritt die Mkc1-, Cek1- und Efg1-Wege die Expression des Gens auch regulieren (Abschnitt 4.3).

Der *PMT1*-Transkriptspiegel bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tunicamycin und Cyclosporin A verhielt sich wie bei alleiniger Anwesenheit von Cyclosporin A (Abb. 40). Die einfachste Erklärung dafür wäre, dass Cyclosporin A schneller als Tunicamycin wirkt und deswegen bei gleichzeitiger Zugabe von beiden Substanzen der Cyclosporin A-Effekt zu sehen ist. Dass bei den *PMT2*- und *PMT4*-Transkripten in Anwesenheit von Tunicamycin und Cyclosporin A ein synergistischer Effekt bzw. eine Tendenz zu den Tunicamycin-Werten gemessen wurde, lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Signalwege eine Präferenz für die Regulation durch die *PMT*-Gene zeigen. So würde die Derepression des *PMT1*-Gens durch Tunicamycin hauptsächlich über den Calcineurin-Weg eingeleitet, während die Expression des *PMT4*-Gens durch einen anderen Weg, vielleicht den Cek1-Weg, in erster Linie reguliert würde.

Die basale Expression des *PMT2*-Transkripts wird durch den Calcineurin-Weg reguliert. Sowohl in der *cna1*-Mutante als auch in der Anwesenheit von Cyclosporin A war der *PMT2*-Transkriptspiegel niedriger als in dem Kontrollstamm (Abb. 40). Dieses

Ergebnis bestätigt die Transkriptomdaten von Karababa *et al.* (2006). Sie annotierten, dass das *PMT2*-Gen durch Calcineurin und Crz1 positiv reguliert wird. Außerdem fanden sie eine CDRE-Box (5'-GTGGT-3') an der Stelle -320 bp in der Promotorregion des *PMT2*-Gens. Diese Box befindet sich in der intergenischen Region zwischen *PMT2* und dem *ORF19.6813*. In dieser Arbeit wurde die *PMT2*-Promotoraktivierung in Anwesenheit von 4 und 16 µg/ml Cyclosporin A (Abschnitt 4.2.5) getestet, aber es konnte keine Regulation des *PMT2*-Gens auf der Promotorebene nachgewiesen werden. Die Promotor-Reportergen-Konstrukte wurden dabei in einen externen Locus integriert, um Nebeneffekte durch die Unterbrechung des *ORF19.6813* zu vermeiden. Zwei Konstrukte (pPdC19 [-539/-1 bp] und pPdC50 [Deletion von -229 bis -139 bp in pPdC19]) wurden in den *PMT2*-Locus integriert aber hiermit wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen unbehandelten und Cyclosporin A-behandelten Zellen beobachtet.

Die Halbwertszeit der mRNAs ist ein wichtiger Punkt in der Regulation ihrer Expressionswerte (Apponi *et al.*, 2007). Die mRNA-Stabilität wird durch Sequenzen in den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen und auch durch spezifische Sequenzen binnen des kodierenden Fragments reguliert (Day & Tuite, 1998). Die Halbwertszeit der *PMT2*-mRNA wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, Änderungen in der mRNA-Stabilisierung wären aber für den Unterschied zwischen der *PMT2*-Genregulation auf der Promotorebene und auf der Transkriptebene eine mögliche Erklärung.

Bei *S. cerevisiae* ist beschrieben worden, dass Calcineurin Zielproteine hat, die nicht als Transkriptionsfaktoren klassifiziert worden sind (Cyert, 2003). Bei *C. albicans* wurden bisher keine ähnlichen direkten Interaktionen nachgewiesen (Karababa *et al.*, 2006). Zwei Fragen können deswegen gestellt werden: a) welcher (Transkriptions)Faktor außer Crz1 reguliert die *PMT*-Gene stromabwärts von Calcineurin und b) kann Calcineurin direkt auf die Pmt-Proteine wirken? Die Suche nach einem Transkriptionsfaktor mithilfe des Pmt1-Inhibitors ergab einen einzigen deutlichen Kandidaten, Ace2 (Abschnitt 4.3.3). Ace2 wurde bisher nur stromabwärts des RAM-Signalweges lokalisiert (Song *et al.*, 2008). Eine BLAST-Analyse des Ace2-Volllängenproteins ergab bei *C. albicans* eine signifikante Homologie von Ace2 mit Crz1 und Crz2 (E-Werte von  $7,2^{-15}$  bzw.  $3,9^{-12}$ ), daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Calcineurin auch Ace2 aktiviert.

Vorhersagen über mögliche phosphorylierte Aminosäuren bei den Pmt1-, Pmt2- und Pmt4-Proteinen wurden mithilfe des NetPhosYeast 1.0 Programm ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast)) gemacht. Pmt1 besitzt 21 potentielle phosphorylierte Stellen, während Pmt2 und Pmt4 16 bzw. 19 potentielle phosphorylierte Aminosäuren haben. Alle diese Stellen befinden sich in den Amino- und Carboxyl-Termini und in den Schleifen zwischen den Transmembrandomänen. Bisher wurde nicht untersucht, ob die Pmt-Proteine tatsächlich phosphoryliert sind.

### **5.3.3 Der Cek1-Weg reprimiert die *PMT1*-Expression unter Normalbedingungen und wird benötigt, um die *PMT2*- und *PMT4*-Expression zu steigern, wenn Pmt1 blockiert wird**

Die Cek1 MAP Kinase ist für die Zellwandbiogenese von *C. albicans* notwendig, wie durch die Sensitivität der *cek1*-Mutante gegenüber Congo Rot und Calcofluor deutlich wird (Eisman *et al.*, 2006). Die Aktivierung des Cek1-Proteins, als Antwort auf Zellwanddefekte, wird durch Msb2 in Kooperation mit Sho1 eingeleitet (Román *et al.*, 2009). Die Proteine der MAP Kinase-Wege regulieren sich außerdem gegenseitig, um „Crosstalk“ zu vermeiden. So ist zum Beispiel die Hog1-MAP Kinase einer der Regulatoren von Cek1. In den *ssk1*- und *hog1*-Mutanten liegt eine höhere basale Aktivierung des Cek1-Proteins vor, was zur Resistenz gegen Zellwand-Inhibitoren führt (Eisman *et al.*, 2006). Román *et al.* (2009) konnten auch nachweisen, dass durch eine *ssk1*-Mutation die Cek1-Hyperaktivierung durch Sho1 stark und nur teilweise durch Msb2 vermittelt wird.

Msb2 ist ein hoch glykosyliertes Mucin. Bei *S. cerevisiae* wird Msb2 durch Pmt1, Pmt2 und Pmt4 O-mannosyliert (Vadaie *et al.*, 2008). Bei *C. albicans* wird Msb2 hauptsächlich durch Pmt1 O-mannosyliert (E. Szafranski, pers. Mitteilung). Bei *S. cerevisiae* aktiviert nur die gleichzeitige Blockierung der N-Glykosylierung und Pmt4-spezifischen O-Mannosylierung die MAPK Kss1 (Yang *et al.*, 2009). Bei *C. albicans* wird die homologe MAPK Cek1 dagegen schon bei defekter Pmt1- und Pmt4-O-Mannosylierung konstitutiv aktiviert (Cantero *et al.*, 2007). Die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin löste bei den *pmt*-Mutanten ebenfalls die Phosphorylierung von Cek1 aus, außer in dem heterozygoten *pmt2/PMT2*-Stamm (Cantero *et al.*, 2007). Es wurde daher postuliert, dass der Cek1-Weg Defekte der O- und N-Glykosylierung bei *C. albicans* signalisiert. Pmt1 glykosyliert viele Zellwandproteine, während Pmt4 Membranproteine glykosyliert (Prill, 2004; Ecker *et*

*al.*, 2003; Hutzler *et al.*, 2004). Die Rolle von Msb2 als Zellwand- und Membran-Sensor könnte deswegen die konstitutive Aktivierung von Cek1 in den *pmt1*- und *pmt4*-Mutanten erklären. Dass Cek1 in der *pmt2/PMT2*-Mutante nicht phosphoryliert wird, deutet im Gegensatz dazu die Funktion von Pmt2 bei der Glykosylierung eines noch unbekanntes Zielproteins zwischen Msb2- und Cek1-Proteinen an.

Der Cek1-Weg signalisiert nicht nur eine defekte Glykosylierung, sondern er reguliert auch die Expression der *PMT*-Gene. Die Transkriptspiegel der *PMT*-Gene wurden in den *msb2*- und *cek1*-Mutanten bestimmt (Abb. 34). Der basale Wert des *PMT1*-Transkripts war in beiden Mutanten höher als in dem Kontrollstamm, was andeutet, dass der Cek1-Weg unter Normalbedingungen die *PMT1*-Expression reprimiert. Keine Änderungen in dem *PMT1*-Transkript wurden in den *msb2*- und *cek1*-Mutanten nach der Behandlung mit Tunicamycin oder dem Pmt1-Inhibitor registriert.

Die basalen Werte des *PMT2*-Transkripts waren niedriger in der *msb2*- aber nicht in der *cek1*-Mutante. Die basalen *PMT4*-Transkriptspiegel wurden in den *msb2*- und *cek1*-Mutanten nicht verändert und bei Behandlung der Zellen mit dem Pmt1-Inhibitor nicht induziert (Abb. 34). Dieses Ergebnis bedeutet, dass der Cek1-Weg über Msb2 die Induktion der *PMT2*- und *PMT4*-Gene, als kompensatorische Antwort auf die defekte Pmt1 *O*-Mannosylierung, bewirkt.

Die *msb2*-Mutante zeigte Sensitivität gegen Tunicamycin und eine hohe Konzentration (18  $\mu$ M) des Pmt1-Inhibitors (Abb. 35; Cottier, 2007), während die *sho1*-Mutante dagegen resistent war. Die Sensitivität gegenüber beiden Substanzen wurde in der *msb2 sho1*-Doppelmutante erhöht. Die erhöhte Sensitivität der Doppelmutante bedeutet, dass beide Proteine, Msb2 und Sho1, an der Aktivierung von Cek1 bei defekter *O*- und *N*-Glykosylierung beteiligt sind.

Bei *S. cerevisiae* wird die *FUS1*-Promotor-*lacZ* Reporterfusion benutzt, um die Regulation und „Crosstalk“ der MAPK-Wege, insbesondere des Fus3/Kss1-Weges, zu analysieren (Stevenson *et al.*, 1992; Cullen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009). Fus1 ist ein Plasmamembranprotein, das für den Abbau des Septums während der Zellverschmelzung benötigt wird (Nelson *et al.*, 2004). *FUS1* wird durch Pheromone und die Ste4, Ste5, Ste7, Ste11 und Ste12 Proteine reguliert (Stevenson *et al.*, 1992). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnten bei *C. albicans* die *PMT1*-, *PMT2*- und *PMT4*-Gene als Reportergene für den Cek1-Weg benutzt werden.

### 5.3.4 Regulation der *PMT*-Gene durch den Transkriptionsfaktor Ace2

Das Wachstum einer Sammlung von Mutanten von Transkriptionsfaktoren (D. Sanglard und A. Mitchell) wurde in Anwesenheit des Pmt1-Inhibitors und anderer Substanzen getestet (Abschnitt 4.3.3). Nur die *ace2*-Mutante zeigte eine deutliche Sensitivität gegenüber dem Pmt1-Inhibitor. Ace2 reguliert Metabolismus- und Zellwandgene und wird für die Filamentierung unter hypoxischen Bedingungen benötigt (Mulhern *et al.*, 2006). Unter den unterexprimierten Genen in der *ace2*-Mutante befinden sich die *PMT2*-, *PMT4*- und *PMT6*-Gene. Die Bestimmung der *PMT*-Transkriptspiegel in der *ace2*-Mutante zeigte, dass der basale Wert des *PMT1*-Transkripts leicht höher als in dem Kontrollstamm war, während die basalen Werte der *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte deutlich niedriger waren (Abb. 34). Die Werte der *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte bestätigen die Transkriptomdaten von Mulhern *et al.* (2006). Die *ace2*- und *pmt1*-Mutanten zeigten einige ähnliche Phänotypen, z.B. Änderungen des Zellwandgehalts, Defekte in der Zelltrennung und defekte Hyphenbildung unter hypoxischen Bedingungen (Kelly *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006, Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005); das *PMT1*-Gen wird aber laut der Transkriptomanalyse in der *ace2*-Mutante nicht reguliert. Die Überexpression von *ACE2* in der *pmt1*-Mutante konnte allerdings die untersuchten Phänotypen aufheben (Abb. 37). In Zusammenhang damit wurde eine Swi5-Bindestelle im *PMT1*-Promotor identifiziert (Abschnitt 4.2.4.2). Swi5 und Ace2 können bei *S. cerevisiae* an das gleiche Sequenzmotiv binden (Dohrmann *et al.*, 1996; Voth *et al.*, 2007). Diese Bindestelle befand sich in einem *PMT1*-Promotorfragment, dessen Deletion eine höhere basale Aktivität zeigte (Abb. 21). Daher wurde durch eine Mutagenese der Bindestelle untersucht, ob dieses Motiv für den Verlust der Repression in der 3Del4 Deletion verantwortlich ist (Abschnitt 4.2.4.2). Die Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Behandlung mit Tunicamycin war aber auch bei dem *PMT1*-Promotor ohne die Swi5-Bindesequenz immer noch vorhanden. *Cis*-Elemente gehören manchmal zu komplexen Promotorstrukturen, so dass die Deletion eines Motives nicht ausreichend ist, um die Regulation zu verlieren (Doyon, 2007; Chen & Struhl, 1988). Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass es keine Bindung gibt, aber legt die Vermutung nahe, dass das Motiv entweder keine Bindestelle für Ace2 ist oder andere Faktoren die Protein-DNA Interaktion ebenfalls beeinflussen.

Die kompensatorische Erhöhung der *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte nach der Behandlung mit dem Pmt1-Inhibitor in der *ace2*-Mutante konnte nicht beobachtet

werden (Abb. 35). Dieses Ergebniss deutet an, dass Ace2 in dem Signalweg agiert, der diese kompensatorische Antwort reguliert.

Bei *S. cerevisiae* und *C. albicans* wurde Ace2 als Zieltranskriptionsfaktor des RAM-Weges identifiziert (Nelson *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2008). Bei *C. neoformans* wurde der RAM-Weg ebenfalls beschrieben aber es wurde kein eindeutiges Ace2-Homolog gefunden (Walton *et al.*, 2006). Interessanterweise ergab die BLAST-Analyse von *S. cerevisiae* Ace2 gegen das *C. neoformans* Genom als bestes Homolog ein Protein (CNA01450), das im BLAST-Vergleich die höchste Homologie mit dem Crz1-Protein in *S. cerevisiae* zeigte (Walton *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis stimmt mit der in Abschnitt 5.3.3 erwähnten Homologie zwischen *C. albicans* Ace2 und Crz1/Crz2 überein. In der Arbeit bei Walton *et al.* (2006) wurde beschrieben, dass die RAM- und Calcineurin-Wege parallel wirken, da RAM-Mutanten sensitiv gegenüber Cyclosporin A und FK506 sind. Dagegen sind die RAM-Mutanten bei *S. cerevisiae* resistent gegen Cyclosporin A. Das Wachstum der hier getesteten *ace2*- und *cbk1*-Mutanten in Anwesenheit von Cyclosporin A war nur leicht betroffen im Vergleich zu der Kontrolle (Abb. 36 und 39), was andeutet, dass beide Wege hauptsächlich unterschiedliche Signale weitergeben, obwohl sie vielleicht unter bestimmten Bedingungen gemeinsame Funktionen haben.

Der unerwartete toxische Effekt der *ACE2*-Überexpression im Wildtypstamm könnte durch eine Funktion von Ace2 in den späten M- und G<sub>1</sub>-Phasen des Zellzyklus erklärt werden (Sbia *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006). Es wurde beschrieben, dass arretierte Zellen der G<sub>1</sub>-Phase eine Hyphen-ähnliche Form annehmen, während Zellen in den G<sub>2</sub>-, S- oder M-Phasen eine Pseudohyphen-ähnliche Form annehmen (Berman, 2006). Möglicherweise führt die Überexpression von *ACE2* zu einem Arrest im Zellzyklus und die Zellen wachsen in Hyphen- oder Pseudohyphenform, was auch die Flokkulation des CAI4-Stamms bei *ACE2*-Überexpression erklären würde.

## 5.4 Modell

Die Regulation der Zellwandsynthese erfolgt durch unterschiedliche Signalwege, je nachdem ob Pilzzellen unter Normalbedingungen (Zellwandbiogenese) oder unter Stressbedingungen (Zellwandintegrität) wachsen (Blankenship *et al.*, 2010). Aufgrund

---

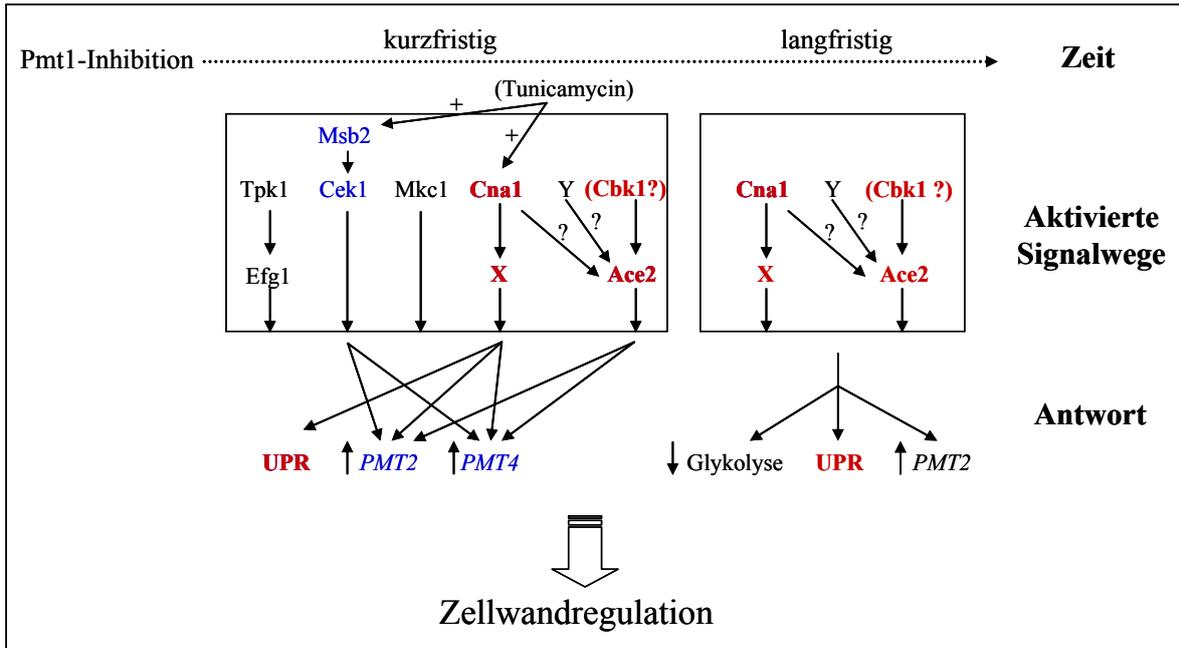
des hohen Anteils von glykosylierten Proteinen in der Zellwand sind Glykosylierung und Zellwandsynthese zwei eng verbundene Prozesse. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Gene, die für die Protein-*O*-Mannosyltransferasen kodieren, und die Signalwege, die diese Regulation vermitteln, untersucht.

In Hinsicht auf die Ergebnisse dieser Arbeit kann das folgende Modell vorgeschlagen werden:

a) Normalbedingungen (und Zellwandbiogenese). Die Cek1- und Calcineurin-Wege und der Transkriptionsfaktor Ace2 regulieren die basalen Werte der *PMT*-Transkriptspiegel. Alle drei Wege reprimieren das *PMT1*-Gen unter Normalbedingungen. Der Calcineurin-Weg und Ace2 sind für die basale Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene nötig.

b) Blockierung der *O*-Glykosylierung (und Erhaltung der Zellwandintegrität). Die Hemmung des Pmt1-Proteins verursacht zahlreiche Zellwandänderungen, z.B. durch fehlende *O*-Glykosylierung von Mannoproteinen. Diese Hemmung kann kurzfristig (mit dem Pmt1-Inhibitor) oder langfristig (Deletion des *PMT1*-Gens) erzeugt werden. Die Zellen schalten in Abhängigkeit von der zeitlichen Hemmung verschiedene kompensatorische Mechanismen an. Kurzfristig werden die Tpk1/Efg1-, Mkc1-, Msb2/Cek1-, und Calcineurin-Wege und auch der Transkriptionsfaktor Ace2 aktiviert. Langfristig werden der Calcineurin-Weg und Ace2 aktiviert. Auch die ausgelöste Antwort verändert sich in Abhängigkeit von der Zeit. Kurzfristig wird der UPR-Weg angeschaltet (Prill, 2004) und die *PMT2*- und *PMT4*-Gene werden induziert. Langfristig werden der UPR-Weg aktiviert, die Glykolyse inhibiert (Prill, 2004) und das *PMT2*-Gen induziert. Die Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene wird durch die Cek1- und Calcineurin-Wege und durch den Transkriptionsfaktor Ace2 reguliert.

c) Blockierung der *N*-Glykosylierung (und Erhaltung der Zellwandintegrität). Eine defekte *N*-Glykosylierung scheint die Expression des *PMT1*-Gens zu dereprimieren. Diese Antwort wird wahrscheinlich durch den Calcineurin-Weg eingeleitet, da bei gleichzeitiger Zugabe von Tunicamycin (Inhibition der *N*-Glykosylierung) und Cyclosporin A (Blockierung von Calcineurin) der *PMT1*-Transkriptspiegel denjenigen des Cyclosporins A widerspiegelt.





## 6 Zusammenfassung

Protein-*O*-Mannosyltransferasen (Pmt-Proteine) katalysieren die Anknüpfung des ersten Mannosylrestes an sekretorische Zielproteine. Fünf Isoformen (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 und Pmt6) wurden bei dem pathogenen Pilz *Candida albicans* identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Regulation der *PMT*-Gene auf der Transkript- und Promotorebene untersucht. Außerdem wurden Signalwege etabliert, die an der Detektion und Weiterleitung der defekten *O*-Mannosylierung beteiligt sind.

Die Deletion einzelner *PMT*-Gene verursachte Veränderungen der Expression anderer *PMT*-Gene. So wurden ein erhöhter *PMT2*-Transkriptspiegel in der *pmt1*-Mutante und ein erhöhter *PMT4*-Transkriptspiegel in dem heterozygoten *pmt2/PMT2*-Stamm festgestellt. Bei Behandlung des Wildtyps mit dem Pmt1-Inhibitor OGT2371 stiegen die *PMT2*- und *PMT4*-Transkriptspiegel, in einer möglichen kompensatorischen Antwort, ebenfalls an. Unerwarteterweise wurde in der *pmt6*-Mutante und dem *pmt2/PMT2*-Stamm auch eine Erniedrigung des *PMT1*- bzw. *PMT6*-Transkriptspiegels beobachtet. In Anwesenheit von Zellwand- und Glykosylierungs-Inhibitoren, sowie in entsprechenden Mutanten, wurde eine Erhöhung des *PMT1*-Transkriptspiegels festgestellt. Dagegen wurde der *PMT2*-Transkriptspiegel in Gegenwart des *N*-Glykosylierungs-Inhibitors Tunicamycin erniedrigt.

Das *PMT1*-Gen wird auf der Promotorebene durch Zellwanddefekte reguliert. Zwei Promotorregionen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes, Del1 und 2Del2, wurden für eine vollständige Aktivierung der Transkription benötigt. Die Deletion zwei weiterer Regionen, Del3 und 3Del4, ergab eine höhere basale Aktivität, möglicherweise weil Bindestellen von Repressorproteinen eliminiert wurden. Die *PMT2*- und *PMT4*-Gene besitzen stromaufwärts kurze intergenische Regionen (333 bzw. 369 bp). Für den *PMT2*-Promotor wurde unter den untersuchten Bedingungen keine Regulation der Promotorfusionen durch Tunicamycin festgestellt. Für das *PMT4*-Gen wurden in Anwesenheit von Tunicamycin entgegengesetzte Ergebnisse auf der Transkript- und Promotorebene festgestellt. Beide Gene scheinen deswegen auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert zu werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Signalwege des Membransensors Msb2, der MAP Kinase Cek1, der Phosphatase Calcineurin und des Transkriptionsfaktors Ace2 die Antwort auf defekte *O*-Mannosylierung bzw. die Expression der *PMT*-Gene regulieren. Das *PMT1*-Transkript wurde in den *msb2*-, *cek1*- und *ace2*-Mutanten so hoch wie im Wildtyp nach Tunicamycin-Behandlung induziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Msb2-, Cek1- und Ace2-Proteine die *PMT1*-Expression bei intakter *N*-Glykosylierung reprimieren. Andererseits werden diese drei Proteine für die basale Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene und ihre Induktion als Antwort auf defekte Pmt1-*O*-Glykosylierung benötigt. Bei intakten Zellen reprimiert dagegen der Calcineurin-Weg die Expression von *PMT1* und er wird für die basale Expression der *PMT2*- und *PMT4*-Gene benötigt.



## 7 Summary

Protein *O*-Mannosyltransferases (Pmt proteins) catalyze the addition of the first mannose molecule to secreted proteins. Five isoforms (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 and Pmt6) have been described in the fungal pathogen *Candida albicans*. In this work the regulation of the *PMT* genes on the transcriptional and promoter levels was investigated. In addition, the signaling pathways that detect and transmit defects in *O*-glycosylation were established.

The deletion of the *PMT* genes individually caused changes in the expression of the other *PMT* genes. Upregulation of the *PMT2* transcript in the *pmt1* mutant and upregulation of the *PMT4* transcript were detected in the heterozygous *pmt2/PMT2* strain. The treatment of the wild-type strain with the Pmt1 inhibitor OGT2371 also induced an increase of the *PMT2* and *PMT4* transcripts, probably in a compensatory way. Surprisingly, in the *pmt6* mutant and in the *pmt2/PMT2* strain a decrease of the *PMT1* and, respectively, the *PMT6* transcripts was observed. In the presence of cell wall and glycosylation inhibitors, as well as in the corresponding mutants, an increase of the *PMT1* transcript was determined. On the other hand, the *PMT2* transcript level was diminished in the presence of the *N*-glycosylation inhibitor tunicamycin.

The *PMT1* gene is regulated at the promoter level by cell wall defects. Two promoter regions upstream of the transcriptional start site, Del1 and 2Del2, were needed for complete activation of transcription. The deletion of two other regions, Del3 and 3Del4, resulted in a higher basal promoter activity, probably because binding sites for repressor proteins within these fragments were eliminated. The *PMT2* and *PMT4* genes have upstream short intergenic regions (333 and 369 bp, respectively). For the *PMT2* promoter no regulation of the promoter fusions in the presence of tunicamycin was observed. For the *PMT4* promoter an opposite regulation on the transcript and promoter levels was recorded after treatment with tunicamycin. Therefore, both *PMT2* and *PMT4* genes appear to be regulated on the posttranscriptional level.

The results show that the signaling pathways of the Msb2 membrane sensor, the Cek1 MAP kinase, the calcineurin phosphatase and the Ace2 transcription factor regulate the response to defective *O*-mannosylation and the expression of the *PMT* genes. The *PMT1* transcript level in the *msb2*, *cek1* and *ace2* mutants was similar to its levels in the wild-type strain after treatment with tunicamycin. The results indicate that Msb2, Cek1 and Ace2 proteins repress *PMT1* expression, if *N*-glycosylation is intact. In addition, these three proteins are needed for basal expression of the *PMT2* and *PMT4* genes and for their induction in response to defective Pmt1 *O*-mannosylation. On the other hand, in intact cells, the calcineurin pathway represses expression of *PMT1*, while it is needed for expression of the *PMT2* and *PMT4* genes.



---

## RESUMEN EN ESPAÑOL



## 8 Introducción

Nos encontramos en la era de las “ómicas”. Recientemente el análisis de las glicoestructuras o glicómica ha ganado importancia debido al amplio papel que juegan en procesos celulares de adhesión, síntesis proteica, endocitosis, etc. (Ohtsubo & Marth, 2006). Las glicoestructuras son los biopolímeros más diversos y contienen más información por unidad de peso que los ácidos nucleicos o las proteínas (Alavi & Axford, 2008). Muchas interacciones hospedador-patógeno se basan en el reconocimiento mutuo de sus glicoestructuras superficiales. Una de estas interacciones es la formada entre humanos y el hongo patógeno oportunista *Candida albicans*. En este trabajo se ha estudiado la regulación de los genes *PMT*, los cuales codifican para proteínas con actividad *O*-manosiltransferasa en *C. albicans* y en eucariotas en general.

### 8.1 *Candida albicans*

*C. albicans* es el patógeno oportunista humano más importante. Toda una serie de características, como su polimorfismo, su reproducción clonal, su diploidia y su capacidad de adaptación modifican la virulencia del mismo y hacen de este organismo un modelo en investigación básica, en mecanismos de diferenciación celular, en análisis de la interacción patógeno-huésped y en los mecanismos del modelo de acción y de resistencia a fármacos antifúngicos (Larriba & Calderone, 2008).

*C. albicans* es un hongo polimórfico capaz de crecer en forma de levadura o en forma filamentosa, hifa o pseudohifa. Sufre un cambio fenotípico espontáneo denominado blanco-opaco y puede dar lugar a estructuras de forma esférica y pared engrosada denominadas clamidosporas (Fig. 1) (Whiteway & Bachewich, 2007; Citiulo *et al.*, 2009). La transición levadura-hifa es sin duda el cambio morfológico mejor estudiado en *C. albicans*. Este cambio es reversible y está favorecido por una serie de condiciones como baja densidad celular, pH neutro, composición del medio de cultivo o presencia de GlcNAc o suero con un incremento de la temperatura igual o mayor a 37 °C (Ernst, 2000; Shapiro *et al.*, 2009).

*C. albicans* se reproduce mayoritariamente de forma clonal (Pujol *et al.*, 1993), sin embargo posee también un locus *MTL* (Hull *et al.*, 2000) semejante al de *S. cerevisiae* y otros ascomicetos. El locus *MTL* de *C. albicans* es heterocigótico (*MTLa/MTL $\alpha$* ) y se

localiza en el cromosoma 5. Para que exista reproducción sexual, el locus debe convertirse en homocigótico (*MTLa/MTLa* o *MTL $\alpha$ /MTL $\alpha$* ) y las células deben experimentar el cambio fenotípico blanco-opaco. Es posible que la formación de biofilms favorezca la reproducción sexual (Soll, 2009).

*C. albicans* es un diploide obligado, ya que la dosis génica es importante para el fenotipo de las cepas silvestres (Uhl *et al.*, 2003). Además presenta una traducción del codón CUG no canónica. Éste es traducido a serina mientras que en el resto de organismos se traduce por leucina (Fitzpatrick *et al.*, 2006).

## 8.2 Epidemiología

*C. albicans* se encuentra de forma normal en las superficies epidérmica y mucosa y en la microflora intestinal del ser humano. La ruptura de las barreras físicas o un debilitamiento del sistema inmunitario pueden favorecer la aparición de la infección. Las infecciones debidas a la especie *Candida* pueden clasificarse como superficiales o sistémicas (Shoham & Levitz, 2005).

En los últimos años las infecciones fúngicas en los países desarrollados se deben sobre todo a causas nosocomiales. Otro aspecto importante a considerar en la epidemiología de este organismo es la disminución de sus infecciones debido a un desplazamiento en favor de candidiasis debidas a especies no *albicans* e infecciones fúngicas debidas a géneros no *Candida* (aspergilosis, zigomicosis, fusariosis) (Lass-Flörl, 2009). No obstante, *C. albicans* sigue siendo el principal agente causante de candidiasis sistémica (56,4 %), seguido de *C. glabrata* (13,6 %), *C. parapsilosis* (13,3 %) y *C. tropicalis* (7,2 %). En aquellos pacientes en los que se encontró una asociación de especies *Candida* la más habitual fue *C. albicans-C. glabrata* (Tortorano *et al.*, 2004).

En la actualidad se dispone de tres grupos de antifúngicos para combatir las infecciones producidas por *Candida*: polienos, azoles y equinocandinas. La anfotericina B (AmpB) es un polieno que se une al ergosterol de la membrana celular y altera la permeabilidad de la misma. En función de la dosis y la cantidad de patógeno su efecto puede ser fungiestático o fungicida. Su baja biodisponibilidad oral (< 5 %) y su elevada toxicidad renal son sus dos efectos negativos más importantes. Los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol al inhibir la enzima lanosterol-14- $\alpha$ -demetilasa. Los azoles son fungiestáticos y el espectro de actividad varía entre los distintos compuestos (Deck &

Guglielmo, 2006). Las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y nicafungina) inhiben el enzima  $\beta$ -1,3-D-glucansintasa. Presentan un espectro de acción limitado, son fungicidas con *Candida* y fungiestáticos con *Aspergillus*, mientras que *Cryptococcus* y *Trichosporum* son resistentes. Las equinocandinas no pueden penetrar ni en el sistema nervioso central ni en el ojo, por lo que no son el tratamiento adecuado en los casos de meningitis o endoftalmitis fúngicas (Bal, 2010).

### 8.3 La pared celular fúngica

La pared celular fúngica es una red tridimensional de polisacáridos. En su estructura se pueden distinguir dos capas, una interna compuesta por quitina (polímero lineal de  $\beta$ -1,4-GlcNAc) y  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,6-glucano (polímeros de glucosa), y una externa compuesta por manoproteínas. Las proteínas de la pared celular pueden estar unidas de forma covalente (proteínas Pir y proteínas unidas mediante enlace GPI) o de forma no covalente. Además aparece también fosfolipomanano, compuesto de una parte lipídica y una cadena de  $\alpha$ -1,2-manano (Fig. 2) (Kapteyn *et al.*, 2000; Chaffin, 2008).

La pared celular es una estructura dinámica y esencial para los hongos. Sus tres funciones principales son la resistencia a la turgencia celular, el mantenimiento de la forma celular y ser el primer punto de contacto con el medio que rodea a célula. Su síntesis tiene lugar de forma continua, ya que está conectada a todos los procesos biológicos de *C. albicans* (Smits *et al.*, 2001; Blankenship *et al.*, 2010). Cuando la integridad de la pared celular se ve afectada, las células activan una serie de mecanismos que aumentan la síntesis de quitina, glucano y manoproteínas y procuran una reordenación del citoesqueleto de actina (Smits *et al.*, 2001). Una glicosilación defectuosa conduce a inestabilidad proteica, errores en el plegamiento de las proteínas y pérdida de actividad de las mismas (Wagener *et al.*, 2008). Ya que muchas proteínas de la pared celular están glicosiladas, este proceso es esencial para la síntesis y mantenimiento de la pared celular.

### 8.4 Glicosilación

Las glicoestructuras participan en numerosos procesos celulares, desde aquellos con una incidencia escasa en la viabilidad celular a otros esenciales para la supervivencia de la

célula (Varki *et al.*, 1999). En este trabajo se resumen los procesos de *N*-glicosilación y *O*-glicosilación, aunque existen otros tipos como la fosfoglicosilación, *C*-manosilación y anclaje mediante GPI y un puente fosfoetanolamina.

#### 8.4.1 *N*-glicosilación

El proceso de *N*-glicosilación consiste en la unión del núcleo oligosacárido Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> al aminoácido asparagina de las proteínas. Este núcleo es sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) y transferido *en bloc* a la proteína. Posteriormente es modificado en el RE y en el aparato de Golgi. La secuencia peptídica diana para la transferencia es Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. No obstante, sólo el 30 % de estas secuencias son glicosiladas (Varki *et al.*, 1999). Aunque el núcleo oligosacárido se encuentra altamente conservado en eucariotas, las modificaciones posteriores difieren enormemente entre organismos.

#### 8.4.2 *O*-glicosilación

Los oligosacáridos unidos mediante enlace *O*-glicosídico presentan mayor variedad, tanto en el aminoácido de unión (Ser, Thr, Hyp, Hyl, Tyr) como en el azúcar (GalNAc, GlcNAc, Man y Fuc, y en menor medida Xyl, Gal, Glc y Ara) (Oka *et al.*, 2005; Spiro, 2002; Varki *et al.*, 1999). En levaduras la estructura principal es la unión de Man a los aminoácidos Ser y/o Thr.

#### 8.4.3 *O*-manosilación

Las proteínas *O*-manosiltransferasas (Pmt) catalizan la adición de la primera molécula de manosa a los aminoácidos Ser y/o Thr de la proteína aceptora. La molécula de manosa es donada por el Dol-P-Man. En la cara citosólica del ER una molécula de manosa proveniente de GDP-Man se une al dolicol mediante la enzima Dpm1. El dolicol introduce mediante un sistema de flip-flop el azúcar en el lumen del ER, donde las proteínas Pmt ejercen su función cambiando la configuración anomérica de la manosa de β- a α- (Ernst & Prill, 2001). La cadena de manosas puede ser alargada hasta siete residuos, pero en *C. albicans* sólo una o dos moléculas más son adicionadas mediante las proteínas Mnt1 y Mnt2 (Munro *et al.*, 2005). Los residuos de manosa en el aparato de Golgi provienen de GDP-Man. Este azúcar activado es importado en un intercambio con GMP. Tras la transferencia de la molécula de manosa el GDP es hidrolizado mediante la enzima Gda1 dando lugar a GMP y fosfato inorgánico. Dicho GMP es el utilizado para el contratransporte (Fig. 3) (Herrero *et al.*, 2002).

## 8.5 Las proteínas Pmt

Las proteínas Pmt se clasifican en tres subfamilias: Pmt1, Pmt2 y Pmt4. Inicialmente fueron descritas en *S. cerevisiae*, organismo en el que se han identificado siete isoformas, y posteriormente en otros hongos, en los que mayoritariamente se ha descrito una isoforma de cada familia. *C. albicans* presenta cinco isoformas Pmt. Más recientemente han sido descritas proteínas homólogas en *Drosophila melanogaster*, ratones y humanos. Por el contrario no se han encontrado homólogos ni en *Caenorhabditis elegans* ni en plantas (Gentzsch & Tanner, 1996; Prill *et al.*, 2005; Lengeler *et al.*, 2008).

Las proteínas Pmt son proteínas transmembrana localizadas en el RE y presentan una estructura general de siete dominios transmembrana con dos grandes bucles (bucle 1 y bucle 5). En el bucle 5 se encuentran tres motivos, A, B y C, altamente conservados (Girrbach *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2007). No se conoce la secuencia proteica consenso para la *O*-manosilación, pero ésta se produce en regiones ricas en los aminoácidos serina y treonina. Tampoco se conocen la mayoría de las proteínas diana de las isoformas Pmt. No obstante se ha observado, que Pmt4 *O*-glicosila preferentemente proteínas de membrana (Hutzler *et al.*, 2007).

Las proteínas Pmt forman en *S. cerevisiae* diversos complejos, Pmt1 interactúa con Pmt2 y Pmt5 con Pmt3. Si alguna de éstas falla, Pmt1 puede formar un complejo con Pmt3 y Pmt5 con Pmt2. Pmt4 forma homodímeros (Girrbach & Strahl, 2003).

### 8.5.1 Las proteínas Pmt en *C. albicans*

*C. albicans* presenta cinco isoformas Pmt. La delección de cada una de ellas da lugar a un fenotipo particular, motivo por el cual se ha afirmado que cada proteína realiza una función específica. El gen *PMT2* es esencial, y la doble mutación *pmt1 pmt4* es letal (Prill *et al.*, 2005). El mutante *pmt1* presenta una importante alteración de la pared celular (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005). Por el contrario, el mutante *pmt5* presenta un fenotipo silente a excepción de una disminución de virulencia en un modelo de infección epitelial (EHOM: engineered human oral mucosa) (Rouabhia *et al.*, 2005).

Las proteínas Pmt1, Pmt2, Pmt4 y Pmt6 forman homodímeros, y Pmt1 y Pmt2 forman además heterodímeros (Schmidt, 2007; Pilkahn-Reh, 2009).

La tabla 6 resume las principales características de las proteínas Pmt en *C. albicans*.

	Pmt1	Pmt2	Pmt4	Pmt5	Pmt6	
Mutante homocigótico	viable	no viable	viable	viable	viable	
Proteínas diana	Sec20 Kre9 Als1 Pir2 quitinasa		Axl2			
Funciones en las que participa	síntesis de la pared celular, morfogénesis, virulencia, formación de biofilm	esencial	virulencia, señales morfogénicas dependientes de las condiciones, formación de biofilm	¿?	virulencia, señales morfogénicas dependientes de las condiciones, formación de biofilm	
Dobles deleciones	<i>pmt1 pmt4</i> → no viable <i>pmt1 pmt6</i> → viable <i>pmt1 pmt5</i> → viable		<i>pmt4 pmt6</i> → viable			
Complejos de proteínas	Pmt1 ↔ Pmt1 Pmt1 ↔ Pmt2	Pmt2 ↔ Pmt2 Pmt1 ↔ Pmt2	Pmt4 ↔ Pmt4		Pmt6 ↔ Pmt6	
Formación de hifas	estándar	bloqueada	bloqueada	bloqueada	como el silvestre	bloqueada
	hipoxia, embebida	reducida	como el silvestre	hiperfilamentación	como el silvestre	hiperfilamentación

**Tabla 6:** Resumen de las proteínas Pmt en *C. albicans*.

### 8.5.2 Proteínas Pmt en otros hongos

Las proteínas Pmt han sido descritas también en otros hongos saprofitos y patógenos (Fig. 4). *S. pombe* presenta tres isoformas denominadas Ogm1/Oma1, Ogm2/Oma2 y Ogm4/Oma4, una por cada subfamilia. El doble mutante *omg1+ omg4+* y el triple mutante son viables en medio osmóticamente estabilizado. La cadena de manosa puede ser alargada con restos de galactosa (Tanaka *et al.*, 2005; Willer *et al.*, 2005). En *C.*

*neoformans* el mutante *pmt4* forma agregados y el septo de quitina entre la célula madre y la célula hija no es degradado, defectos que no muestra el mutante *pmt1*, y de forma opuesta al fenotipo correspondiente en *C. albicans* (Olson *et al.*, 2007; Willger *et al.*, 2009). El mutante *Afpmt1* de *A. fumigatus*, a pesar de sus defectos de pared celular y morfológicos, no presenta defectos de virulencia a 37 °C (Zhou *et al.*, 2007). Recientemente han sido descritas las proteínas Pmt en *U. maydis*. Sólo el mutante *pmt4* presentó una capacidad reducida para formar apresorios y, por tanto, también para penetrar en la cutícula de las plantas (Fernández-Álvarez *et al.*, 2009).

### 8.6 O-manosilación en eucariotas superiores

En humanos se han descrito dos homólogos de los genes *PMT*, *POMT2* (subfamilia Pmt2) y *POMT1* (subfamilia Pmt4). Las proteínas codificadas por estos genes forman un complejo, necesario para mostrar actividad POMT. Esta asociación, diferente de la de eucariotas inferiores (entre las subfamilias Pmt1/Pmt2), señala que la formación del complejo ha cambiado a lo largo de la evolución (Akasaka-Manyá *et al.*, 2006). El  $\alpha$ -dístroglicano es el substrato O-manosilado mejor descrito. Esta proteína forma parte del complejo de glicoproteínas dístrofina. Este complejo funciona como anclaje transmembrana entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina de las células. Su ensamblaje incorrecto altera la función muscular normal y la migración de neuronas en el cerebro (Van Reeuwjik *et al.*, 2004) y está asociado a distrofia muscular, defectos del desarrollo cerebral y anormalidades oculares. La asociación más grave de estos fenotipos se denomina síndrome de Walker-Warburg (WWS).

### 8.7 Rutas de señalización celular y regulación de la glicosilación

En *S. cerevisiae* se ha descrito la participación de dos rutas de señalización en respuesta a una glicosilación defectuosa. Una de ellas es la ruta SVG (STE vegetative growth) (Lee & Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009) y la otra es la ruta de integridad de la pared celular (CWI) (Philip & Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004). En *C. albicans* la principal ruta de señalización activada en respuesta a alteraciones en la glicosilación parece ser la ruta de la MAP quinasa Cek1 (Fig. 5) (Román *et al.*, 2009).

---

La ruta SVG fue identificada al observar el fenotipo sintético letal de diversos mutantes de glicosilación con el mutante *ste11*. Posteriormente se identificaron las proteínas participantes en la cascada: Sho1, Ste20, Ste7, Kss1 y Ste12 (Lee & Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000). Más recientemente se ha visto que la inhibición específica por parte de Pmt4 asociada a una inhibición de la *N*-glicosilación de Msb2 activa esta ruta en *S. cerevisiae* (Yang *et al.*, 2009). En *C. albicans* la proteína Msb2 presenta la misma estructura que en *S. cerevisiae*, y en presencia de tunicamicina activa a Cek1 (homóloga a Kss1 de *S. cerevisiae*) (Román *et al.*, 2009).

Mid2 y la familia de proteínas Wsc son los sensores de la ruta CWI en *S. cerevisiae*. Todas ellas se encuentran modificadas por las proteínas Pmt1, Pmt2 y Pmt4 (Lommel *et al.*, 2004). La sobreexpresión de *PMT1* en el mutante *pmt2 pmt4* rescató los defectos de glicosilación de Wsc1 pero no de Mid2. Del mismo modo, la sobreexpresión de los componentes de la cascada de la MAP quinasa Pkc1 también rescató el fenotipo del mutante *pmt2 pmt4* (Lommel *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la glicosilación de estos sensores influye en el plegamiento proteico y favorece de este modo la interacción con la pared celular (Philip & Levin, 2001; Lommel *et al.*, 2004). En *C. albicans* no se ha encontrado ningún homólogo de las proteínas Wsc o Mid2 (Prill, 2004).

---

## 9 Objetivos

La familia de genes *PMT* codifica para cinco isoformas de proteínas con actividad *O*-manosiltransferasa, implicadas en crecimiento, morfogénesis y virulencia de *C. albicans*. La delección de cada isoforma *Pmt* da lugar a un fenotipo específico, el cual no puede ser complementado con la sobreexpresión de las otras proteínas. Además, el análisis del transcriptoma de los mutantes *pmt* mostró que cada isoforma ejerce un efecto sobre distintos grupos de genes.

Se desconocen los mecanismos de regulación de los genes *PMT*. Para caracterizarlos, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Cuantificación de los niveles relativos de transcripción de los cinco genes *PMT* en la cepa CAF2-1 y en los mutantes *pmt*.
- 2.- Cuantificación de los niveles relativos de transcripción de los cinco genes *PMT* en condiciones en que el fenotipo en los mutantes *pmt* se hace más acusado, por ejemplo condiciones que inducen estrés en la pared celular o defectos en glicosilación.
- 3.- Análisis detallado de la región promotora de los genes *PMT*.
- 4.- Análisis de la activación de rutas de señalización en respuesta a una *O*-manosilación defectuosa.



## 10 Resultados y discusión

### 10.1 Transcripción de los genes *PMT*

En este trabajo se ha determinado el transcrito de los genes *PMT* mediante qPCR. Los valores se normalizaron frente al gen de referencia actina. Todas las medidas se llevaron a cabo en dos muestras biológicas independientes -representadas como dos columnas adyacentes en las gráficas- y por triplicado para cada punto -valor medio y desviación estándar de cada columna-. El gen *PMT5* presentó en la mayoría de los casos un valor de transcrito muy pequeño, seguramente en el límite de detección de la técnica, y las réplicas biológicas son para muchos de los experimentos discordantes. Debido a ello, los datos han sido incluidos como apéndice.

El transcrito relativo de los genes *PMT* se midió en los mutantes *pmt* y en otros mutantes de glicosilación y pared celular, con el objetivo de identificar si se producía algún tipo de respuesta(s) compensatoria(s) entre ellos. Los experimentos se realizaron a varias temperaturas de crecimiento, ya que ésta es un regulador de la morfogénesis y uno de los factores inductores de estrés; y en presencia de diferentes compuestos químicos que afectan al crecimiento de los mutantes *pmt*.

#### 10.1.1 Transcrito relativo de los genes *PMT* en los mutantes *pmt*

El transcrito de los genes *PMT* se midió en la cepa control CAF2-1 y en los mutantes *pmt* crecidos en medio rico hasta fase exponencial. En el mutante *pmt1* se observó una clara sobreexpresión de *PMT2*, en el mutante *pmt2/PMT2* se obtuvo también sobreexpresión de *PMT4*, mientras que en el mutante *pmt4* se detectó una ligera sobreexpresión de los transcritos de *PMT1*, *PMT2* y *PMT5* (Fig. 8). Por otro lado, se observaron dos efectos reguladores negativos, la práctica desaparición del transcrito de *PMT6* en el mutante *pmt2/PMT2*, y una reducción importante del transcrito de *PMT1* en el mutante *pmt6*. De estos datos se puede deducir que existe una compensación entre las isoformas de las proteínas Pmt a la falta de una de ellas, sin embargo ésta no está asociada a las subfamilias y desencadena efectos regulativos negativos en algunos casos.

### 10.1.2 Transcrito relativo de los genes *PMT* en función de la temperatura de incubación

Los cambios en la temperatura son un factor inductor de estrés importante en hongos (Fuchs & Mylonakis, 2009). Sin embargo, un incremento de la misma es también necesaria para la formación de hifas bajo determinadas condiciones (Shapiro *et al.*, 2009). La identificación de los genes expresados a diferentes temperaturas arroja información sobre los mecanismos de resistencia/virulencia en hongos patógenos.

La cepa control CAF2-1 se inoculó en YPD a 25, 30 y 37 °C. Se ha descrito que la glucosa es un inhibidor de la filamentación a altas concentraciones (> 0,5 %) (Maidan *et al.*, 2005), por lo que a 37 °C, aunque se observó formación de hifas, las células permanecieron principalmente en forma de levadura. Cuando se analizaron los transcritos de los genes *PMT* se obtuvo un patrón de respuesta por subfamilias. Los transcritos de *PMT1* y *PMT5* disminuyeron a medida que la temperatura aumentaba, mientras que para *PMT2* y *PMT6* se observaron transcritos estables a 25 y 30 °C, y un descenso de los mismos a 37 °C. Por el contrario, el transcrito de *PMT4* aumentó con el incremento de temperatura (Fig. 9). Como conclusión se puede afirmar, que las subfamilias Pmt1 y Pmt2 son importantes a bajas temperaturas, mientras que la subfamilia Pmt4 lo es a altas temperaturas. Dado que en el análisis del transcriptoma del mutante *pmt4* se detectó un incremento en la expresión de genes involucrados en síntesis proteica (Prill, 2004), la inducción de *PMT4* a altas temperaturas podría tener la finalidad de asegurar una correcta síntesis de proteínas.

### 10.1.3 Transcrito relativo de los genes *PMT* en la forma de hifa

La falta de cada proteína Pmt afecta en distinto grado la transición levadura-hifa. Todos los mutantes, excepto *pmt5*, presentan algún defecto de filamentación en condiciones normales de inducción en el laboratorio. No obstante, los mutantes *pmt4* y *pmt6* son hiperfilamentosos en condiciones de hipoxia y medio embedded (Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005).

Como condición de inducción de la filamentación se utilizó suero al 10 % en YP a 37 °C. Después de dos horas de incubación, cuando se recogieron las células de la cepa control, todas habían formado hifas. El transcrito de *PMT1* aumentó entre cuatro y seis veces respecto a los valores control, el transcrito de los genes *PMT2* y *PMT5* se incrementó ligeramente y el transcrito de *PMT4* disminuyó (Fig. 10). El mutante *pmt1*

es aquel que muestra los defectos de filamentación más acusados y también la regulación más clara.

Respecto a los resultados obtenidos en función de la temperatura de crecimiento de los cultivos y la inducción levadura-hifa se puede decir que, a 37 °C, el transcrito de *PMT4* es el más importante, cuando las células se encuentran mayoritariamente en la forma de levadura, mientras que en la forma de hifa es el de *PMT1*.

#### **10.1.4 Transcrito relativo de los genes *PMT* después del tratamiento de los cultivos con tunicamicina, rojo Congo y el inhibidor de Pmt1**

Los mutantes *pmt* son sensibles a compuestos alterantes de la pared celular (Prill *et al.*, 2005). Con el objetivo de determinar si alguno de los efectos se produce a nivel del transcrito, se determinó éste tras el tratamiento de las células con tunicamicina, con rojo Congo y con el inhibidor de Pmt1.

La tunicamicina es un compuesto análogo a UDP-GlcNAc que inhibe el primer paso de la síntesis del núcleo oligosacárido añadido a las proteínas *N*-glicosiladas. El rojo Congo es un compuesto intercalante que altera la síntesis del  $\beta$ -glucano, aunque también puede afectar a la síntesis de quitina (Kopécka & Gabriel, 1992; Roncero & Durán, 1985). El inhibidor de Pmt1 es un derivado del ácido acético de rodanina con bastante especificidad hacia la proteína Pmt1, demostrada mediante ensayos de actividad *in vitro* y de crecimiento celular (Orchard *et al.*, 2004), y por el hecho de que el crecimiento del mutante *pmt4* se ve fuertemente afectado, en concordancia con la letalidad de la doble mutación *pmt1 pmt4* (Prill, 2004).

El transcrito de *PMT1* aumentó en presencia de tunicamicina y rojo Congo, mientras se mantuvo en el mismo nivel que el control en presencia del inhibidor de Pmt1 (Fig. 11). El transcrito de *PMT2* y *PMT4* se vio incrementado en presencia del inhibidor de Pmt1, confirmando la compensación por parte de Pmt2 cuando la glicosilación debida a Pmt1 es defectuosa, como en el mutante *pmt1*, y por otra parte, señalando una diferencia respecto a la regulación a corto plazo o a largo plazo: el tratamiento con el inhibidor de Pmt1 (corto plazo) aumenta el transcrito de *PMT4*, por el contrario, en el mutante *pmt1* (largo plazo) el valor de *PMT4* se mantiene en el nivel del control.

El análisis de los datos correspondientes al inhibidor de Pmt1, junto con los obtenidos al medir el transcrito de los genes *PMT* en los mutantes *pmt*, sugiere que la falta de la isoforma Pmt1 es compensada con una sobreexpresión de la isoforma Pmt2 y con un

incremento de la isoforma Pmt4 a corto plazo pero no a largo plazo. Pmt1 y Pmt2 forman un heterodímero en *C. albicans* (Schmidt, 2007). Mientras en *S. cerevisiae* la falta de una de las dos proteínas posibilita la formación de los complejos Pmt1-Pmt3 y Pmt2-Pmt5, en *C. albicans* no se ha descrito interacciones similares. Debido a este motivo, la ausencia de Pmt1 es quizás compensada mediante un aumento de la formación del homodímero Pmt2. La compensación por parte de Pmt4 a corto plazo, pero no a largo plazo, sugiere que en la célula ocurren cambios metabólicos o de otra índole que permiten omitir esta modificación. Por otro lado, en el mutante heterocigótico *pmt2/PMT2* no se detectó ningún cambio en el transcrito de *PMT1*, probablemente porque aún es sintetizada suficiente proteína Pmt2 para formar el complejo con Pmt1. Sin embargo el transcrito de *PMT4* aumentó, indicando que la glicosilación debida a Pmt4 sustituye o compensa las modificaciones de Pmt1 y Pmt2, cuando éstas no pueden tener lugar.

#### **10.1.5 Transcrito relativo de los genes *PMT* en mutantes de glicosilación y pared celular**

La pérdida de las modificaciones que afectan al núcleo oligosacárido o a la elongación de las cadenas *O*-glicosídicas en *C. albicans* (p.ej. en el mutante *och1* [ramificación del núcleo oligosacárido] o en el mutante *gda1* [aprovisionamiento de Man en el complejo de Golgi]) desencadena alteraciones claras en la virulencia, la pared celular y la sensibilidad frente a compuestos alterantes de la misma (Mora-Montes *et al.*, 2009). De ahí la importancia de la glicoestructura completa. Para detectar cómo influye la eliminación de alguno de estos pasos en la expresión de los genes *PMT*, se determinó su transcrito en los mutantes *alg5*, *chs7*, *gda1*, *mnt1* y *och1*. Alg5 es la proteína encargada de transferir las moléculas de glucosa provenientes de UDP-Glc al dolicol-fosfato en el retículo endoplásmico. Estas moléculas de glucosa son posteriormente introducidas en el lumen del retículo endoplásmico y añadidas al núcleo oligosacárido (Martín Laso, 2003). Chs7 participa en el transporte de Chs3 (quitina sintasa 3) a partir del retículo endoplásmico (Sanz *et al.*, 2005). Las proteínas Mnt1 y Och1 se encargan de alargar las cadenas de *O*-manosilación y *N*-glicosilación, respectivamente. Mutantes en ambas proteínas muestran una pared celular alterada y menor virulencia en modelos de infección sistémica en ratones (Buurman *et al.*, 1998; Bates *et al.*, 2006). Gda1 es una proteína de membrana tipo II localizada en el aparato de Golgi. Lleva a cabo la reacción que hidroliza la ruptura de GDP a GMP más un grupo de fosfato inorgánico. El GMP

resultante de esta reacción es intercambiado de forma equimolar por GDP-manosa, proveyendo de este modo las moléculas de manosa que serán utilizadas para alargar las cadenas glicosídicas (Herrero *et al.*, 2002).

En todos los casos se observó sobreexpresión de *PMT1* y una ligera subexpresión de *PMT4* (excepto en el mutante *gdal*) (Fig. 12). El transcrito de *PMT2* no sufrió cambios significativos, sin embargo, sí se observó una disminución del mismo en el mutante *och1*, la cual junto a también una disminución del transcrito en presencia de tunicamicina, sugiere que es necesaria una *N*-glicosilación correcta para la expresión de *PMT2*. Por último, para el gen *PMT6* se detectó una disminución del transcrito en los mutantes *gdal* y *mnt1*. En conjunto se puede decir, que *PMT1* aparece sobreexpresado siempre que haya defectos en la glicosilación o en la pared celular, mientras que los demás genes *PMT* muestran regulación en condiciones concretas.

El incremento de la expresión de *PMT1* tanto en los mutantes de glicosilación, como en el caso de alteraciones de la pared celular podría considerarse desde dos puntos de vista. *Pmt1* glicosila muchas proteínas de la pared celular, por lo que el incremento de expresión podría interpretarse como un aumento de la eficiencia por parte de las células para manosilar las proteínas de la pared celular en compensación por los defectos originados debidos a la falta de las otras modificaciones. La segunda opción de interpretación aplicaría a *Pmt1* un papel de tipo regulador. Se ha descrito que la isoforma *Pmt1* controla la expresión de varios genes de la ruta UPR (unfolded protein response) (Prill, 2004). La ruta UPR no sólo es importante para rescatar el plegamiento correcto de las proteínas sino que juega también un papel importante en la biogénesis de la pared celular (Blankenship *et al.*, 2010). En este caso la proteína *Pmt1* sería necesaria para el correcto funcionamiento de la ruta UPR.

## 10.2 Regulación de los genes *PMT* a nivel de región promotora

Uno de los niveles de regulación de la transcripción de un gen viene determinado por la presencia de motivos en *cis* en la región promotora. Los elementos reguladores en *cis* son secuencias pequeñas, de 5 a 15 nucleótidos, normalmente degeneradas (Tsai *et al.*, 2007) y pueden encontrarse tanto en la zona más próxima al inicio del transcrito como en regiones más alejadas. De forma clásica, estos motivos se identifican con la ayuda de

un gen chivato. En este trabajo se han utilizado los genes chivatos *RLUC* y *lacZ* para estudiar las regiones promotoras de los genes *PMT1*, *PMT2* y *PMT4*.

### **10.2.1 Análisis de las regiones intergénicas aguas arriba y aguas abajo de los genes *PMT***

Se atribuye a las regiones intergénicas un papel regulador importante, en ellas se encuentran los motivos de inicio y terminación de los transcritos de los genes, y además evitan que la expresión de los genes interfiera entre ellos (Williams *et al.*, 2005). La secuencia de la región intergénica que rodea a los genes *PMT* se obtuvo de la base de datos *Candida* Genome Database ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)).

*PMT1*, *PMT5* y *PMT6* presentan regiones intergénicas largas en el extremo 5', mientras que la región intergénica aguas arriba de *PMT2* y *PMT4* es de 333 y 369 pares de bases respectivamente. Más características se resumen en las tablas 2 y 3.

### **10.2.2 Determinación del punto de inicio del transcrito de los genes *PMT***

El punto de inicio de los transcritos de los genes *PMT* se determinó mediante el método 5'RACE (rapid amplification of 5' cDNA ends) (Fig. 13). Para el transcrito del gen *PMT1* se obtuvieron dos puntos de inicio de transcripción, a -191 y a -7 nucleótidos aguas arriba del ATG inicial (Fig. 14). En el caso de *PMT2* se identificó un punto único a -69 nucleótidos (Fig. 16). En el transcrito de *PMT5* se detectaron varios puntos de inicio en el intervalo -90/-70 nucleótidos (Fig. 15). En los casos de *PMT4* y *PMT6* sólo se obtuvo un clon positivo para cada transcrito en la transformación de *E. coli*. Tras la secuenciación se determinaron como puntos de inicio uno a -42 nt para *PMT4* y el otro a -113 nt para *PMT6* (Fig. 16).

Bajic *et al.* (2006) concluyen, en un trabajo reciente, que el entorno del inicio del transcrito tiene más propiedades de las tradicionalmente descritas y clasifican estas regiones en cuatro grupos según su contenido en AT. El inicio de la transcripción puede no jugar ningún papel en la regulación génica; es, no obstante, el punto más económico energéticamente para ello (Carey & Smale, 2000). Aunque la clasificación de Bajic *et al.* (2006) está basada en promotores de humanos y ratones, hemos utilizado los mismos criterios para analizar el entorno del inicio de transcripción de los genes *PMT* de *C. albicans* (cálculo del contenido AT/GC en los 100 nucleótidos aguas arriba y aguas abajo del inicio del transcrito). Todas las regiones promotoras de los genes *PMT* en *C. albicans* se pueden encuadrar, según dichos criterios, en el grupo D, es decir, los

segmentos obtenidos en nuestro trabajo son ricos en contenido AT. Este grupo suele ser pobre en motivos en *cis*.

A continuación se analizó la presencia de cajas TATA. En levaduras un promotor con caja TATA es aquel en el que ésta (con una secuencia consenso TATAWAWR) se encuentra en el intervalo -200/-50 bp (Basehoar *et al.*, 2004; Tirosh *et al.*, 2007) aguas arriba del ATG inicial. De acuerdo a esta definición Los genes *PMT* no presentan cajas TATA. Sin embargo dentro del transcrito más largo de *PMT1* aparecen en dos puntos una caja TATA (Fig. 14), en la que se solapan las progresivas secuencias consenso de la misma (TATAAA (Harbury & Struhl, 1989); TATAAAWW (Iyer & Struhl, 1995); TATAWAWR (Basehoar *et al.*, 2004; Tirosh *et al.*, 2007)). A pesar de que ambas cajas TATA se encuentran invertidas, éstas podrían regular el transcrito de *PMT1* que empieza en la posición -7 nt. Cox *et al.* (1997) describieron que la proteína TBP de *S. cerevisiae* podía unirse a la caja TATA del promotor de *CYCI* independientemente del sentido de la misma y, más recientemente, Su *et al.* (2006) han publicado que la expresión basal del gen BSP (bone sialoprotein) se encuentra regulada por las cajas CCAAT y TATA invertidas.

Se ha descrito que otros motivos pueden reemplazar las cajas TATA. Uno de ellos son las cajas GATA. Éstas aparecen en *S. cerevisiae* en genes que regulan el catabolismo del nitrógeno (Cox *et al.*, 2000). En los genes *PMT4* y *PMT6* aparece una caja GATA en las proximidades del inicio del transcrito (Fig. 16).

El dato más significativo encontrado en nuestras secuencias es la presencia de un motivo “CAACCA” al inicio de los transcritos de *PMT1* y *PMT5*, ambos pertenecientes a la misma subfamilia (Fig. 14 y 15). Con el objetivo de caracterizar su posible papel regulador se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales. En la primera determinamos el inicio del transcrito en ortólogos de los genes *PMT* en otra levadura; para ello se eligió *Y. lipolytica* (ver próximo apartado). En la segunda aproximación experimental tratamos de detectar posibles interacciones ARN-proteína entre la región promotora -221/-1 de *PMT1* y la proteína endoribonucleasa Dom34 mediante un sistema de tres híbridos. En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la sobreexpresión de Dom34 puede rescatar parcialmente el fenotipo del mutante *pmt1* (J. Hilbig, comunicación personal). El sistema de tres híbridos permite analizar interacciones ARN-Proteína, sin embargo, a menudo las condiciones del ensayo no son las óptimas y aparecen resultados falsos positivos o negativos. En nuestro caso el

ensayo produjo un resultado negativo (véase el apéndice, Fig. 50). Posteriormente se decidió estudiar la activación del gen chivato *RLUC* aguas abajo del promotor de *PMT1* en una construcción con el motivo CAACCA y otra sin él, durante la sobreexpresión del gen *DOM34*. En este experimento la actividad de luciferasa fue mayor en los transformantes en los que se había introducido la construcción con el motivo CAACCA (J. Hilbig, comunicación personal). El motivo CAACCA podría ser un sitio de unión para Dom34. Serán necesarios más experimentos para elucidar este punto.

### **10.2.3 Identificación de genes ortólogos a los genes *PMT* en *Y. lipolytica* y establecimiento del punto de inicio de sus transcritos**

La comparación de las secuencias de las proteínas Pmt de *C. albicans* con el genoma de *Y. lipolytica* permitió identificar cuatro secuencias ortólogas: dos clasificadas en la subfamilia Pmt1 (*PMT1-1*: YALI0E15081g, *PMT1-2*: YALI0D10549g), una perteneciente a la subfamilia Pmt2 (*PMT2*: YALI0C23364g) y otra perteneciente a la subfamilia Pmt4 (*PMT4*: YALI0E05929g).

El punto de inicio de los transcritos de los genes *PMT* de *Y. lipolytica* se determinó a partir de ARN total de la cepa SA-1 crecida a 28 °C hasta fase exponencial. Los productos de PCR obtenidos en el proceso 5'RACE se clonaron en el vector pGEM. Se secuenciaron tres clones de cada producto. La secuencia "CAACCA" aparece en uno de ellos, YALI0D10594g (*PMT1-2*) (Fig. 17), ortólogo clasificado en la subfamilia Pmt1 y filogenéticamente más cercano a ScPmt7. La presencia del motivo en un tercer transcrito refuerza la idea de una posible función reguladora del mismo.

### **10.2.4 Análisis de la región promotora del gen *PMT1***

Mediante una PCR estándar se amplificaron 1147 pares de bases de la región promotora de *PMT1* y se ligaron en los plásmidos pES2 (sitios de corte *XmaI/AflII*) y pAU36 (sitios de corte *KpnI/PstI*; Uhl & Johnson, 2001). Estos plásmidos contienen los genes chivatos *RLUC* y *lacZ*, respectivamente. Las nuevas construcciones se denominaron pPdC1 (*RLUC*) y pPdC38 (*lacZ*) (Fig. 18). Sobre pPdC1 se realizaron, mediante mutagénesis dirigida, una serie de deleciones de fragmentos de aproximadamente 100 bp de la región promotora de *PMT1* (Fig. 19). Todas las construcciones se integraron en el sitio de corte *Bst1107I* del locus silvestre y los transformantes obtenidos se comprobaron mediante Southern blot para confirmar la integración de una copia única de los plásmidos.

La base sobre la que se asienta este análisis es la validación y extensión de resultados anteriores. El mutante *pmt1* es sensible a varios compuestos alterantes de la pared, ¿tienen éstos un efecto directo sobre el gen o se trata de un efecto indirecto?. El mutante *pmt1* presenta defectos de filamentación y es regulado durante la transición levadura-hifa (apartado 10.1.3). Además se han descrito algunos factores de transcripción reguladores de la misma y sus motivos de unión al ADN, ¿es posible acotar un fragmento de la región promotora donde se encuentre alguno de estos motivos?. Por último, hemos detectado que la expresión del gen *PMT1* se induce en algunos mutantes de glicosilación y pared celular (apartado 10.1.5), ¿puede este efecto ser analizado a nivel del promotor?.

En relación a la primera pregunta, se utilizaron inicialmente los transformantes con el gen chivato *lacZ* para analizar la activación a nivel de promotor del gen *PMT1* después de tratamientos con tunicamicina, rojo Congo y calcoflúor. Sólo en presencia de tunicamicina se obtuvo una activación inequívoca a nivel del promotor (Fig. 20). A continuación se midió, en presencia de tunicamicina, la activación de luciferasa de las construcciones del promotor delecionado de *PMT1* aguas arriba del gen chivato *RLUC*. La activación con tunicamicina quedó confirmada con la construcción de 1147 bp. Las construcciones Del1 y 2Del2 presentaron un valor de activación basal menor que el fragmento de 1147 bp, probablemente debido a un inicio de transcripción defectuoso, sin embargo en presencia de tunicamicina se activaron ambas fusiones. Las construcciones Del3 y 3Del4 presentaron un valor de activación basal mayor a la del fragmento inicial y el tratamiento con tunicamicina no indujo cambios significativos (Fig. 21), por este motivo se analizó la secuencia de ambos fragmentos con más detenimiento. En la deleción 3Del4 se encontró un motivo de unión para el factor de transcripción Swi5 y parcialmente superpuesto otro para el factor de transcripción Ace2. Ambas proteínas se unen a la misma secuencia de ADN (Dohrmann *et al.*, 1996; Voth *et al.*, 2007), sin embargo activan distintos genes debido a la actuación de las proteínas Fkh1 y Fkh2. En *C. albicans* se ha descrito una única proteína homóloga, denominada Ace2 (Kelly *et al.*, 2004). El motivo de unión Swi5/Ace2 se delecionó en el plásmido pPdC38 (plásmido resultante pPdC55) y se substituyó por el sitio de restricción *SwaI*. En presencia de tunicamicina esta nueva construcción se activó con la misma intensidad que la construcción inicial (Fig. 22), por lo que se puede deducir que, o bien no es

responsable de la pérdida de activación en la delección 3Del4, o bien no es suficiente para la misma.

Respecto a la regulación de la región promotora de *PMT1* durante la transición levadura-hifa, la actividad de luciferasa se determinó durante el cambio morfológico en YP + 10 % suero a 37 °C. Todas las construcciones del gen chivato *RLUC* presentaron el mismo patrón de activación en forma de campana, aunque de nuevo las delecciones Del1 y 2Del2 se activaron de forma más limitada (Fig. 23). De este experimento se puede concluir que ninguno de los fragmentos delecionados es esencial para la activación de *PMT1* durante la filamentación en las condiciones ensayadas.

Por último, el plásmido pPdC1 se integró en el locus silvestre de *PMT1* en los mutantes *pmt1* (CAP1-3121), *pmt4* (CAP4-2164), *chs7* (CRM693), *alg5* (NAC4) y *mnt1* (NGY24). Excepto en el mutante *alg5*, el nivel basal de expresión del promotor de *PMT1* fue más alto que en la cepa CAI4 y el tratamiento con tunicamicina no modificó dicho valor (Fig. 24), confirmando los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa. El efecto observado en el mutante *pmt1* sugiere una regulación de la proteína Pmt1 sobre su propio promotor (promotor autorregulable).

#### 10.2.5 Análisis de la región promotora de *PMT2*

Mediante PCR se amplificaron fragmentos de longitud decreciente (1000 bp, 799 bp, 669 bp, 539 bp, 333 bp y 140 bp) y se clonaron aguas arriba del gen chivato *RLUC*. Las nuevas construcciones se integraron en el locus externo *RPS10*, ya que la región intergénica en el extremo 5' de *PMT2* es de sólo 333 bp. De esta forma se pretendía evitar efectos secundarios debidos a la interrupción del ORF previo. Las construcciones del promotor de *PMT2* se analizaron en presencia de tunicamicina (2 µg/ml), el inhibidor de Pmt1 (4 µg/ml) y ciclosporina A (16 µg/ml), con los que se ha detectado regulación a nivel de transcrito (aparatados 10.1.4 y 10.3.1). No se obtuvieron diferencias de activación respecto a los valores basales para ninguna de las sustancias, a excepción de las detectadas en la construcción de 539 bp en la que, en presencia de tunicamicina, se observó un descenso de la activación, tanto en el locus externo como en el locus nativo (Fig. 25 y 26). A la vista de estos datos, se puede deducir que *PMT2* está regulado principalmente a nivel postranscripcional. Ello puede ser debido a la escasa longitud de la región intergénica aguas arriba del gen o a que éste se exprese de forma constitutiva.

El marco de lectura previo a *PMT2*, *ORF19.6813*, es un ORF posiblemente falso según se describe en la base de datos *Candida* Genome Database ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)), aunque en la base de datos *CandidaDB* ([genolist.pasteur.fr/CandidaDB](http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB)) se le atribuye una función desconocida. Para determinar si este ORF es transcrito se realizó una PCR cuantitativa. Se detectó un transcrito con un bajo nivel de expresión en las condiciones ensayadas. A partir de este dato se decidió delecionar el marco de lectura abierto 19.6813 (Fig. 27). Se analizó el comportamiento de los mutantes heterocigótico y homocigótico en presencia de diversos compuestos inductores de estrés: 0,5 M KCl, 1 M NaCl y 1,5 M NaCl, 2 M sorbitol, 0,06 % y 0,10 % SDS, 10 µg/ml calcoflúor, 10 µM cafeína, 125 µg/ml rojo Congo. Ninguno de los mutantes presentó un defecto de crecimiento en estas condiciones. En cambio sí se observó un defecto de filamentación en los medios Lee y Spider distinto al que presenta el mutante *pmt2/PMT2* (Fig. 28). Es necesaria la reintroducción del gen para confirmar el fenotipo, pero se puede especular con la idea de un gen que codifica para una proteína implicada en filamentación bajo determinadas condiciones. El análisis mediante FASTA indica que existen genes ortólogos en *Candida dubliniensis* ( $1,1 \text{ e}^{-95}$ ) y en *Candida tropicalis* ( $2,7 \text{ e}^{-21}$ ) lo que puede sugerir que esta proteína sea específica del género *Candida*.

#### 10.2.6 Estudio de la región promotora de *PMT4*

La región intergénica aguas arriba de *PMT4* tiene una longitud de 369 pares de bases. El marco de lectura abierto previo es el *ORF19.4110*, el cual codifica para una proteína homóloga a Mlp1 de *S. cerevisiae*. Se clonaron tres fragmentos de región promotora de *PMT4* de 1000, 500 y 370 bp aguas arriba del gen chivato *RLUC* para su análisis. De acuerdo con los resultados de la regulación a nivel de transcrito, se estudió la activación de las fusiones en presencia de tunicamicina, del inhibidor de Pmt1 y de ciclosporina A. Sólo la fusión que se ciñe a la región intergénica teórica fue activada. En presencia de tunicamicina se detectó un incremento en la actividad de luciferasa. Este dato fue corroborado con una construcción conteniendo el fragmento de 370 bp y el gen chivato *lacZ* insertada en el locus nativo (Fig. 29). No se detectaron cambios de actividad cuando se realizaron tratamientos con el inhibidor de Pmt1 (4 µM) o con ciclosporina A (16 µg/ml).

Las pequeñas regiones intergénicas en el extremo 5' de los genes *PMT2* y *PMT4*, junto a la falta de actividad de sus correspondientes regiones promotoras, sugiere que ambos genes no se encuentran regulados a nivel de promotor, sino en estadios posteriores. La

discrepancia para *PMT4* entre la activación a nivel de promotor y el transcrito indica, además, que también ha de ser considerado el entorno del locus nativo.

### 10.3 Activación de rutas de señalización en respuesta a una *O*-manosilación defectuosa

La detección de las señales externas y su transmisión al interior celular es un proceso fundamental para la supervivencia de las células.

En *S. cerevisiae* defectos en la *O*-glicosilación y *N*-glicosilación son detectados y regulados por las rutas SVG (Ste50 vegetative pathway) y CWI (Lee & Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000; Lommel *et al.*, 2004). En *C. albicans* por el contrario la principal vía de señalización de defectos en glicosilación es la ruta de la MAP quinasa Cek1. Se ha descrito que en el mutante *och1* se activan tanto Cek1 como Mkc1 (Bates *et al.*, 2006). En los mutantes *pmt1* y *pmt4* Cek1 es fosforilada, sin embargo, en ninguno de los mutantes *pmt* se detectó una activación de la proteína Mkc1 (Cantero *et al.*, 2007), por lo que su activación en el mutante *och1* podría deberse a un efecto indirecto. Recientemente se ha publicado que el sensor de membrana Msb2 activa Cek1 en respuesta a defectos de *N*-glicosilación (Román *et al.*, 2009).

Para abordar la participación de distintas rutas de señalización en respuesta a defectos en la *O*-glicosilación, se observó el crecimiento de los mutantes *hog1*, *cek1*, *mkc1*, *skn7*, *efg1*, *tpk1*, *tpk2*, *cnal* y *crz1* en presencia del inhibidor de Pmt1.

La falta de *O*-manosilación específica de Pmt1 ha de ser compensada de alguna forma, bien por la inducción de otros genes *PMT* o de genes que codifiquen para proteínas que intervienen por ejemplo en la síntesis de quitina o  $\beta$ -glucano. Por tanto, la alteración simultánea de la ruta de señalización no permitirá la transmisión de la señal compensatoria, y el crecimiento de las células se verá bloqueado. Después de 24 h de incubación a 30 °C se registró un bloqueo parcial del crecimiento de los mutantes *mkc1*, *cek1*, *tpk1*, *efg1* y *cnal*. Sin embargo, éste se recuperó a las 48 h, excepto en el mutante *cnal* (Fig. 30). Curiosamente, el crecimiento de *crz1* no se vio afectado en absoluto. Crz1 es el factor de transcripción mejor descrito aguas abajo de calcineurina. Crz2 es una proteína homóloga a Crz1. El doble mutante *crz1 crz2* tampoco presentó defectos de crecimiento. De estos resultados se desprende que la respuesta a una *O*-glicosilación

defectuosa en *C. albicans* es bifásica, en un primer momento serían necesarias las proteínas Mkc1, Cek1, Tpk1, Efg1 y calcineurina, pero a largo plazo sólo calcineurina es imprescindible para la respuesta. Sugerimos que la ruta de calcineurina funciona, en este caso, a través de uno o varios factores de transcripción todavía no identificados.

A la vista de estos datos decidimos seguir tres líneas de investigación: analizar con detenimiento el efecto del inhibidor de Pmt1 sobre calcineurina; estudiar la cascada de la MAP quinasa Cek1 en respuesta al inhibidor de Pmt1, ya que ésta es activada tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* cuando se alteran procesos de glicosilación (Yang *et al.*, 2009; Román *et al.*, 2009); y analizar una colección de mutantes de factores de transcripción en busca de alguno que actúe sobre los genes *PMT*.

### 10.3.1 La ruta de calcineurina

La proteína calcineurina es una fosfatasa muy conservada en eucariotas. Posee dos subunidades, una catalítica (CnA) y otra reguladora (CnB). La subunidad CnA a su vez posee cuatro dominios, uno catalítico y tres reguladores: el dominio de unión a la subunidad CnB, el dominio de unión a calmodulina y un dominio autoinhibidor (Stie & Fox, 2008). El mutante *cnal* presenta algunos fenotipos interesantes, por ejemplo sensibilidad frente a SDS, rojo Congo y calcoflúor y defectos de filamentación en medios SLAD y Spider, que indican defectos tanto en la composición de la pared celular como en el proceso de morfogénesis (Sanglard *et al.*, 2003).

La proteína calcineurina es inhibida por ciclosporina A (CsA) y FK506 (tacrolimus) (Stie & Fox, 2008). Ambos productos son antibióticos que se unen a las proteínas ciclofilina y FKBP, respectivamente. Los compuestos resultantes se unen posteriormente a las dos subunidades de calcineurina, aproximadamente en el mismo sitio y con gran afinidad (Hemmenway, 1999).

Dado que ciclosporina A inhibe a la proteína calcineurina, se determinó el crecimiento de los mutantes *pmt* en presencia de este compuesto. Se llevó a cabo mediante un ensayo de sensibilidad. El crecimiento de *pmt1* resultó fuertemente reprimido, mientras que el del mutante *pmt2/PMT2* lo fue parcialmente (Fig. 31). El bloqueo simultáneo de Pmt1 y calcineurina es por tanto letal para las células.

A continuación se estudió más detalladamente el efecto del inhibidor de Pmt1 sobre el mutante *cnal*. Se preparó un ensayo de viabilidad, en el que la cepa control CAF2-1 y el mutante *cnal* se inocularon en YPD, YPD + 4  $\mu$ M inhibidor de Pmt1, YPD + 4  $\mu$ g/ml

CsA y YPD con la misma concentración de ambos compuestos (Fig. 32). EL mutante *cnal* en presencia de CsA creció igual que los controles CAF2-1 y *cnal* sólo en YPD, de acuerdo con la resistencia del mutante al compuesto. El efecto del inhibidor de Pmt1 sobre el mutante *cnal* no es letal, sino que únicamente bloquea el crecimiento de forma estable, pues el número de unidades formadoras de colonias se mantiene más o menos estable con el paso del tiempo, en vez de disminuir. El crecimiento retardado de CAF2-1 en presencia de los dos compuestos sugiere un efecto sinérgico de los mismos.

También se determinó el transcrito de los genes *PMT* en el mutante *cnal* y en la cepa control CAF2-1 tratada con 4 µg/ml de CsA. Se observó un patrón de respuesta que difiere según el bloqueo sea a corto plazo (CsA) o a largo plazo (mutante). El transcrito de *PMT1* aumentó de forma significativa en el mutante *cnal*, mientras que en presencia de CsA el aumento fue mucho menor (Fig. 33). El transcrito de *PMT2* se vio reducido en ambos casos. *PMT4* presenta valores similares en la cepa control y en el mutante *cnal*, mientras que cuando las células son tratadas con CsA su transcrito disminuye. Finalmente, la disminución del transcrito de *PMT6* fue tan acusada en *cnal*, que la eficiencia de la reacción no pudo ser calculada.

Estos resultados sugieren que calcineurina reprime en condiciones normales la expresión del gen *PMT1*, mientras que es necesaria para la expresión basal de *PMT2*. Además, la inhibición de calcineurina parece provocar una respuesta bifásica sobre los genes *PMT*. A corto plazo (ciclosporina A) las células reaccionan de una manera, mientras que a largo plazo (mutante) ocurren cambios metabólicos o de otra naturaleza, que desencadenan una regulación ligeramente diferente de los genes *PMT*.

Una pregunta que queda por responder es qué factor de transcripción u otra proteína se encuentra en la cascada por debajo de calcineurina. Una posibilidad sería el factor de transcripción Ace2 (ver sección 10.3.3). Aunque esta proteína sólo ha sido asignada como componente de la ruta RAM (Song *et al.*, 2008), una comparación de la secuencia aminoacídica contra el genoma de *C. albicans* dio como mejor resultado homología con las proteínas Crz1 y Crz2 ( $E= 7,2 \cdot 10^{-15}$  y  $3,9 \cdot 10^{-12}$ , respectivamente), por tanto, calcineurina podría actuar sobre Ace2. En *S. cerevisiae* calcineurina posee también proteínas diana que no son factores de transcripción (Cyert, 2003). A pesar de que modificaciones similares no han sido descritas en *C. albicans* (Karababa *et al.*, 2006), otra hipótesis a seguir sería que calcineurina actuase directamente sobre las proteínas Pmt. En trabajos anteriores no se ha estudiado si las proteínas Pmt son fosforiladas,

pero todas ellas presentan posibles residuos susceptibles para ello en los extremos amino y carboxi y en los bucles entre los dominios transmembrana (Pmt1: 21 residuos, Pmt2: 16 residuos y Pmt4: 19 residuos; cálculo con el programa [www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast)).

### 10.3.2 Participación de la ruta de la MAP kinasa Cek1 en respuesta a defectos en *O*-manosilación

La proteína Cek1 en *C. albicans* participa en procesos de crecimiento exponencial, filamentación y síntesis de la pared celular (Csank *et al.*, 1998; Eisman *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Las proteínas que conforman esta ruta son Msb2, Sho1, Cst20, Ste11, Hst7 y Cek1 (Arana *et al.*, 2008; Román *et al.*, 2009). Yang *et al.* (2009) han descrito que, en *S. cerevisiae*, Msb2 es glicosilada por Pmt4 y el heterodímero Pmt1/Pmt2. En *C. albicans* Msb2 aparece también ampliamente glicosilada, preferentemente por Pmt1 (E. Szafranski, comunicación personal). Como ya se ha comentado, Msb2 activa Cek1 en respuesta a defectos en *N*-glicosilación (Román *et al.*, 2009).

Con estos datos como punto de partida, se calculó el transcrito de los genes *PMT* en los mutantes *msb2* y *cek1* en presencia de tunicamicina y del inhibidor de Pmt1.

Para ambos mutantes, a pesar de la discordancia para algún par de réplicas biológicas, se observó un aumento del transcrito de *PMT1*, el cual no varió cuando las células fueron tratadas con tunicamicina o el inhibidor de Pmt1. Respecto a los genes *PMT2* y *PMT4* no se detectó ningún cambio en comparación con los valores control (Fig. 34). Es significativo que la inducción de la transcripción de ambos genes en respuesta al inhibidor de Pmt1 se perdió en los mutantes *msb2* y *cek1*. Se desprende por tanto, que la ruta de la MAP quinasa Cek1 inhibe en condiciones normales la expresión del gen *PMT1* y a su vez participa en la regulación de los genes *PMT2* y *PMT4* cuando se bloquea la glicosilación debida a Pmt1.

Finalmente se analizó el crecimiento de los mutantes en los dos sensores de membrana de la ruta, Msb2 y Sho1, y también el del doble mutante, en presencia del inhibidor de Pmt1, tunicamicina y caspofungina. El crecimiento del mutante *msb2* se vio afectado de forma ligera en presencia de altas concentraciones (12 y 18  $\mu$ M) del inhibidor de Pmt1 y de forma importante en presencia de tunicamicina (Fig. 35). El mutante *sho1* mostró resistencia a ambos compuestos. El efecto inhibitorio de crecimiento sobre el doble mutante *msb2 sho1* fue algo más acentuado que en el caso de *msb2*. El compuesto

caspofungina inhibe fuertemente el crecimiento de todos los mutantes. De estos datos se puede deducir, que ambas proteínas contribuyen a la transmisión de defectos en la *O*- y *N*-glicosilación.

### 10.3.3 Análisis de una colección de mutantes de factores de transcripción en respuesta a un bloqueo de la *O*-manosilación

En los apartados anteriores se ha descrito la participación de las rutas de calcineurina (pero no de sus factores de transcripción conocidos *Crz1* y *Crz2*) y *Cek1* en la regulación de los genes *PMT*. Posteriormente hemos tratado de identificar factores de transcripción involucrados en la regulación de los genes *PMT*. Para ello se analizó una colección de mutantes de factores de transcripción amablemente cedida por los profesores D. Sanglard y A. Mitchell. Un total de 328 mutantes (aunque varios están duplicados), así como las cepas CAF2-1, BWP17, SPCa2 y SPCa6 como controles, se sembraron mediante estría en YPD, YPD + 4  $\mu$ M inhibidor de *Pmt1*, YPD + 16  $\mu$ g/ml *CsA* y YPD + 200  $\mu$ g/ml higromicina B. El crecimiento se analizó y fotografió después de incubaciones a 30 °C de 24, 48 y 72 horas (datos no mostrados). Aquellos mutantes, para los que se observó un defecto de crecimiento a las 48 h, se analizaron de nuevo en las mismas condiciones en un ensayo de sensibilidad. De los diez candidatos iniciales sólo uno presentó un claro defecto de crecimiento, el mutante *ace2* (Fig. 36).

El factor de crecimiento *Ace2* regula en *C. albicans* genes de pared celular, del proceso de glucólisis, de la cadena respiratoria en las mitocondrias y del metabolismo lipídico (Mulhern *et al.*, 2006). En concreto, entre los genes regulados se encuentran *PMT2*, *PMT4* y *PMT6*.

Para analizar el efecto de *Ace2* sobre los genes *PMT*, se determinó su transcrito en el mutante *ace2* en YPD, y tras tratamientos del mutante con el inhibidor de *Pmt1* y con tunicamicina. Además, se sobreexpresó *ACE2* en el mutante *pmt1*, con el objetivo de determinar si la sobreexpresión era capaz de rescatar el fenotipo del mutante.

#### 10.3.3.1 Transcrito relativo de los genes *PMT* en el mutante *ace2*

Al igual que en los casos anteriores, se extrajo el ARN del mutante *ace2* de células crecidas en condiciones control (YPD), tras el tratamiento con tunicamicina (2  $\mu$ g/ml) y con el inhibidor de *Pmt1* (4  $\mu$ M). La expresión basal de *PMT1* es en *ace2* algo mayor que en la cepa silvestre. La tunicamicina no indujo ningún cambio, mientras que el inhibidor de *Pmt1* ejerció un efecto represor. La expresión basal de los genes *PMT2* y

*PMT4* en el mutante *ace2* es menor que en la cepa control, y la expresión compensatoria frente a la inhibición de Pmt1 observada en la cepa control no tuvo lugar (Fig. 34). Sugerimos que, en condiciones normales, Ace2 reprime la expresión de *PMT1* y que además sería necesario para la expresión basal y en la respuesta compensatoria a la falta de Pmt1 de los genes *PMT2* y *PMT4*.

### 10.3.3.2 Sobreexpresión de *ACE2* en el mutante *pmt1*

El gen *ACE2* se clonó bajo el control del promotor *PCK1*. Para ello se amplificó el gen mediante PCR con los oligonucleótidos *BglIII ACE2* for y *BglIII ACE2* rev y se insertó en el sitio de restricción *BglIII* del plásmido pBI-1, dando lugar al plásmido pPdC54. El promotor *PCK1* se induce en medio CAA, sin embargo, debido a su elevada actividad basal, también presenta cierta actividad en presencia de glucosa. Las cepas CAI4 y CAP1-2131 (*pmt1*) se transformaron con los plasmados pBI-1 y pPdC54. Se analizaron tres colonias de cada transformación en los medios activadores CAA y YPGal, y en el medio represor YPD suplementados con tunicamicina, rojo Congo, calcoflúor, higromicina B y clotrimazol, con la finalidad de analizar si la sobreexpresión de *ACE2* es capaz de resolver el fenotipo del mutante *pmt1* (Fig. 37). La resistencia del mutante *pmt1* transformado con el plásmido pPdC54 a los compuestos elegidos indica que la sobreexpresión de *ACE2* puede rescatar el fenotipo del mutante, incluso el fenómeno de agregación celular (Fig. 38). Por otro lado, se observó, que la sobreexpresión de *ACE2* en la cepa CAI4 tiene un efecto nocivo.

Los mutantes *ace2* y *pmt1* presentan algunos fenotipos semejantes, por ejemplo alteraciones en pared celular, agregación celular y defectos en filamentación en condiciones de hipoxia (Kelly *et al.*, 2004; Mulhern *et al.*, 2006; Timpel *et al.*, 1998; Prill *et al.*, 2005), no obstante, aunque la sobreexpresión de *ACE2* en el mutante *pmt1* pudo rescatar los fenotipos estudiados, no queda claro si el efecto de Ace2 sobre la regulación del gen *PMT1* es directo o indirecto principalmente por dos razones: a) un posible motivo de unión para Ace2 en el promotor de *PMT1* se identificó con la ayuda de la base de datos TRANSFAC (sección 10.2.4), sin embargo, la delección de este motivo no dio lugar a una pérdida de actividad de la construcción (Fig. 22), bien por no ser el punto de unión o bien por formar parte de un complejo mayor de proteínas reguladoras y por tanto existir todavía cierta interacción aun a falta del motivo y b) aunque el transcrito de *PMT1* se ve modificado en el mutante *ace2*, éste no aparece en el transcriptoma de Mulhern *et al.* (2006), a pesar de los numerosos fenotipos comunes.

### 10.3.3.3 La ruta RAM de señalización celular

Hasta el momento se ha descrito que el factor de transcripción Ace2 sólo interviene en la ruta de señalización RAM que regula el crecimiento polarizado de las células (Song *et al.*, 2008). La quinasa Cbk1 es la proteína que actúa por encima de Ace2. Para determinar la posible participación de esta cascada en respuesta a una *O*-manosilación defectuosa, se analizó el crecimiento del mutante *cbk1* en presencia del inhibidor de Pmt1. Éste presentó cierta sensibilidad frente al compuesto, y también frente a tunicamicina e higromicina B (Fig. 39). El fenotipo coincide con el del mutante *ace2*, excepto para higromicina B, por lo que se puede inferir una participación de ambas proteínas en respuesta a una *O*-manosilación incorrecta.

### 10.3.4 Transcrito relativo de los genes *PMT* en presencia simultánea de tunicamicina y ciclosporina A

Finalmente, teniendo en cuenta todos los datos obtenidos con los mutantes *cnal*, *msb2* y *cek1*, decidimos analizar el transcrito de los genes *PMT* en presencia simultánea de tunicamicina y ciclosporina A. Ambas rutas reprimen la expresión de *PMT1* en condiciones normales, y, al mismo tiempo, son necesarias para la expresión basal y la activación de los genes *PMT2* y *PMT4*.

Se ha publicado (Dudgeon *et al.*, 2008) que la ruta de calcineurina se activa en respuesta a estrés inducido por tunicamicina, y que la asociación de tunicamicina con FK506 o ciclosporina A conduce a la muerte celular. Además, el estrés inducido en el retículo endoplásmico mediante tunicamicina activa en *S. cerevisiae* la ruta Mpk1 (Cohen *et al.*, 2008). Sin embargo en *C. albicans* no se ha observado fosforilación de Mkc1 bajo las mismas condiciones (Román *et al.*, 2009). La pregunta es, por tanto, si la asociación de ambas sustancias da lugar a un fenotipo sintético en *C. albicans* y cuál es el efecto sobre la expresión de los genes *PMT*.

El crecimiento de los cultivos en presencia de tunicamicina y ciclosporina A se vio reprimido (OD<sub>600</sub>: YPD [0,507; 0,550], TM [0,492; 0,485], CsA [0,497; 0,454], TM + CsA [0,272; 0,232]). La expresión del gen *PMT1* en presencia de tunicamicina y ciclosporina A presentó el mismo valor de transcrito que el obtenido en presencia sólo de ciclosporina A (Fig. 40), lo que sugiere que la regulación de *PMT1* depende principalmente de la ruta de calcineurina. La explicación más sencilla sería, que ciclosporina A actúa de forma más rápida que tunicamicina, y por tanto es el efecto

---

preponderante. La asociación parece actuar de forma aditiva sobre la expresión de *PMT2*, mientras que para *PMT4* la tendencia de expresión se asemeja a la del caso con tunicamicina (Fig. 40), sugiriendo que las diferentes rutas de señalización presentan preferencias de regulación sobre los genes *PMT*.



## 11 Conclusiones

1.- La ausencia de una isoforma Pmt se ve compensada por cambios en la expresión de uno o varios de los genes que codifican las isoformas restantes. Así, la falta de Pmt1 se vio compensada por un incremento en la expresión de *PMT2*. La falta de Pmt2 por un incremento en la expresión de *PMT4* y un descenso en la expresión de *PMT6* y la falta de Pmt4 por un aumento moderado en la expresión de *PMT1*, *PMT2* y *PMT5*. La delección de *PMT6* causó una disminución en la expresión de *PMT1*.

2.- A 37 °C, cuando las células se encuentran mayoritariamente en la forma de levadura, *PMT4* es el gen expresado mayoritariamente, mientras que *PMT1* es el gen mayoritariamente expresado cuando las células se encuentran en la forma de hifa. Este patrón refleja probablemente la necesidad de Pmt4 para asegurar una síntesis proteica correcta a 37 °C (situación de estrés), ya que esta isoforma regula la expresión de muchos genes implicados en la biosíntesis de proteínas. También explica la necesidad de Pmt1 para llevar a cabo la transición levadura-hifa, dado que el mutante *pmt1* presenta un bloqueo casi completo de filamentación y la isoforma Pmt1 manosa numerosas proteínas de pared celular.

3.- El bloqueo de la isoforma Pmt1 mediante el inhibidor de Pmt1 se ve compensado por la inducción de los genes *PMT2* y *PMT4*.

4.- Los defectos generales en composición y formación de pared celular y glicosilación inducen la expresión de *PMT1*, mientras que la expresión de los demás genes *PMT* se ve afectada de manera específica. En concreto, existe una conexión entre la expresión de *PMT2* y una *N*-glicosilación correcta. Igualmente, los resultados sugieren un nexo entre la expresión de *PMT5* y *PMT6* y la glicosilación llevada a cabo en el complejo de Golgi.

5.- Los genes *PMT* presentan aguas arriba de la región codificante secuencias intergénicas dispares. La longitud de sus fragmentos 5'UTR es también diferente. *PMT1* presenta dos puntos de inicio del transcrito (-191 y -7 nt), *PMT2*, *PMT4* y *PMT6* un único punto (-69, -42 y -113, respectivamente) y *PMT5* varios (región -90/-70 nt).

6.- Se ha detectado justo al inicio de los transcritos de *PMT1* y *PMT5*, pertenecientes a la misma subfamilia, un motivo con la secuencia "CAACCA". Dicho motivo también

---

se ha detectado al inicio del transcrito del ortólogo de *PMT1* en la levadura *Y. lipoytica*. Esta localización tan específica sugiere un posible papel regulador para el motivo.

7.- El gen *PMT1* está regulado a nivel de la región promotora, sin embargo no fue posible acotar ningún motivo imprescindible o responsable de la regulación en las condiciones ensayadas.

8.- La pequeña región intergénica aguas arriba de los genes *PMT2* y *PMT4*, junto a las diferencias entre la regulación a nivel del transcrito y de la región promotora sugieren que la regulación de la expresión de ambas proteínas tiene lugar principalmente a nivel postranscripcional.

9.- El bloqueo de la *O*-manosilación mediante el inhibidor de Pmt1 activa proteínas de rutas de señalización en dos fases. En una primera fase son activadas las proteínas Mkc1, Cek1, Tpk1, Efg1 y Cna1. A largo plazo sólo se activa Cna1.

10.- La ruta de calcineurina inhibe la expresión de *PMT1* y es necesaria para la expresión basal de *PMT2* en condiciones normales. La inhibición de la proteína calcineurina mediante ciclosporina A desencadena, en el tipo silvestre, una respuesta diferente a la del mutante *cnal* en la regulación de los genes *PMT1* y *PMT4*, lo que indica que ambos genes son regulados en función del tiempo.

11.- La ruta de la MAP quinasa Cek1 regula tanto la expresión basal de los genes *PMT* como su respuesta al inhibidor de Pmt1. En condiciones normales reprime la expresión de *PMT1*, mientras que en presencia del inhibidor de Pmt1 es necesaria para la expresión de los genes *PMT2* y *PMT4*.

12.- El análisis del crecimiento en presencia del inhibidor de Pmt1 de una colección de mutantes de factores de transcripción mostró como único candidato susceptible al mutante *ace2*. La determinación del transcrito de los genes *PMT* en el mutante *ace2* en condiciones diversas indica que este factor de transcripción reprime la expresión de *PMT1* y es necesario para la expresión basal de *PMT2* y *PMT4* en condiciones normales. Además *ace2* es necesario para regular la expresión de los genes *PMT2* y *PMT4* en respuesta al inhibidor de Pmt1. Por otro lado, la sobreexpresión de *ACE2* en el mutante *pmt1* pudo rescatar el fenotipo del mismo.

## 12 Literaturverzeichnis

Abu-Qarn M, Eichler J, Sharon N (2008) Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in bacteria and archaea. *Curr Op Struct Biol* **18**: 544-550.

Akasaka-Manyá K, Manyá H, Nakajima A, Kawakita M, Endo T (2006) Physical and functional association of human protein *O*-Mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem* **281**: 19339-19345.

Alavi A, Axford JS (2008) Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology* **47**: 760-770.

Alonso-Monge R, Román E, Nombela C, Pla J (2006) The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**: 905-912.

Apponi LH, Kelly SM, Harreman MT, Lehner AN, Corbett AH, Valentini SR (2007) An interaction between two RNA binding proteins, Nab2 and Pub1, links mRNA processing/export and mRNA stability. *Mol Biol Cell* **27**: 6569-6579.

Arana DM, Alonso-Monge R, Román E, Nombela C, Pla J (2008) MAP kinase pathways in pathogenic fungi: elements, roles and interactions. *Pathogenic fungi. Insights in molecular biology*. Caister Academic Press.

Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J (2006) A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* **17**: 3122-2135.

Bajic VB, Tan SL, Christoffels A, Schönbach C, Lipovich L, Yang L, Hofmann O, Kruger A, Hide W, Kai C, Kawai J, Hume DA, Carninci P, Hayashizaki (2006) Mice and men: their promoter properties. *PLoS Genet* **2**: 0614-0626.

Bal AM (2010) The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents* **35**: 13-18.

Basehoar AD, Zanton SJ, Pugh BF (2004) Identification and distinct regulation of yeast TATA-Box containing genes. *Cell* **116**: 699-709.

Bates S, Hughes HB, Munro CA, Thomas WPH, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Farguson MAJ, Brown AJP, Odds FC, Gow NAR (2006) Outer chain *N*-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **281**: 90-98.

Berman J (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Op Microbiol* **9**:595-601.

Blankenship JR, Fanning S, Hamaker JJ, Mitchell AP (2010) An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**: e1000752.

Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A, Ernst JF (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**: 1243-1257.

- Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* **21**: 2343-2353.
- Bonilla M, Cunningham KW (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca<sup>2+</sup> signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* **14**: 4296-4305.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brock M (2009) Fungal metabolism in host niches. *Curr Op Microbiol* **12**: 371-376.
- Brown AJ, Haynes K, Quinn J (2009) Nitrosative and oxidative responses in fungal pathogenicity. *Curr Op Microbiol* **12**:384-391.
- Bubner B, Baldwin IT (2004) Use of Real-Time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep* **23**: 263-271.
- Bustin SA, Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* **15**: 155-166.
- Buurman ET, Westwater C, Hube B, Brown AJP, Odds FC, Gow NAR (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7670-7675.
- Cantero PD, Lengsfeld C, Prill SKH, Subanović M, Román E, Pla J, Ernst JF (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-O-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **64**: 1115-1128.
- Carey M, Smale ST (2000) *Transcriptional regulation in Eukaryotes. Concepts, strategies and techniques*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Chaffin WL (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 495-544.
- Chen W, Struhl K (1988) Saturation mutagenesis of a yeast his3 „TATA element“: genetic evidence for a specific TATA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2691-2695.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Citiulo F, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ (2009) Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamydo spores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res* **9**: 1051-1060.
- Cohen TJ, Mallory MJ, Strich R, Yao TP (2008) Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryot Cell* **7**: 1191-1199.
- Cook JG, Bardwell L, Thorner J (1997) Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous growth pathway. *Nature* **390**: 85-88.
- Cottier F (2007) Roles of Msb2p and other putative sensors in environmental responses of *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.

- Cowen LE, Steinbach WJ (2008) Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* **7**: 747-764.
- Cox KJ, Rai R, Distler M, Daugherty JR, Coffman JA, Cooper TG (2000) *Saccharomyces* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J Biol Chem* **275**: 17611-17618.
- Cox JL, Hayward MM, Sanchez JF, Gegnas LD, van der Zee S, Dennis JH, Sigler PB, Shepartz A (1997) Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13475-13480.
- Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship JR, Del Poeta M, Davis D, Cardenas ME, Perfect JR, McCusker JH, Heitman J (2002) Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J* **21**: 546-559.
- Csank C, Schröppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY, Whiteway M (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**: 2713-2721.
- Cullen PJ, Schultz J, Horecka J, Stevenson BJ, Jigami Y, Sprage GF (2000) Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**: 1005-1018.
- Cyert MS (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Comm* **311**: 1134-1150.
- Davis DA (2009) How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Op Microbiol* **12**: 365-370.
- Davis L, Engebrecht J (1998) Yeast *dom34* mutants are defective in multiple developmental pathways and exhibit decreased levels of polyribosomes. *Genetics* **149**: 45-56.
- Day DA, Tuite DF (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* **157**: 361-371.
- Deck DH, Guglielmo BJ (2006) Pharmacological advances in the treatment of invasive candidiasis. *Exper Rev Anti Infect Ther* **4**: 137-149.
- Deng L, Sugiura R, Takeuchi M, Suzuki M, Ebina H, Takami T, Koike A, Iba S, Kuno T (2006) Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca<sup>2+</sup>-dependent pathways in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4790-4800.
- Dohrmann PR, Voth WP, Stillman DJ (1996) Role of negative regulation in promoter specificity of the homologous transcriptional activators Ace2p and Swi5p. *Mol Cell Biol* **16**: 1746-1758.
- Doma MK, Parker R (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **44**: 561-564.
- Domínguez A (2003) Induction of the yeast-hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer Lab manual.

- Doyon JB, Liu DR (2007) Identification of eukaryotic promoter regulatory elements using nonhomologous random recombination. *Nucl Acid Res* **35**: 5851-5860.
- Dudgeon DD, Zhang N, Ositelu OO, Kim H, Cunningham KW (2008) Nonapoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stress. *Eukaryot Cell* **7**: 2037-2051.
- Dujon B *et al.* (2004) Genome evolution in yeast. *Nature* **430**: 35-44.
- Ecker M, Vrsa V, Hagen I, Deutzmann R, Strahl S, Tanner W (2003) *O*-mannosylation precedes and potentially controls the *N*-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep* **4**: 628-632.
- Eisman B, Alonso-Monge R, Román E, Arana D, Nombela C, Pla J (2006) The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **5**: 347-358.
- Ejzykowicz DE, Cunha MM, Rozental S, Solis NV, Gravelat FN, Sheppard DC, Filler SG (2009) The *Aspergillus fumigatus* transcription factor Ace2 governs pigment production, conidiation and virulence. *Mol Microbiol* **72**: 155-169.
- Ernst JF, Prill SKH (2001) *O*-glycosylation. *Med Mycol* **39**: 67-74.
- Ernst JF (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146**: 1763-1774.
- Fernández-Álvarez A, Elías-Villalobos A, Ibeas JI (2009) The *O*-mannosyltransferase *PMT4* is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **21**: 3397-3412.
- Fernandes L, Bocca AL, Ribeiro AM, Silva SS, Paes HC, Amaral AC, Polez VLP, Martins NF, Soares CMA, Felipe MSS (2008) Regulatory networks in the host-fungal pathogen interactions. *Pathogenic fungi. Insights in molecular biology*. Caister Academic Press.
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* **6**: 99.
- Fonzi WA, Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Fox DS, Cruz MC, Sia RAL, Ke H, Cox GM, Cardenas ME, Heitman J (2001) Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**: 835-849.
- Fuchs BF, Mylonakis E (2009) Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell* **8**: 1616-1625.
- Gentzsch M, Tanner W (1996) The *PMT* gene family: protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J* **15**: 5752-5759.
- Gentzsch M, Tanner W (1997) Protein-*O*-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**: 481-486.

- Gerads M, Ernst JF (1998) Overlapping coding regions and transcriptional units of two essential chromosomal genes (*CCT8*, *TRP1*) in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Nucl Acid Res* **26**: 5061-5066.
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* **275**: 19288-19296.
- Girrbach V, Strahl S (2003) Members of the evolutionary Conserved PMT family of Protein *O*-Mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* **278**: 12554-12562.
- Goto M (2007) Protein *O*-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1415-1427.
- Goto M, Harada Y, Oka T, Matsumoto S, Takegawa K, Furukawa K (2009) Protein *O*-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1465-1474.
- Gräser Y, Volovsek M, Arrington J, Schönian G, Presber W, Mitchell TG, Vilgalys R (1993) Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12473-12477.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Harbinson CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, MacIsaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, Jennings EG, Zeitlinger J, Pokholok DK, Kellis M, Rolfe PA, Takusagawa KT, Lander ES, Gifford DK, Fraenkel E, Young RA (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99-104.
- Harbury PAD, Struhl P (1989) Functional distinctions between yeast TATA elements. *Mol Cell Biol* **9**: 5298-5304.
- Haynes K (2001) Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **9**: 591-596.
- Hemmenway CS, Heitman J (1999) Calcineurin, structure, function and inhibition. *Cell Biochem Biophys* **130**: 115-151.
- Herrero AB, Uccelletti D, Hirschberg CB, Domínguez A, Abeijon C (2002) The Golgi GDPase of the fungal Pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryot Cell* **1**: 420-431.
- Hirayama H, Fujita M, Yoko-o T, Jigami J (2008) *O*-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate Gas1\*<sub>p</sub> via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **143**: 555-567.
- Hobson RP (2003) The global epidemiology of invasive *Candida* infections-is the tide turning? *J Hosp Infect* **55**: 159-168.

- Hoehamer CF, Cummings ED, Hilliard GM, Rogers PD (2010) Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1655-1665.
- Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* **6**: e255.
- Hull CM, Raisner RM, Johnson AD (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.
- Hutzler J, Schmid M, Bernard T, Henrissat B, Strahl S (2007) Membrane association is a determinant for substrate recognition by *PMT4* protein *O*-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7827-7832.
- Introduction to quantitative PCR. Methods and application guide (2004) Stratagene.
- Iyer V, Struhl K (1995) Mechanism of differential utilization of the *his3* T<sub>R</sub> and T<sub>C</sub> TATA elements. *Mol Cell Biol* **15**: 7059-7066.
- Juo ZS, Chiu TK, Leiberman PM, Baikarov I, Berk AJ, Dickerson RE (1996) How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol* **261**: 239-254.
- Kamran M, Calcagno AM, Findon H, Bignell E, Jones MD, Warn P, Hopkins P, Denning DW, Butler G, Rogers T, Mühlischlegel FA, Haynes K (2004) Inactivation of transcription factor gene *ACE2* in the fungal pathogen *Candida glabrata* results in hypervirulence. *Eukaryot Cell* **3**: 546-552.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Müller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611.
- Karababa M, Valentino E, Pardini G, Coste AT, Bille J, Sanglard D (2006) *CRZ1*, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **59**: 1429-1451.
- Kelly MT, MacCallum DM, Clancy SD, Odds FC, Brown AJ, Butler G (2004) The *Candida albicans* *CaACE2* gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol Microbiol* **53**: 969-983.
- König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K, Feldbrügge M (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* **28**: 1855-1866.
- Kopecká M, Gabriel M (1992) The influence of Congo red on the cell wall and (1-3)- $\beta$ -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**: 115-126.
- Kriangkripipat T, Momamy M (2009) *Aspergillus nidulans* protein *O*-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot Cell* **8**: 1475-1485.
- Kumamoto CA (2008) Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr Op Microbiol* **11**: 325-330.
- Kuroda K, Kobayashi K, Kitagawa Y, Nakagawa T, Tsumura H, Komeda T, Shinmi D, Mori E, Motoki K, Fujii K, Sakai T, Nonaka K, Suzuki T, Ichikawa K, Chiba Y, Jigami Y (2008) Efficient antibody

production upon suppression of *O*-mannosylation in the yeast *Ogataea minuta*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 446-453.

Larriba G, Calderone RA (2008) Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *Pathogenic fungi. Insights in molecular biology*. Caister Academic Press.

Lass-Flörl C (2009) The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **52**: 197-205.

Lawless C, Pearson RD, Selley JN, Smirnova JB, Grant CM, Ashe MP, Pavitt GD, Hubbard SJ (2009) Upstream sequence elements direct post-transcriptional regulation of gene expression under stress conditions in yeast. *BCM Genomics* **10**: 7.

Lee BN, Elion EA (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *PNAS Genet* **96**: 12679-12684.

Lee KL, Buckley HR, Campbell CC (1975) An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **13**:148-153.

Lenardon MD, Lesiak I, Munro CA, Gow NAR (2009) Dissection of the *Candida albicans* class I chitin synthase promoters. *Mol Genet Genomics* **281**: 459-471.

Lengeler KB, Tielker D, Ernst JF (2007) Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci* **65**: 528-544.

Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol* **69**: 262-291.

Leuker CE, Sonneborn A, Delbrück S, Ernst JF (1997) Sequence and promoter regulation of the *PCK1* encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene* **192**: 235-240.

Li D, Williams D, Lowman D, Monteiro MA, Tan X, Kruppa M, Fonzi W, Román E, Pla J, Calderone R (2009) The *Candida albicans* histidine kinase Chk1p: signaling and cell wall mannan. *Fungal Genet Biol* **46**: 731-741.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.

Lockhart DL, Winzeler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836.

Lommel M, Bagnat M, Strahl S (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* *O*-Mannosylation mutants. *Mol Cell Biol* **24**: 46-57.

Lommel M, Strahl S (2009) Protein *O*-glycosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**: 816-828.

- Lommel M, Willer T, Strahl S (2008) POMT2, a key enzyme in Walker-Warburg syndrome: somatic sPOMT2, but not testis-specific tPOMT2, is crucial for mannosyltransferase activity in vivo. *Glycobiology* **18**: 615-625.
- Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM (2007) Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nature Biotech* **25**: 117-124.
- Lussier M, Sdicu AM, Shahinian S, Bussey H (1998) The *Candida albicans* *KRE9* gene is required for cell wall  $\beta$ -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9825-9830.
- Lyalin D, Koles K, Roosendaal SD, Repnikova E, Van Wechel L, Panin VM (2005) The twisted gene encodes *Drosophila* Protein *O*-Mannosyltransferase 2 and genetically interacts with the rotated abdomen gene encoding *Drosophila* protein *O*-Mannosyltransferase 1. *Genetics* **172**: 343-353.
- MacIsaac KD, Wang T, Gordon DB, Gifford DK, Storno GD, Fraenkel E (2006) An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 113.
- MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 583-604.
- Maidan MM, Thevelein JM, Van Dijck P (2005) Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. *Biochem Soc Trans* **33**: 291-293.
- Manersberger S, Nicaud JM (2003) Tagging of genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology*. Springer Lab manual.
- Manya H, Asaka-Manya K, Nakajima A, Kawakita M, Endo T (2009) Role of *N*-glycans in maintaining the activity of protein *O*-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J Biochem* **147**: 337-344.
- Manya H, Chiba A, Margolis RU, Endo T (2006) Molecular cloning and characterization of rat Pomt1 and Pomt2. *Glycobiology* **16**: 863-873.
- Martín Laso N (2003) Glicosilación y secreción en *Candida albicans*. Estudio de los genes *CaALG5* y *CaSEC18*. Trabajo de grado. Universidad de Salamanca.
- McKenzie CGJ, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barrer RN, Gow NAR, Erwig LP (2010) Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun* **78**: 1650-1658.
- Matys V, Fricke E, Geffers R, Gößling E, Haubrock M, Hehl R, Hornischer K, Karas D, Kel AE, Kel-Margoulis OV, Kloos DU, Land S, Lewicki-Potapov B, Michael H, Munich R, Reuter I, Rotert S, Saxel H, Scheer M, Thiele S, Wingender E (2003) TRANSFAC<sup>®</sup>: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucl Acids Res* **31**: 374-378.
- McNemar MD, Fonzi WA (2002) Conserved serine/threonine kinase encoded by *CBK1* regulates expression of several hypha-associated transcripts and genes encoding cell wall proteins in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **184**: 2058-2061.

- Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H (1997) Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSCI/FKSI* and its involvement of  $\beta$ -1,3-glucan. *J Bacteriol* **179**: 4096-4105.
- Misselwitz S (2007) Untersuchungen zu Interaktionen von Pmt4 in *Candida albicans*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Moore CJ, Goh HT, Hewitt JE (2008) Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. *Genomics* **92**: 159-167.
- Mora-Montes HM, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro JC, Gow NAR, Flores-Carreón A, López-Romero E (2009) Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol* **4**: 1167-1183.
- Moreno I, Martínez-Esparza M, Laforet LC, Sentandreu R, Ernst JF, Valentin E (2010) Dosage-dependent roles of the Cwt1 transcription factor for cell wall architecture, morphogenesis, drug sensitivity and virulence in *Candida albicans*. *Yeast* **27**: 77-87.
- Mulhern SM, Logue ME, Butler G (2006) *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot Cell* **5**: 2001-2013.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie S (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *BioTechniques* **32**: 2-7.
- Mullis KB, Fallona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **153**: 335-340.
- Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, Maccallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Bain JM, Brand A, Hamilton S, Westwater C, Thomson LM, Brown AJ, Odds FC, Gow NA (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* **280**: 1051-1060.
- Munro CA, Selvaggini S, de Bruijn I, Walker L, Lenardon MD, Gerssen B, Milne S, Brown AJP, Gow NAR (2007) The PKC, HOG and Ca<sup>2+</sup> signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **63**: 1399-1413.
- Navarro-García F, Sánchez M, Pla J, Nombela C (1995) Functional characterization of the *MKCI* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein-kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**: 2197-2206.
- Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C (1998) A role for the MAP kinase gene *MKCI* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 411-424.
- Navarro-García F, Eisman B, Fiuza SM, Nombela C, Pla J (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 2737-2749.
- Nelson B, Kurischko C, Horecka J, Mody M, Nair P, Pratt L, Zougman A, McBroom LDB, Hughes TR, Boone C, Luca FC (2003) RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol Biol Cell* **14**: 3782-3803.

- Nelson B, Parsons AB, Evangelista M, Shaefer K, Kennedy K, Ritchie S, Petryschin TL, Boone C (2004) Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics* **166**: 67-77.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**: 67-78.
- Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**: 855-867.
- Oka T, Sameshima Y, Koga T, Kim H, Goto M, Furukawa K (2005) Protein *O*-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in *O*-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology* **151**: 3657-3667.
- Olson GM, Fox DS, Wang P, Alspaugh JA, Buchanan KL (2007) Role of protein *O*-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **6**: 222-234.
- Orchard MG, Neuss JC, Galley CMS, Carr A, Porter DW, Smith P, Scopes DIC, Haydon D, Vousden K, Stubberfield CR, Young K, Page M (2004) Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioinorg Med Chem Lett* **14**: 3975-3978.
- Paravicini G, Mendoza A, Antonsson B, Cooper M, Losberger C, Payton M (1996) The *Candida albicans* *PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* **12**: 741-756.
- Peccoud J, Jacob C (1998) Statistical estimation of PCR amplification rates. *Gene Quantification*. Francois Ferre Eds. Birkhauser, Boston, pp. 111-128
- Peltroche-Llacsahuanga H, Goyard S, d'Enfert C, Prill SK, Ernst JF (2006) Protein *O*-mannosyltransferase isoforms regulate biofilm formation in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3488-3491.
- Pierce CG, Thomas DP, López-Ribot JL (2009) Effect of tunicamycin on *Candida albicans* biofilm formation and maintenance. *J Antimicrob Chem* **63**: 473-479.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* **29**: 2002-2007.
- Philip B, Levin DE (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271-280.
- Pilkahn-Reh V (2009) Biochemische und genetische Untersuchungen zu Proteininteraktionen der Pmt-Isoformen von *Candida albicans*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Porszynski TJ, Simons K, Bagnat M (2004) *O*-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* **15**: 1533-1543.
- Prill SKH (2004) Untersuchungen zur Funktion der fünf Isoformen der Protein-*O*-mannosyltransferase des humanpathogen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.

- Prill SKH, Klinkert B, Timpel C, Gale CA, Schröppel K, Ernst JF (2005) *PMT* family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**: 546-560.
- Pugh BF (2001) RNA polymerase II transcription machinery. *Transcription Factors*. BIOS scientific publishers Limited, 2001.
- Pujol C, Reynes J, Renaud F, Raymond M, Tibayrenc M, Ayala FJ, Janbon F, Mallié M, Bastide JM (1993) The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9456-9459.
- Rademacher F (1998) Chaperonine als dominant-negative Suppressoren von Ras-Phänotypen un der Morphogenese von *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. Meuer S., Wittwer C. and Nakagawara K. (eds) *Rapid Cycle Real-time PCR, methods and applications*. Springer Press, Heidelberg, pp. 21-34
- Román E, Cottier F, Ernst JF, Pla J (2009) Msb2 signalling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**: 1235-1249.
- Román E, Nombela C, Pla J (2005) The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**: 10611-10627.
- Roncero C, Durán A (1985) Effect of calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**: 1180-1185.
- Rouabhia M, Schaller M, Corbucci C, Vecchiarelli A, Prill SKH, Giasson L, Ernst JF (2005) Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun* **73**: 4571-4580.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. CSH Press.
- San José C, Monge RA, Pérez-Díaz R, Pla J, Nombela C (1996) The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 5850-5852.
- Sanglard D, Isher F, Marchetti O, Entenza J, Bille J (2003) Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**: 959-976.
- Sanz M, Carrano L, Jiménez C, Candiani G, Trilla JA, Durán A, Roncero C (2005) *Candida albicans* strains deficient in *CHS7*, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* **151**: 2623-2636.
- Sbia M, Parnell EJ, Yu Y, Olsen AE, Kretschmann KL, Voth WP, Stillman DJ (2008) Regulation of the yeast Ace2 transcription factor during the cell cycle. *J Biol Chem* **283**: 11135-11145.
- Schmidt I (2007) Interaktionen der Protein-O-Mannosyltransferasen aus *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.

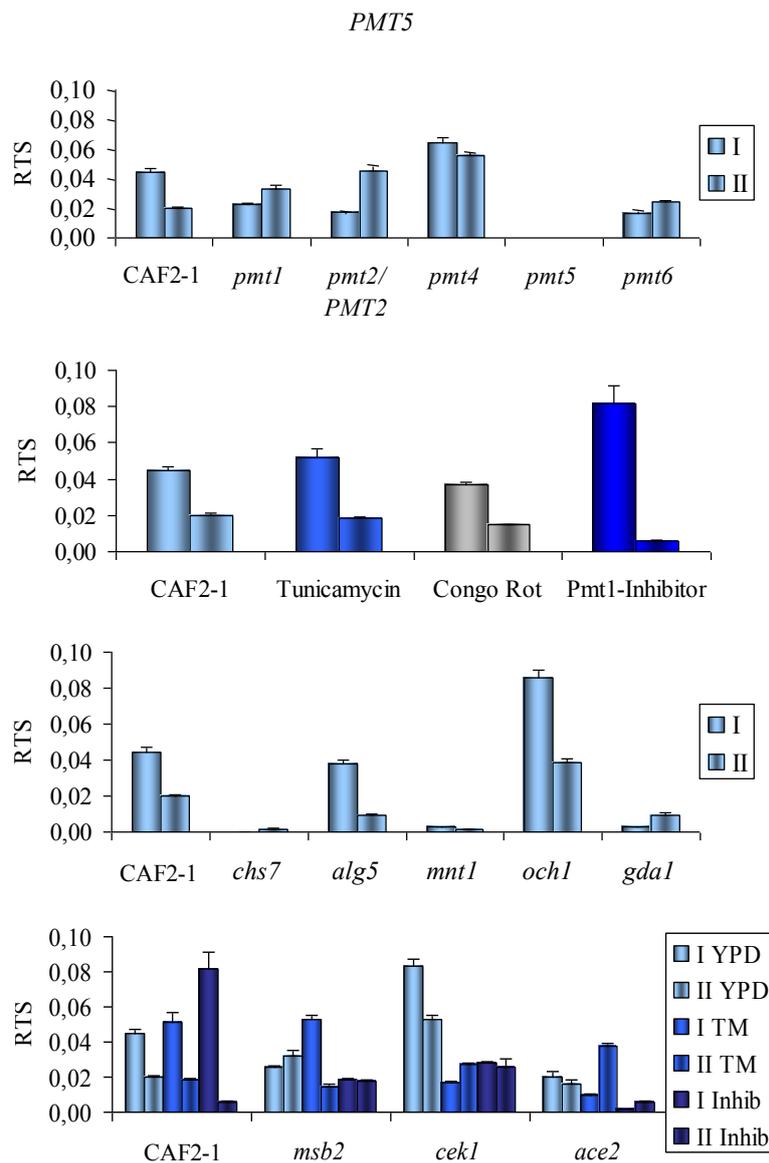
- SenGupta BH, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M (1996) A three-hybrid System to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8496-8501.
- Shapiro RS, Uppuluri P, Zaas AK, Collins C, Senn H, Perfect JR, Heitman J, Cowen LE (2009) Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol* **19**: 621-629.
- Shoham S, Levitz SM (2005) The immune response to fungal infections. *Br J Haematol* **129**: 569-582.
- Singh P, Chauhan N, Ghosh A, Dixon F, Calderone R (2004) *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**: 2390-2394.
- Smits GJ, Van Den Ende H, Klis FM (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- Soll D (2009) Why does *Candida albicans* switch?. *FEMS Yeast Res* **9**: 973-989.
- Song Y, Cheon SA, Lee KE, Lee SY, Lee BK, Oh DB, Kang HA, Kim JY (2008) Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **19**: 5456-5477.
- Sonneborn A, Bockmühl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Joachim JF (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **35**: 386-396.
- Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**: 43-56.
- Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M (2004) Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* **50**: 509-515.
- Ståhlberg A, Åman P, Ridell B, Mostad P, Kubista M (2003) Quantitative Real-Time PCR method for detection of B-Lymphocyte monoclonality by comparison of  $\kappa$  and  $\lambda$  immunoglobulin light chain expression. *Clin Chem* **49**:1 51-59.
- Steinbach WJ, Cramer RA, Perfect BZ, Asfaw YG, Sauer TC, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Benjamin DK, Heitman J, Perfect JR (2006) Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **5**: 1091-1103.
- Stevenson BJ, Rhodes N, Errede B, Sprague GF (1992) Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev* **6**:1293-1304.
- Stichternoth C, Ernst JF (2009) Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3663-3672.
- Stie J, Fox D (2008) Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell* **7**: 177-186.
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**:1982-1991.

- Su M, Lee D, Ganss B, Sodek J (2006) Stereochemical analysis of the functional significance of the conserved inverted CCAAT and TATA elements in the rat bone sialoprotein gene promoter. *J Biol Chem* **281**: 9882-9890.
- Subanović M (2005) Regulation der Genexpression durch defekte O-Glykosylierung bei dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf.
- Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**: 317-324.
- Sylhavy TJ, Beckwith JR (1985) Uses of *lac* fusions for the study of biological problems. *Microbiol Rev* **49**: 398-418.
- Tanaka N, Fujita Y, Suzuki S, Morishita M, Giga-Hama Y, Shimoda C, Takegawa K (2005) Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 813-820.
- Tebarth B (2001) Regulation der Expression des *EFG1*-Gens in der Morphogenese des humanpathogenen Pilzes *Candida albicans*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität.
- Timpel C, Strahl-Bolsinger S, Ziegelbauer K, Ernst JF (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 20837-20846.
- Timpel C, Zink S, Strahl-Bolsinger S, Schröppel K, Ernst JF (2000) Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**: 3063-3071.
- Tirosh I, Berman J, Barkai N (2007) The pattern and evolution of yeast promoter bendability. *Trends Genet* **23**: 318-321.
- Torres-Guzmán JC, Domínguez A (1997) *HOY1*, a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* **17**: 6283-6293.
- Tortorano AM, Penan J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibber CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R, the ECMM working group on Candidaemia (2004) Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European confederation of medical mycology (ECMM) hospital-based Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 327-322.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249-258.
- Tsai HK, Su CPC, Lu MY, Shih CH, Wang D (2007) Co-expression of adjacent genes in yeast cannot be simply attributed to shared regulatory system. *BMC Genomics* **8**: 352.
- Tucker CL, Fields S (2003) Lethal combinations. *Nature Genet* **35**: 204-205.
- Uhl MA, Johnson AD (2001) Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. *Microbiology* **147**: 1189-1195.

- Uhl MA, Biery M, Craig N, Johnson AD (2003) Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid fungal human pathogen *C. albicans*. *EMBO J* **22**: 2668-2678.
- Vadaie N, Dionne H, Akajagbor DS, Nickerson SR, Krysan DJ, Cullen PJ (2008) Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *JCB Rep* **181**: 1073-1081.
- van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H (2005) Glyc-O-genetics of Walter Warburg Syndrome. *Clin Genet* **67**: 281-289.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genom Biol* **3**: 0034.
- Varki A (2006) Nothing in Glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell* **126**: 841-845.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (eds) (1999) *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Vilela C, McCarthy JEG (2003) Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. *Mol Microbiol* **49**: 859-867.
- Vilela C, Velasco Ramirez C, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JEG (1999) Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *EMBO J* **18**: 3139-3152.
- Voth WP, Yu Y, Takahata S, Kretschmann KL, Lieb JD, Parker RL, Milash B, Stillman DJ (2007) Forkhead proteins control the outcome of transcription factor binding by antiactivation. *EMBO J* **26**: 4324-4334.
- Wagener J, Echtenacher B, Rohde M, Kotz A, Krapmann S, Heesemann J, Ebel F (2008) The putative  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 1661-1673.
- Walton FJ, Heitman J, Idnurm A (2006) Conserved elements of the RAM signaling pathway establish cell polarity in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* in a divergent fashion from other fungi. *Mol Biol Cell* **17**: 3769-3780.
- Wang H, Xu Z, Gao L, Hao B (2009) A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evol Biol* **9**:195.
- Whiteway M, Bachewich C (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol* **61**: 529-553.
- Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Op Struc Biol* **13**: 621-630.
- Willer T, Brandl M, Sipizcki M, Strahl S (2005) Protein-O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol* **57**: 156-170.

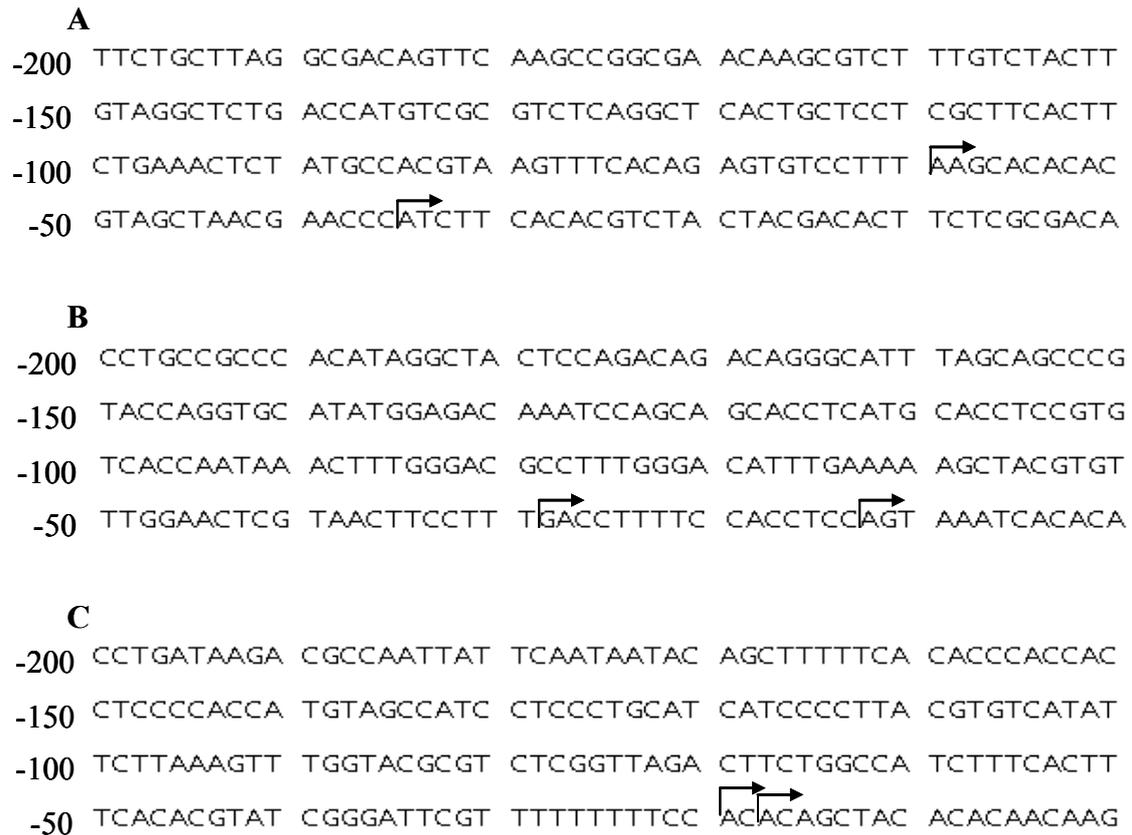
- 
- Willger SD, Ernst JF, Alspaugh JA, Lengeler KB (2009) Characterization of the *PMT* gene family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* **4**: e6321.
- Williams BAP, Slamovits CH, Patron NJ, Fast NM, Keeling PJ (2005) A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *PNAS* **102**: 10936-10941.
- Wilson RB, Davis D, Mitchell AP (1999) Rapid Hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.
- Wong MR, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotech* **39**: 75-85.
- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Schmith SS, Michael MZ, Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM, Martinez E (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Genetics* **389**: 52-65.
- Yang HY, Tatebayashi K, Yamamoto K, Saito H (2009) Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO J* **28**: 1380-1391.
- Zakrzewska A, Midgalski A, Saloheimo M, Penttila ME, Palamarczyk G, Kruszewska JS (2003) cDNA encoding protein *O*-mannosyltransferase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*; functional equivalence to *Saccharomyces cerevisiae* *PMT2*. *Curr Genet* **43**: 11-16.
- Zhou H, Hu H, Zhang L, Li R, Ouyang H, Ming J, Jin C (2007) *O*-mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. *Eukaryot Cell* **6**: 2260-2268.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl Acids Res* **32**: e103.





**Abb. 41: Transkriptspiegel des *PMT5*-Gens.** Der Transkriptspiegel des *PMT5*-Gens wurde in den Stämmen CAF2-1, SPCa2 (*pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4*), SPCa8 (*pmt6*), CRM695 (*chs7*), NAC4 (*alg5*), NGY24 (*mnt1*), NGY357 (*och1*), BAB3 (*gda1*), FCCa30 (*msb2*), CK43B-16 (*cek1*) und MK106 (*ace2*) bestimmt. Alle Stämme wurden auf YPD-Medium bei 30 °C für vier Stunden wachsen gelassen. Das *PMT5*-Transkript wurde auch in den Stämmen CAF2-1, FCCa30, CK43B-16 und MK106 nach Behandlung mit folgenden Inhibitoren bestimmt: Pmt1-Inhibitor (4 µM), Tunicamycin (2 µg/ml), Congo Rot (125 µ/ml). Der *PMT5*-Transkriptspiegel wurde wie in den Experimenten, die in Abb. 8, 11, 12 und 34 dargestellt sind, bestimmt.

**Fig. 41: Transcrito relativo del gen *PMT5*.** El transcrito del gen *PMT5* fue calculado en las cepas CAF2-1, SPCa2 (*pmt1*), SPCa4 (*pmt2/PMT2*), SPCa6 (*pmt4*), SPCa8 (*pmt6*), CRM695 (*chs7*), NAC4 (*alg5*), NGY24 (*mnt1*), NGY357 (*och1*), BAB3 (*gda1*), FCCa30 (*msb2*), CK43B-16 (*cek1*) y MK106 (*ace2*). Todas fueron inoculadas en medio YPD e incubadas a 30 °C durante cuatro horas. El transcrito de *PMT5* también fue calculado en las cepas CAF2-1, FCCa30, CK43B-16 y MK106 en presencia del inhibidor de Pmt1 (4 µM), tunicamicina (2 µg/ml) y rojo Congo (125 µ/ml). Todas las mediciones se llevaron a cabo de forma simultánea a las presentadas en las figuras 8, 11, 12 y 34.



**Abb. 42: Kartierung der *PMT1-1*, *PMT2*- und *PMT4*-Transkriptionsstartstelle bei *Y. lipolytica*.**  
 Die Pfeile markieren die Transkriptionsstartpunkte. **A:** *PMT1-1*. **B:** *PMT2*. **C:** *PMT4*.

**Fig. 42: Mapa del inicio de transcripción de los genes *PMT1-1*, *PMT2* y *PMT4* en *Y. lipolytica*.**  
 Las flechas señalan el punto de inicio de los transcritos. **A:** *PMT1-1*. **B:** *PMT2*. **C:** *PMT4*.



```

PMT2      CATATATTTCAAACCGACTTGTTCCTTTTTTCTTTTACAACC-AATTAATACAAAAGA 59
Seq7      ---ATTTCAAACCGACTTGTTCCTTTTTTCTTTTACAACC-AATTAATACAAAAGA 54
Seq8      ---ATATTTCAAACCGACTTGTTCCTTTTTT-CTTTTACAACCCAATTAATACAAAAGA 56
          *****

PMT2      AAGACAACAATCATAATGCTACTTCTGTTGAACCCAATGAAACAGAAGCTTTGTTGAGA 119
Seq7      AAGACAACAATCATAATGCTACTTCTGTTGAACCCAATGAAACAGAAGCTTTGTTGAGA 114
Seq8      AAGACAACAATCATAATGCTACTTCTGTTGAACCCAATGAAACAGAAGCTTTGTTGAGA 116
          *****

PMT2      AAGCAGAATGATCTTCCACAACCTGCCTCAATTGAAGAAAAATATCCTCACCAACAAGGA 179
Seq7      AAGCAGAATGATCTTCCACAACCTGCCTCAATTGAAGAAAAATATCCTCACCAACAAGGA 174
Seq8      AAGCAGAATGATCTTCCACAACCTGCCTCAATTGAAGAAAAATATCCTCACCAACAAGGA 176
          *****

PMT2      GAGGCTGCAGAAGACGATGACGACACTCTTAAAAGAACCCAATATGATGAAGCTAAAGAA 239
Seq7      GAGGCTGCAGAAGACGATGACGACACTCTTAAAAGAACCCAATATGATGAAGCTAAAGAA 234
Seq8      GAGGCTGCAGAAGACGATGACGACACTCTTAAAAGAACCCAATATGATGAAGCTAAAGAA 236
          *****

PMT2      ACCGCTGAATCTTTAAAACAAGTTGAATCGATATTAGCACCTATTGTTTTCACATGCATTG 299
Seq7      ACCGCTGAATCTTTAAAACAAGTTGAATCGATATTAGCACCTATTGTTTTCACATGCATTG 294
Seq8      ACCGCTGAATCTTTAAAACAAGTTGAATCGATATTAGCACCTATTGTTTTCACATGCATTG 296
          *****

PMT2      TCATTTTTCGTGAGATTTTATCGTATTTTTCAGTGAATGACCATGTTGTTGGGATGAAGCT 359
Seq7      TCATTTTTCGTGAGATTTTATCGTATTTTTCAGTGAATGACCATGTTGTTGGGATGAAGCT 354
Seq8      TCATTTTTCGTGAGATTTTATCGTATTTTTCAGTGAATGACCATGTTGTTGGGATGAAGCT 356
          *****

PMT2      CATTTTGGTAAATTTGGATCCTATTATTACGACACG 396
Seq7      CATTTTGGTAAATTTGGATCCTATTATTACGACACG 391
Seq8      CATTTTGGTAAATTTGGATCCTATTATTACGACACG 393
          *****

PMT4      ACTGTCCAATTCCTTCACGATTGAGTTGTGTCAATTCTAGTAAACATGTCACAGACTTTA 60
Seq10     ---GTCCAATTCCTTCACGATTGAGTTGTGTCAATTCTAGTAAACATGTCACAGACTTTA 57
          *****

PMT4      AAAAAGAGAGGCGGTAATAGCAGCGGAGGAAATCGCCAACAACCTTCTAACATTGAATTT 120
Seq10     AAAAAGAGAGGCGGTAATAGCAGCGGAGGAAATCGCCAACAACCTTCTAACATTGAATTT 117
          *****

PMT4      GATGATAAGAAAACCTGAGTTCGATTGAATGCAATTGTTCCCTCCAAAAGAACCAGAGTAT 180
Seq10     GATGATAAGAAAACCTGAGTTCGATTGAATGCAATTGTTCCCTCCAAAAGAACCAGAGTAT 177
          *****

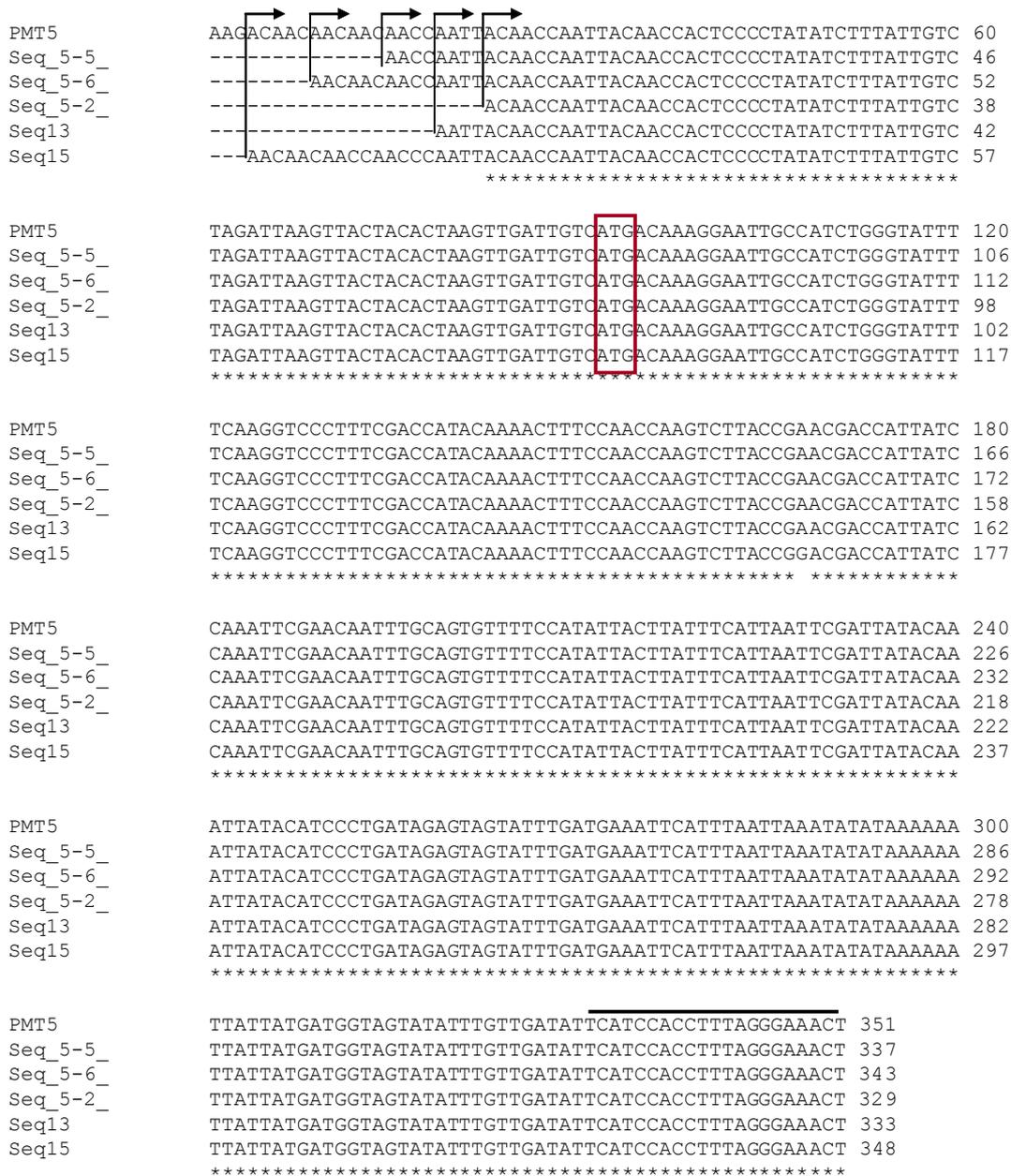
PMT4      AAATACTTGGCAGCTCTAACTTTGGTAACCCCTCTAGCAATTTACACTAGATTCACAAAA 240
Seq10     AAATACTTGGCAGCTCTAACTTTGGTAACCCCTCTAGCAATTTACACTAGATTCACAAAA 237
          *****

PMT4      CTAGGCACTCCAAATAAAGTTG 262
Seq10     CTAGGCACTCCAAATAAAGTTG 259
          *****

```

**Abb. 44: Sequenzvergleich der 5'-RACE *PMT2*- und *PMT4*-Transkripte und deren entsprechenden Loci von *C. albicans*.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) angefertigt. Die Pfeile markieren die Transkriptionsstartstelle. Mit einem roten Rahmen wird das ATG-Kodon gekennzeichnet. Die schwarze Linie signalisiert das innere Oligonukleotid.

**Fig. 44: Comparación de las secuencias 5'-RACE de *PMT2* y *PMT4* con sus correspondientes secuencias de la base de datos.** El alineamiento fue llevado a cabo con el programa ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)). Las flechas indican el inicio de los transcritos. El codón de inicio ATG ha sido recuadrado con un marco rojo. La línea negra señala el oligo interno utilizado para amplificar el producto de la segunda PCR.



**Abb. 45: Sequenzvergleich der 5'-RACE *PMT5*-Transkripte und des *PMT5*-Locus von *C. albicans*.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) angefertigt. Die Pfeile markieren die Transkriptionsstartstelle. Mit einem roten Rahmen wird das ATG-Kodon gekennzeichnet. Die schwarze Linie signalisiert das innere Oligonukleotid.

**Fig. 45: Comparación de las secuencias 5'-RACE de *PMT5* con la secuencia de la base de datos.** El alineamiento fue llevado a cabo con el programa ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)). Las flechas indican el inicio de los transcritos. El codón de inicio ATG ha sido recuadrado con un marco rojo. La línea negra señala el oligo interno utilizado para amplificar el producto de la segunda PCR.

```

PMT6      TTC AATCTCATTATTCCCGTTTGGTTTCCCCCTGTTTAGCATAGATATCTTCTACGTCATT 60
Seq17     ---AATCTCATTATTCCCGTTTGGTTTCCCCCTGTTTAGCATAGATATCTTCTACGTCATT 57
          *****

PMT6      GAATCTTTCTATTTGAACATCTTTCAAACCTCAACACCTAACCACTAATCCAAACAATG 120
Seq17     GAATCTTTCTATTTGAACATCTTTCAAACCTCAACACCTAACCACTAATCCAAACAATG 117
          *****

PMT6      CAACGGGTATTTCGACAGGTGTATCACCTTTGATTTGGATGAAAACAATCACAACGACT 180
Seq17     CAACGGGTATTTCGACAGGTGTATCACCTTTGATTTGGATGAAAACAATCACAACGACT 177
          *****

PMT6      CAATTCATCATCGACACCAAACCACCACAGCCAGAGCCACGACTCCCTGGGTGAACGTG 240
Seq17     CAATTCATCATCGACACCAAACCACCACAGCCAGAGCCACGACTCCCTGGGTGAACGTG 237
          *****

PMT6      ACGATA 246
Seq17     ACGATA 243
          *****

```

**Abb. 46: Sequenzvergleich des 5'-RACE *PMT6*-Transkripts und des *PMT6*-Locus von *C. albicans*.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) angefertigt. Der Pfeil markiert die Transkriptionsstartstelle. Mit einem roten Rahmen wird das ATG-Kodon gekennzeichnet. Die schwarze Linie signalisiert das innere Oligonukleotid.

**Fig. 46: Comparación de las secuencias 5'-RACE de *PMT6* con la secuencia de la base de datos.** El alineamiento fue llevado a cabo con el programa ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)). La flecha indica el inicio de los transcritos. El codón de inicio ATG ha sido recuadrado con un marco rojo. La línea negra señala el oligo interno utilizado para amplificar el producto de la segunda PCR.

```

503966      TTTAAGCACACACGTAGCTAACGAACCCATCTTCACACGTCTACTACGACACTTCTCGCG 60
pPdCS7      -----ATCTTCACACGTCTACTACGACACTTCTCGCG 32
pPdCS8      ---AAGCACACACGTAGCTAACGAACCCATTTTCACACGTCTACTACGACACTTCTCGCG 57
                * * * * *

503966      ACAATGTCCAAAGGTGAAAAGAAGACGGTACAAGCCGTGTACGCCAAATCGGCCCTCGAG 120
pPdCS7      ACAATGTCCAAAGGTGAAAAGAAGACGGTACAAGCCGTGTACGCCAAATCGGCCCTCGAG 92
pPdCS8      ACAATGTCCAAAGGTGAAAAGAAGACGGTACAAGCCGTGTACGCCAAATCGGCCCTCGAG 117
                * * * * *

503966      GAGATGGCTCCTGAGGTCACCTCCGGCCCCCGGATACAAGAACCCTGTCTGAGGAACGCGCT 180
pPdCS7      GAGATGGCTCCTGAGGTCACCTCCGGCCCCCGGATACAAGAACCCTGTCTGAGGAACGCGCT 152
pPdCS8      GAGATGGCTCCTGAGGTCACCTCCGGCCCCCGGATACAAGAACCCTGTCTGAGGAACGCGCT 177
                * * * * *

503966      CTGACACCCAAGGATCGAGTGCTCATCTTCGTG 213
pPdCS7      CTGACACCCAAGGATCGAGTGCTCATCTTCGTG 185
pPdCS8      CTGACACCCAAGGATCGAGTGCTCATCTTCGTG 210
                * * * * *

502660      GGTGACGGCATCCGCGGGGCTCTCTCTCAACCAAGCCATAAAAAGAGTCGGTAGTCCTGG 60
pPdCS4      ---GACGGCATCCGCGGGGCTCTCTCTCAACCAAGCCATAAAAAGAGTCGGTAGTCCTGG 57
pPdCS6      -----AACCAAGCCATAAAAAGAGTCGGTAGTCCTGG 31
pPdCS5      -----AACCAAGCCATAAAAAGAGTCGGTAGTCCTGG 30
                * * * * *

502660      AGAAAGACCAAAAAGAAGACGGATTTGCAAAAAGACCATTTTGGAGGCTCGCACAACAACA 120
pPdCS4      AGAAAGACCAAAAAGAAGACGGATTTGCAAAAAGACCATTTTGGAGGCTCGCACAACAACA 117
pPdCS6      AGAAAGACCAAAAAGAAGACGGATTTGCAAAAAGACCATTTTGGAGGCTCGCACAACAACA 91
pPdCS5      AGAAAGACCAAAAAGAAGACGGATTTGCAAAAAGACCATTTTGGAGGCTCGCACAACAACA 90
                * * * * *

502660      GCATGACAGACACGAAAGAGCAATCGAGTCTACCCGAAAAGGACCCCGCCATGGACCCTG 180
pPdCS4      GCATGACAGACACGAAAGAGCAATCGAGTCTACCCGAAAAGGACCCCGCCATGGACCCTG 177
pPdCS6      GCATGACAGACACGAAAGAGCAATCGAGTCTACCCGAAAAGGACCCCGCCATGGACCCTG 151
pPdCS5      GCATGACAGACACGAAAGAGCAATCGAGTCTACCCGAAAAGGACCCCGCCATGGACCCTG 150
                * * * * *

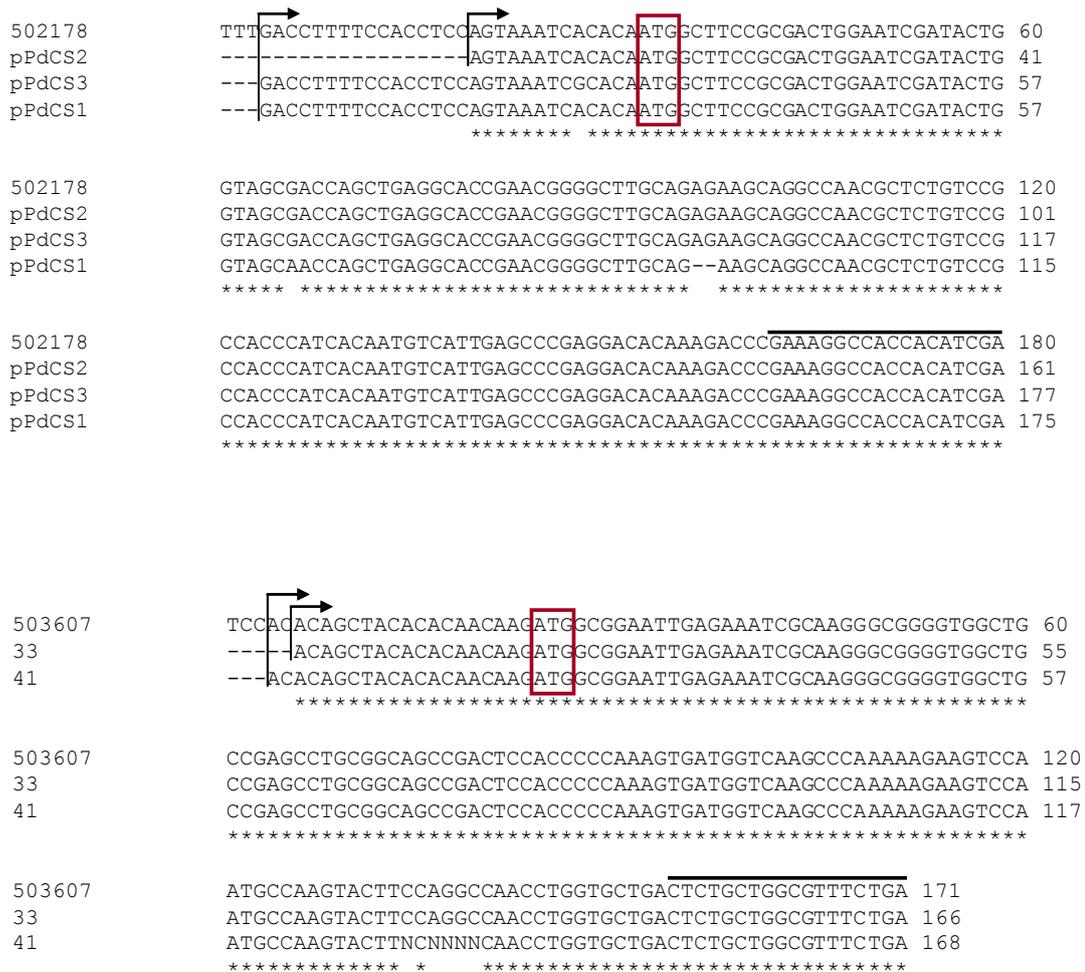
502660      ACACTACCCCCACACCCCCACCTCCGACCTCACCAGCAGAAACGTCTCGACAGGCACAG 240
pPdCS4      ACACTACCCCCACACCCCCACCTCCGACCTCACCAGCAGAAACGTCTCGACAGGCACAG 237
pPdCS6      ACACTACCCCCACACCCCCACCTCCGACCTCACCAGCAGAAACGTCTCGACAGGCACAG 211
pPdCS5      ACACTACCCCCATACCCCCACCTCCGACCTCACCAGCAGAAACGTCTCGACAGGCACAG 210
                * * * * *

502660      GAGTGCTGCTGGGCCACTACT 261
pPdCS4      GAGTGCTGCTGGGCCACTACT 258
pPdCS6      GAGTGCTGCTGGGCCACTACT 232
pPdCS5      GAGTGCTGCTGGGCCACTACT 231
                * * * * *

```

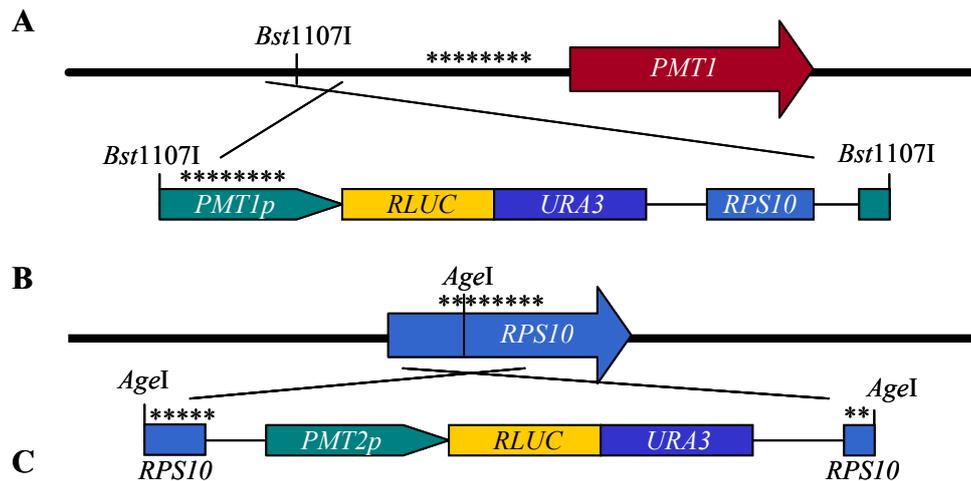
**Abb. 47: Sequenzvergleich der 5'-RACE *PMT1-1*-Transkripte (YAL0E15081g) und des *PMT1*-Locus von *Y. lipolytica*.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) angefertigt. Die Pfeile markieren die Transkriptionsstartstelle. Mit einem roten Rahmen wird das ATG-Kodon gekennzeichnet. Die schwarze Linie signalisiert das innere Oligonukleotid.

**Fig. 47: Comparación de las secuencias 5'-RACE de *PMT1-1* (YALI0E15081g) de *Y. lipolytica* con la secuencia de la base de datos.** El alineamiento fue llevado a cabo con el programa ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)). Las flechas indican el inicio de los transcritos. El codón de inicio ATG ha sido recuadrado con un marco rojo. La línea negra señala el oligo interno utilizado para amplificar el producto de la segunda PCR.



**Abb. 48: Sequenzvergleich der 5'-RACE *PMT1-2* (YAL0D10549g)- und *PMT2* (YAL0C23364g)-Transkripte mit deren entsprechenden Gen-Loci von *Y. lipolytica*.** Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) angefertigt. Die Pfeile markieren die Transkriptionstartstelle. Mit einem roten Rahmen wird das ATG-Kodon gekennzeichnet. Die schwarze Linie signalisiert das innere Oligonukleotid.

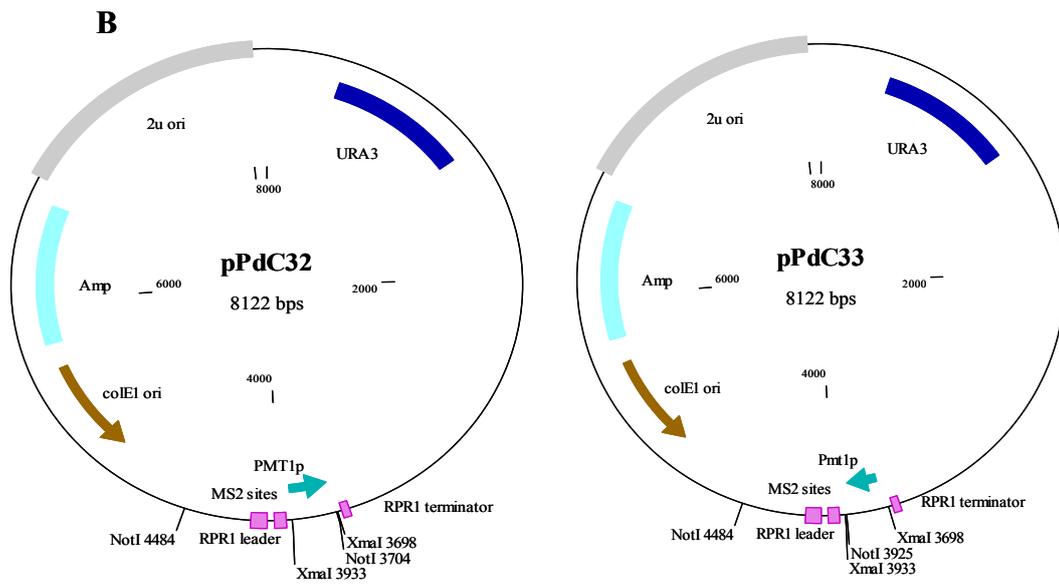
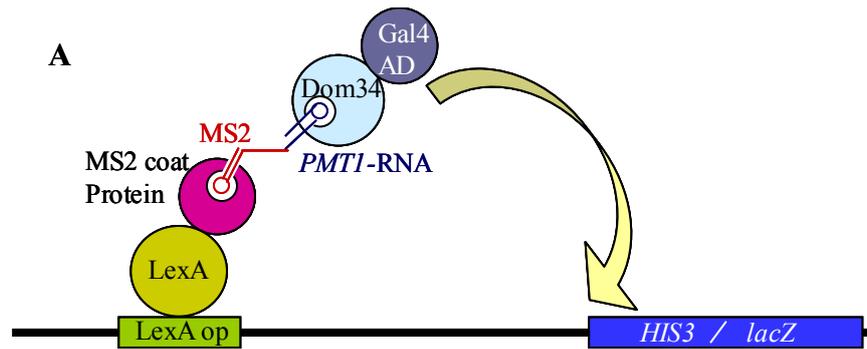
**Fig. 48: Comparación de las secuencias 5'-RACE de *PMT1-2* (YALI0D10549g) y *PMT2* (YAL0C23364g) de *Y. lipolytica* con la secuencia de la base de datos.** El alineamiento fue llevado a cabo con el programa ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)). Las flechas indican el inicio de los transcritos. El codón de inicio ATG ha sido recuadrado con un marco rojo. La línea negra señala el oligo interno utilizado para amplificar el producto de la segunda PCR.



FUSION	LOCUS DER INTEGRATION	RESTRIKTION DER DNA	SONDE	GRÖßE DER BANDEN / kb
<i>PMT1p-RLUC</i>	<i>PMT1 (Bst1107I)</i>	<i>EcoRV</i>	<i>PMT1</i> Promotor	WT: $\approx 8$ Einfach-Integration: $\approx 9,3; \approx 6$ Mehrfach-Integration: $\approx 9,3; \approx 6; \approx 7,3$
<i>PMT1p-lacZ</i>	<i>PMT1 (Bst1107I)</i>	<i>ScaI</i>	<i>PMT1</i> Promotor	WT: $\approx 4,4$ Einfach-Integration: $\approx 7; \approx 4,1$ Mehrfach-Integration: $\approx 7; \approx 6,8; \approx 4,1$
<i>PMT2p-RLUC</i>	<i>RPS10 (BglII)</i>	<i>XbaI</i>	<i>RPS10</i>	WT: $\approx 9,4$ Einfach-Integration: $\approx 5,1-5,5; \approx 10,8$ Mehrfach-Integration: $\approx 5,1-5,5 \approx 6,8-7; \approx 10,8$
	<i>PMT2 (SwaI)</i>	<i>BsrGI</i>	<i>PMT2</i> Promotor	WT: $\approx 9,9$ Einfach-Integration: $\approx 4,5; \approx 12$ Mehrfach-Integration: $\approx 4,5; \approx 12; \approx 6,8$
<i>PMT4p-RLUC</i>	<i>RPS10 (AgeI)</i>	<i>XbaI</i>	<i>PMT4</i> Promotor	WT: $\approx 16,1$ Einfach-Integration: $\approx 5,1-5,7$ Mehrfach-Integration: $\approx 5,1-5,7; \approx 6,6-7,2$
<i>PMT4p-lacZ</i>	<i>PMT4 (PshAI)</i>	<i>HindIII</i>	<i>LacZ</i>	Einfach-Integration: $\approx 5,1$ Mehrfach-Integration: $\approx 5,1; \approx 8$

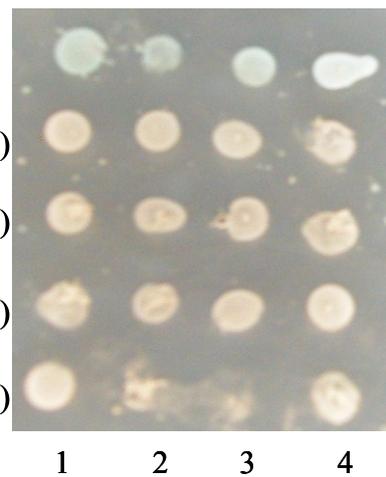
**Abb. 49: Schema zur genomischen Integration der *PMTp*-Reporter-gen-Fusionen.** A, B. schematische Darstellung der Integrationsmöglichkeiten im Wildtyp-Locus und im *RPS10*-Locus über homologe Rekombination. Die Sterne kennzeichnen die Bindungsstellen der verwendeten Southern-Blot-Sonde. C. Zusammenfassung der Plasmidintegrationen der Reporterplasmide, welche durch Southern-Blotting nachgewiesen wurden. Angegeben werden der Locus der Integration und die Schnittstelle der Plasmidlinearisierung, mit welchem Enzym die DNA verdaut wurde, welches Fragment als Sonde markiert wurde und die Größe der erwarteten Banden.

**Fig. 49: Integraciones de los plásmidos con las fusiones de los promotores *PMT* a los genes chivatos *RLUC* y *lacZ*.** A, B. Esquema de la integración en el locus nativo o en el locus *RPS10* mediante recombinación homóloga. Los asteriscos señalan el punto de unión de la sonda para Southern-Blot. C. Tabla-resumen de las integraciones comprobadas mediante Southern-Blot. Son destacados el locus de integración con el sitio de corte del plásmido, la enzima de restricción del ADN genómico, la sonda utilizada y el tamaño esperado de las bandas.



**C** X-Gal Overlay 24h, 37 °C

- IRE (positive Kontrolle)
- pIII/MS2-1 + *PMT1p* (pPdC32)
- pIII/MS2-1 + *PMT1p* (pPdC33)
- pIII/MS2-2 + *PMT1p* (pPdC35)
- pIII/MS2-2 + *PMT1p* (pPdC34)



**Abb. 50: Drei-Hybrid-Untersuchung zur Interaktionsanalyse von Dom34 mit dem *PMT1*-Promotorbereich.** **A.** Schematische Darstellung des verwendeten Drei-Hybrid-Systems. Das erste Hybrid-Protein besteht aus dem *E. coli* LexA-Protein (DNA-Bindedomäne) und dem Bacteriophage MS2 coat-Protein (RNA-Bindedomäne). Das zweite Hybrid-Protein besteht aus Dom34 (Zielprotein) und der Gal4-Aktivierungsdomäne. Die Hybrid-RNA besteht aus zwei MS2 coat-Protein bindenden Stellen und dem *PMT1*-Promotorfragment -221/-1 (Ziel-RNA). Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme für den Versuch tragen die Reportergene *HIS3* und *lacZ*. In den Promotorregionen beider Gene sind mehrere Lex op-Bindestellen integriert worden (SenGupta *et al.*, 1996; Berstein *et al.*, 2002). **B.** Plasmidkarte des pIII/MS2-1 Plasmides mit integriertem *PMT1*-Promotorfragment -221/-1. Das Ziel-RNA-Fragment kann in die Plasmide pIII/MS2-1 und pIII/MS2-2 (nach dem MS2-kodierenden Fragment bzw. vor dem MS2-kodierenden Fragment) an der Stelle *XmaI* kloniert werden. Somit ergeben sich vier mögliche Hybrid-RNA Moleküle, die falsche negative Ergebnisse wegen Modifikationen in der RNA-Struktur verringern sollen. **C.** X-Gal Overlay-Test des Drei-Hybrid-Systems. Der Stamm L40coat wurde mit den Plasmiden pACTII-DOM34 und pPdC32 bis pPdC35 wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben ko-transformiert. Als positive Kontrolle wurde der Stamm L40coat mit den Plasmiden pAD-IRP und pIIIA-IRE-MS2 ko-transformiert. Vier verschiedene Klone jeder ko-Transformation wurden auf SD-(minus Leu, minus Ura)-Medium getropft. Zuletzt wurde ein X-Gal Overlay-Test durchgeführt wie in Abschnitt 3.9.1.3.2 beschrieben.

**Fig. 50: Sistema de tres híbridos para el análisis de la interacción entre Dom34 y el fragmento -221/-1 de la región promotora de *PMT1*.** **A.** Esquema del sistema de tres híbridos utilizado en este experimento. Una de las proteínas híbridas consiste en la proteína LexA de *E. coli* (dominio de unión al DNA) y el bacteriófago MS2. La otra proteína híbrida consiste en la proteína Dom34 (proteína diana) y el dominio de activación Gal4. El ARN híbrido está formado por dos secuencias de unión a la proteína MS2 y el fragmento -221/-1 de la región promotora de *PMT1*. La cepa utilizada para el ensayo, L40coat, lleva los genes chivatos *HIS3* y *lacZ*. Aguas arriba de ambos genes se han insertado varios sitios de unión Lexop (SenGupta *et al.*, 1996; Berstein *et al.*, 2002). **B.** Mapas del plásmido pIII/MS2-1 con el fragmento -221/-1 de la región promotora de *PMT1*. El fragmento de ARN diana puede ser clonado en los plásmidos pIII/MS2-1 y pIII/MS2-2 (detrás y delante de la región codificante para MS2, respectivamente) en el sitio único de corte *XmaI*, con lo que se obtienen cuatro posibles moléculas híbridas de ARN. De esta forma se reduce el número de falsos negativos debidos a un cambio de conformación del ARN. **C.** Ensayo X-Gal Overlay del sistema. La cepa L40coat fue cotransformada con los plásmidos pACTII-DOM34 y pPdC32 a pPdC35 (apartado 3.7.3). Como control positivo la misma cepa fue cotransformada con los plásmidos pAD-IRP y PIIIA-IRE-MS2. Cuatro clones independientes de cada cotransformación fueron sembrados en medio SD menos los aminoácidos Leu y Ura. Por último se llevó a cabo el ensayo de X-Gal Overlay (apartado 3.9.1.3.2).



## 14 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>GMP</b>	Guanosinmonophosphat, guanosina 5'-monofosfato
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>Hyl</b>	Hydroxylysin, hidroxilisina
<b>Amp</b>	Ampicillin, ampicilina	<b>Hyp</b>	Hydroxyprolin, hidroxiprolina
<b>Ara</b>	Arabinose, arabinosa	<b>kb</b>	Kilobasen, kilobase
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico	<b>Leu</b>	Leucin, leucina
<b>Asn</b>	Asparagin, asparagina	<b>Man</b>	Mannose, manosa
<b>bp</b>	Basenpaare, pares de bases	<b>MAPK</b>	Mitogen-aktiviertes Protein-Kinase, proteína quinasa activada por mitógeno
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>mARN</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>°C</b>	Grad Celsius, grados Celsius	<b>mRNA</b>	messenger-RNA
<b>ca.</b>	circa	<b>nt</b>	Nukleotide, nucleótidos
<b>CsA</b>	Cyclosporin A, ciclosporina A	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat, dietilpirocarbonato	<b>RTS</b>	relativer Transkriptspegel
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>s</b>	Sekunde, segundo
<b>Dol-P</b>	Dolicholphosphat, dolicolfosfato	<b>Ser</b>	Serin, serina
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol, ditiotreitól	<b>T</b>	Zeit, tiempo
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum, retículo endoplásmico	<b>Thr</b>	Threonin, treonina
<b>Fig.</b>	figura	<b>TM</b>	Tunicamycin, tunicamicina
<b>FOA</b>	5'-Fluororotidinsäure, ácido 5'-fluoroorótico	<b>TSS</b>	Transkriptsstartstelle
<b>Fuc</b>	Fucose, fucosa	<b>Tyr</b>	Tyrosin, tirosina
<b>Gal</b>	Galaktose, galactosa	<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>GalNAc</b>	N-Acetylgalaktosamine, N-acetilgalactosamina	<b>usw.</b>	und so weiter
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat, guanosina 5'-difosfato	<b>5'UTR</b>	5'-untranslatierter Bereich, región 5' no codificante
<b>Glc</b>	Glukose, glucosa	<b>Xyl</b>	Xylose, xilosa
<b>GlcNAc</b>	N-Acetylglukosamine, N-acetilglucosamina	<b>z.B.</b>	zum Beispiel



## Danksagung

“El otro día hicimos un congreso sobre ciencia  
y los estudiantes me dijeron: “Habríamos venido  
si nos hubieran dado algún crédito”. Y yo les dije:  
“Alguna vez habrán besado gratis a una chica.””

Entrevista a Claudio Magris  
El País, Babelia, 1 de febrero de 2003

“mas de que sirven nuestras vidas,  
si no enriquecen otras vidas”

José Hierro

Estos dos extractos resumen a la perfección lo que ha significado para mí esta tesis doctoral. No tendría nada más que añadir, sin embargo me siento obligada a responder a una pregunta: wieso wollte ich unbedingt diese Arbeit auf Deutsch schreiben? Wegen Susana, meiner Deutschlehrerin. Aber bevor ich weiter schreibe, soll ich erwähnen, dass die Deutschsprache meiner Danksagung nicht korrigiert wird. Es ist, wie es ist. Ich habe viele Deutschlehrer erlebt, aber sie war, ist und wird immer die Einzige sein. Nicht nur war sie eine gute Lehrerin, sondern auch eine gute Erzieherin. En verdad una vida que enriquece otras vidas. Es war anscheinend keine sehr gute Idee. Aber es ist, wie es ist.

Agradezco al Dr Ernst y al Dr Domínguez la tutela de esta tesis, el esfuerzo extra de corrección y las muchas oportunidades que he tenido de asistir a congresos.

Der Anfang im Labor war hart aber zum Glück war Fabien da. He had a lot of patience with me, in fact, when someone asks me if I have five minutes to check something about work I always think of Fabien. He really spent a lot of time to explain me any procedure. He also made me laugh long and loud but he had anyhow some fun because of me. Thanks, Fabien, for everything and...it was just great to meet you again in Miami.

Fabien war irgendwann weg, aber Eva war schon im Raum 80. Vielleicht war es nicht immer einfach, uns zu verstehen, aber gut Ding will Weile haben, auch die Freundschaft.

Einmal hat Jessi mich gefragt, wie es mir gefalle, hier zu sein. Ich antwortete, dass ich nie erwartet hatte, was ich hier gefunden habe. Ich fühlte mich seit dem ersten Tag wohl; ich war begeistert, dass wir so viele Sachen zusammen gemacht haben und, dass alles sich Mühe gegeben haben, um eine gute Stimmung zu haben. Ich bin immer noch davon erstaunt. Wenn ich irgendwann meine Erinnerungen nicht verliere (z.B. wegen einer Anhäufung des Amyloid-Proteins, weil meine O-Glykosylierung nicht mehr so richtig funktioniert...), werde ich viele Namen und Momente nie vergessen. Eva, Dagmar (ich werde Dich auch vermissen), Theres, Catrin, Inga, Jessi, Klaus, Denis, Nico und Pia (Danke, danke, danke für alles!!!), Carsten, Thomas, Daniel, Ingo, Anselm, Jürgen, Steffi. Sven, Nora, Christine, Vanessa, Vanessa. Elvira, Inma, Jacek, Carmen. Quentin, Steffen, Nadine, Alida, Maya, Christoff.

---

Klaus. Ich wünschte mir, ich hätte die Wörter, mich bei Dir zu bedanken, es ist leider nicht so. Vielleicht finde ich sie eines Tages. Anyway, Danke.

Andere Mitarbeiter des Instituts sollen auch genannt werden, Anna, Agnes, Michaela, Ute, Uli und Rainer.

Agradezco a mis padres todo su apoyo. Seguramente ellos y mi familia se alegran más por esta tesis que yo. Cuántas veces me habrán dicho que me lo merezco, por el trabajo, la constancia y el esfuerzo. Mi trabajo, esfuerzo y constancia no fueren tales, si ellos no me los hubieran enseñado con el ejemplo. Queda así dicho, quien ha de llevarse en verdad el mérito.

A mi grupo de trabajo en Salamanca, Mari Carmen, Zahra y Ahmad, Laura, Carlos.

A mis amigas de toda vida Ana, Aurora, Isabel y Leticia, por estar siempre ahí, aun cuando no queda mucho tiempo para vernos. A Fran y a Luis.

And last but not least... a veces la vida es curiosa. Auf einem Meeting habe ich jemanden kennengelernt, bei dem ich mich zuletzt bedanken möchte. Es wäre unfair, wenn ich es nicht mache. Er hat mir einen Referenzpunkt geschenkt. Umsonst. Und deswegen bewundere ich ihn. Umsonst.

Todo "Pilar" que se precie necesita unos buenos cimientos. Y yo tengo los míos.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Sie wurde in Vereinbarung über ein Grenzüberschreitendes Promotionsverfahren (Cotutela de tesis doctorales) zwischen der Universität Salamanca (Spanien) und der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf (Deutschland) angefertigt.

Düsseldorf, Juni 2010

M<sup>a</sup> Pilar Domínguez Cantero

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Cantero PD, Lengsfeld C, Prill SKH, Subanović M, Román E, Pla J, Ernst JF (2007) Transcriptional and physiological adaptation to defective protein-*O*-mannosylation in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **64**: 1115-1128.

Third FEBS advanced lecture course. Human fungal pathogen: molecular mechanisms of Host-Pathogen interactions and virulence. La Colle sur Loup, France. May 2<sup>nd</sup>-8<sup>th</sup>, 2009. Titel: Regulation of the *PMT* genes in *Candida albicans*. Authors: Pilar D. Cantero and Joachim Ernst.

IV International conference on molecular mechanisms of fungal cell wall biogenesis. Warsaw, Poland. August 30<sup>th</sup>-September 3<sup>rd</sup>, 2009. Titel: Regulation of the *PMT1* gene in *Candida albicans*. Authors: Pilar D. Cantero and Joachim Ernst.

10<sup>th</sup> *Candida* and Candidiasis. ASM Conferences. Miami, Florida. March 22<sup>nd</sup>-26<sup>th</sup>, 2010. Titel: *O*-Mannosylation and signalling pathways in *Candida albicans*. Authors: Pilar D. Cantero and Joachim F. Ernst.

